Ana Silvia Miguel

INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS EM MODELO EXPERIMENTAL DE DEPRESSÃO E SUA PREVENÇÃO PELO TRATAMENTO COM CLORETO DE LÍTIO

Este exemplar corresponde à versão final da tese de Mestrado, apresentada a Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Farmacologia da Farmacêutica Ana Silvia Miguel.

Campinas, 01 de setembro de 1995

Prof. Dr. Carlos Alberto Flores
- Orientador -

Campinas, 1995.

M588i
25860/BC

Ana Silvia Miguel

INIBIÇÃO DA MIGRAÇÃO DE LEUCÓCITOS EM MODELO EXPERIMENTAL DE DEPRESSÃO E SUA PREVENÇÃO PELO TRATAMENTO COM CLORETO DE LÍTIO

Tese apresentada ao Departamento de Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP para obtenção do Titulo de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Alberto Flores

Campinas, 1995.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Prof. Dr. Carlos Alberto Flores

Membros:

1. Prof. Dr. Carlos Alberto Flores
2. Prof. Dr. Paulina Sumie Yamamoto
3. Prof. Dr. Gilberto D'Arrigo Fernandes

Curso de pós-graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 01/09/95

AO MEU PAI, MEU GRANDE INCENTIVADOR,

POR TORNAR TUDO ISTO MAIS VALIOSO

EROS E PSIQUE

"... E ASSIM VEDES, MEU IRMÃO, QUE AS VERDADES QUE VOS FORAM DADAS NO GRAU DE ADEPTO MENOR, SÃO, AINDA QUE OPOSTAS, A MESMA VERDADE"

DO RITUAL DO GRANDE MESTRE DO ÁTRIO NA ORDEM TEMPLÁRIA DE PORTUGAL

FERNANDO PESSOA

UMA EXISTÊNCIA É UM ATO

UM CORPO — UMA VESTE

UM SÉCULO — UM DIA

UM SERVIÇO — UMA EXPERIÊNCIA

UM TRIUNFO — UMA AQUISIÇÃO

UMA MORTE — UM SOPRO RENOVADOR

ANDRÉ LUIS

Agradecimentos

Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente na elaboração deste trabalho, e de modo especial:

- Ao meu orientador prof. Dr. Carlos Alberto Flores pelos valiosos ensinamentos e pela grande amizade e paciência dedicada nestes anos de trabalho.

- A profa. Dra. Nancy Airoldi Teixeira pela co-orientação e colaboração no tocante à parte de indução da depressão experimental nos animais utilizados neste trabalho.

- Ao prof. Dr. Sérgio Henrique Ferreira pela constante colaboração na doação de materiais, drogas e reagentes ao nosso laboratório.

- A todos os professores do Departamento de Farmacologia-FCM-UNICAMP pelo auxílio, incentivo e laboratórios sempre à disposição, em especial à Dra. Júlia Prado Franceschi, Dra. Léa Rodrigues-Simioni, Dra. Gun Birgitta, Dr. Edson Antunes e Dr. Gilberto de Nucci.

- A profa. Dra. Wirla Tamashiro pela amizade sincera e constantes incentivos e sugestões e também por manter seu laboratório sempre à disposição.

- Ao prof. Dr. Stephen Hyslop pelo empenho e boa vontade nas traduções dos textos.

- A grande amiga e irmã de todas as horas Monica Cristina Tófolli (Moniquete), pela grande amizade, incentivo, companheirismo e paciência na convivência diária.

- Aos companheiros Toninho Bento, Wellington e Sérgio pela paciência, dedicação e valioso auxílio nos ensinamentos de computação.

- Ao amigo Marcelo Muscará pela valiosa amizade, interesse e ajuda na minha formação científica.

- Ao amigo Moacir Serralvo Faria pela amizade e pelas inestimáveis conversas científicas para melhor entendimento deste trabalho.

- Aos companheiros e valiosos amigos do departamento, especialmente: Stella, Luciana (Salú), Cristina, Grace, Yoko, Sócrates, Márcia, Susana, Helô, Ivani, Sisi, Heitor.

- Aos técnicos de laboratório Silvinha, Airton e Gildo pelos auxílios técnicos e pela forma sempre amável no dia-a-dia.

- Ao técnico do Laboratório de Toxicologia Comportamental Adilson José Tomás pela amizade, dedicação e auxílio técnico, sem o qual não teríamos realizado este trabalho.

- As secretárias Solange, Gislaine, Rita e Dora pela constante colaboração e amizade.

- Aos meus pais Michel e Isler, minhas irmãs Rose e Lilian, meus sobrinhos Rodrigo, Luiza e Felipe, pelo amor, carinho e grande incentivo em todas as horas.

- Ao Francisco, pelo carinho, compreensão e paciência nas horas difíceis.

- Ao CNPq e FAEP-UNICAMP pelo auxílio financeiro.

RESUMO

A depressão é conhecida por afetar o desenvolvimento de várias funções fisiológicas, incluindo a do sistema imune. Dos vários modelos experimentais avaliados para se estudar a depressão, o Modelo de Desamparo Aprendido tem sido extensivamente utilizado.

No presente trabalho, avaliou-se a influência da depressão experimental e sua prevenção pelo tratamento com Cloreto de Lítio na resposta inflamatória, quantificando-se a migração de células mononucleares e de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos tratados ou não com LiCl.

Ratos Wistar fêmeas (pesando ±200 g) foram divididos em 3 grupos : **Grupo 1: estressados (CHE),** os quais receberam 60 choques escapáveis de 1 mA, com duração determinada pela fuga do animal e intervalos randômicos entre os choques variando de 5 a 25 seg.; **Grupo 2: deprimidos (CHI),** que receberam choques inescapáveis de mesma intensidade e densidade do grupo 1; **Grupo 3: controles (CFD)** que não receberam choques. A migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal foi avaliada 4 horas após a injeção de Carragenina (150µ g/cavidade) ou Lipopolissacarídeo de *E. coli* (100 ng/cavidade). A migração de células mononucleares foi avaliada 96h após a injeção intraperitoneal de Tioglicolato 3% (150 ou 300 mg/cavidade).

Os ratos deprimidos tiveram uma significante inibição na migração de leucócitos. Esta inibição pôde ser prevenida pelo pré-tratamento (28 dias, na água de beber) dos ratos com Cloreto de Lítio, usando metodologia que fornece níveis séricos dentro da faixa profilática utilizada na clínica.

Sugere-se que a depressão e sua profilaxia, por tratamento com Cloreto de Lítio, estão afetando a liberação de fatores quimiotáxicos, para neutrófilos e para células mononucleares, de células peritoneais residentes.

SUMÁRIO

I - INTRODUÇÃO

1.0 - Considerações Gerais da Reação Inflamatória 1

2.0 - Fenômenos Celulares da Reação Inflamatória 5

3.0 - Estresse, Depressão e Resposta Inflamatória 11

II - Objetivos 28

III - Materiais e Métodos

1.0 - Animais 29

2.0 - Modelo de Depressão e Grupos Experimentais 29

3.0 - Modelos de Inflamação 34

4.0 - Tratamento Crônico com Cloreto de Lítio 35

5.0 - Estudo *in vitro* da Liberação de Fatores Quimiotáxicos para Neutrófilos por Macrófagos Peritoneais Residentes 36

6.0 - Migração de Neutrófilos *in vivo* Induzida pelo Sobrenadante de Cultura de Macrófagos 38

7.0 - Preparação de Soluções, Drogas e Reagentes 39

8.0 - Análise Estatística 41

IV - RESULTADOS

1.0 - Efeito da Depressão Experimental Sobre a Migração de Neutrófilos para a Cavidade Peritoneal 42

2.0 - Efeito da Depressão Experimental Sobre a Migração de Células Mononucleares para a Cavidade Peritoneal 42

3.0 - Efeito do Tratamento com LiCl Sobre a Migração de Neutrófilos para a Cavidade Peritoneal 43

4.0 - Efeito do Tratamento com LiCl Sobre a Migração de Células Mononucleares para a Cavidade Peritoneal 49

5.0 - Detecção da Atividade MNCF-símile e Efeito do Aquecimento do Sobrenadante de macrófagos Peritoneais Residentes 49

6.0 - Detecção da Atividade MNCF-símile e Efeito do Aquecimento do Sobrenadante de macrófagos Peritoneais Residentes de Grupos Pré-Tratados com LiCl 53

V - DISCUSSÃO 56

VI - ABSTRACT 67

VII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 68

INTRODUÇÃO

1.0 - CONSIDERAÇÕES GERAIS DA REAÇÃO INFLAMATÓRIA:

1.1- Fenômenos Vasculares

A inflamação é um processo homeostático do organismo em resposta à uma injúria, trauma ou infecção. Esta reação resulta em prevenir a progressão da lesão, por isolar ou destruir o agente lesivo, e, posteriormente, ativar processos de reparo, retornando o organismo a sua função normal. Este processo tem característica estereotipada, pois depende mais da espécie animal ou do indivíduo, do que da natureza do agente lesivo. Estímulos físicos, químicos ou biológicos são suficientes para ativar, na área injuriada, uma série de tais fenômenos como, vasodilatação, aumento de fluxo sangüíneo, aumento de permeabilidade vascular com exsudação de plasma, migração de células sangüínea, dor e calor local. (Garcia Leme, 1980). Mesmo assim, podem ocorrer pequenas variações na resposta dependendo das características do tecido lesado, do agente lesivo e da coexistência de estados patológicos (Rocha e Silva, 1978).

Ao desencadear a reação, observa-se uma primeira fase, chamada de fase aguda. Dependendo do estímulo ser ou não persistente, a reação pode cronificar-se, ou então ocorrer a resolução do processo, com a eliminação dos agentes lesivos (Sedgwick & Willougby, 1985).

Durante o desenvolvimento da fase aguda ocorrem fenômenos vasculares e celulares que levam ao surgimento dos quatro sinais cardinais da inflamação: calor, rubor, tumor e dor, descritos por Cornelius Celsus no início da era Cristã. O quinto sinal cardinal, a perda de função do tecido ou do órgão lesado, foi proposto posteriormente por Virchow (citado em Rocha e Silva,1978).

O processo inflamatório está relacionado com o reparo do tecido lesado. Na inflamação ocorre destruição ou isolamento do agente lesivo e na reparação ocorre o restabelecimento da normalidade, sendo substituído o tecido lesado por células da mesma linhagem daquelas lesadas e/ou por células do tecido conjuntivo (tecido cicatricial). Dependendo da extensão da substituição pode haver comprometimento ou perda da função do órgão (Glynn, 1978).

Dentre os fenômenos vasculares, a vasodilatação ocorre por ação de mediadores, liberados principalmente a nível de arteríolas, entre eles a bradicinina, histamina, prostaglandinas da série E (PGE) e prostaciclinas (PGI_2), sendo esses metabólitos do ácido araquidônico os principais mediadores deste fenômeno (Hurley, 1978; Williams,1984). Por um mecanismo mediado pelo reflexo axo-axonal também pode ocorrer arteríolo-dilatação (Hua, 1986). Recentemente, tem-se sugerido, também, a participação de fatores derivados do endotélio, entre eles o óxido nítrico (NO), nas alterações vasculares do processo inflamatório. Foi demonstrado que o NO participa do controle do fluxo sangüíneo (Person et alii, 1990; Fortes et alii, 1990) e da permeabilidade vascular induzida por PAF e bradicinina (Mayhan, 1992).

O fluxo sangüíneo é aumentado na área lesada devido a dilatação e engurgitamento de capilares e arteríolas e, também, por recrutamento de novos vasos que normalmente estão hipofuncionantes. Esses fenômenos vão resultar em eritema (rubor) e elevação da temperatura local (calor) (Hurley, 1978; Williams,1984).

Simultaneamente a esses eventos ainda ocorre aumento de permeabilidade a nível venular, resultando em extravasamento de proteínas para os tecidos adjacentes da área lesada, que somado ao aumento de pressão de filtração, devido a vasodilatação, leva a formação de edema (tumor). Esse aumento de permeabilidade se deve a ação de mediadores inflamatórios sobre células endoteliais venulares, induzindo contração das mesmas com surgimento de solução de continuidade entre elas. Entre a grande extensão de mediadores citados atualmente (Williams1984; Majno,1985) destacam-se: serotonina, histamina, cininas, leucotrienos, PAF (fator ativador de plaquetas), C5a (5° componente do sistema complemento ativado) e substâncias liberadas localmente das terminações nervosas (taquicininas e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina) (Williams,1984; Brain & Williams,1985; Hua,1986). O exsudato permite a liberação de maior quantidade de mediadores de origem plasmática como a bradicinina, fatores de coagulação e componentes do sistema complemento amplificando o processo. Formam-se também fatores opsonisantes de agentes lesivos e fatores indutores de migração celular. A rede de fibrina formada no foco inflamatório impede a disseminação de agentes lesivos (principalmente bactérias) e serve de suporte para a migração celular (Williams, 1984).

Mediadores inflamatórios como a bradicinina e histamina estimulam os nociceptores provocando a dor. Nas concentrações em que são liberados, estes mediadores apenas despolarizam esses receptores. No entanto, os nociceptores estão com o limiar de excitabilidade diminuídos (hiperalgesia) por ação dos derivados do ácido araquidônico (PGE_2, PGD_2, PGI_2) e por aminas simpatomiméticas (principalmente dopamina). Drogas que bloqueiam a liberação e/ou a ação desses mediadores inibem a dor inflamatória (Ferreira,1985; Lorenzetti & Ferreira,1985; Nakamura & Ferreira, 1987). Em trabalhos recentes foi demonstrado que além do efeito direto a nível de nociceptores, a bradicinina induz a hiperalgesia mediada pelo TNF-α, que estimula a liberação das citocinas hiperálgicas IL-1 e IL-8 (Ferreira et alii, 1993).

Além dos fenômenos locais, na inflamação também ocorrem várias alterações sistêmicas chamadas de reação de fase aguda (Dinarello, 1983). Entre essas alterações está a resposta febril, da qual participam mediadores liberados no sítio da lesão inflamatória que, à nível central, alteram o centro termorregulador hipotalâmico. As citocinas IL-1, TNF-α, IFN-α e IL-6 causam febre por mecanismos dependentes da síntese/liberação de prostaglandinas (principalmente PGE_2) e/ou de CRF (fator liberador de corticotrofinas) no hipotálamo (Zampronio et alii, 1994). Por outro lado, existem citocinas que são capazes de induzir febre por um mecanismo independente de prostaglandinas. Entre elas podemos citar as monocinas MIP-1(proteína inflamatória derivada de macrófago-1; Kluger, 1991) e IL-8 (Zampronio et alii, 1994). As citocinas IL-1 e IL-6 podem, ainda, agir diretamente sobre macrófagos induzindo a liberação de ACTH, com subsequente produção de glicocorticóides, promovendo uma retro-alimentação negativa, quer por inibição da expressão gênica para síntese dessas citocinas ou por inibição da síntese de eicosanóides (Bauhmann & Gauldie, 1994; Zampronio et alii, 1994).

Outra alteração associada aos eventos sistêmicos do processo inflamatório é a elevação de níveis plasmáticos de uma série de proteínas, caracterizadas como proteínas de fase aguda (citam-se: fibrinogênio, proteína-C-reativa, componentes C3 e C5 do complemento e outras) (Bilinghan & Gordon, 1978). Essa elevação ocorre devido a uma atividade aumentada da síntese hepática, induzida por mediadores liberados de células do sistema mononuclear fagocitário (Kampschimidt, 1980; Dinarello,1984).

Esses mediadores que alteram a expressão gênica de proteínas de fase aguda, em hepatócitos, pertencem a quatro grandes categorias: ①Tipo IL-1 (IL-1α e IL-1β; TNF-α e TNF-β); ②Tipo IL-6 (IL-6, IL-11, LIF, oncostatina-M e fator neurotrófico ciliar); ③Glicocorticóides; ④Fatores de Crescimento (insulina, fator de crescimento de hepatócitos, fator de crescimento de fibroblastos). As citocinas agem como primeiros estimuladores da expressão gênica das proteínas de fase

aguda, enquanto os glicocorticóides e fatores de crescimento atuam como moduladores das ações das citocinas (Bauhmann & Gauldie, 1994).

2.0 - Fenômenos Celulares da Resposta Inflamatória

O mecanismo pelo qual o organismo se defende contra agentes lesivos e repara o tecido danificado é a resposta inflamatória celular. Quando a inflamação persiste pode ocorrer um estado patológico (doença) e, consequentemente, ser deletério para o hospedeiro, sendo que a expressão clínica depende tanto do sítio da lesão como da natureza da resposta inflamatória celular (Broide,1991).

Muitas células envolvidas nessa resposta já estão presentes nos tecidos, tais como: células endoteliais, mastócitos, células mononucleares residentes etc., enquanto outras chegam ao foco inflamatório provenientes do sangue, como os leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos, basófilos) e as células mononucleares (monócitos e linfócitos). Também participam desse processo as células do sistema linfático (células sinoviais, células dendríticas e células interdigitantes). Com participação significante na inflamação e no reparo tecidual tem-se, ainda, fibroblastos e plaquetas (Dale & Foreman, 1989).

A literatura tem mostrado que os macrófagos não só participam da fase crônica da reação inflamatória e da regulação da resposta imune, mas também do desencadeamento e da modulação de diversos eventos da fase aguda (Nathan, 1987; Unanue & Allen, 1987).

Tem sido descrito que macrófagos residentes, no início da inflamação, funcionam como células de alarme, sinalizando a presença de estímulos injuriantes nos tecidos, liberando mediadores envolvidos em várias alterações,

entre elas, a hiperalgesia e febre, e mecanismos de defesa, tais como fagocitose, migração de leucócitos e resposta imunológica (Ferreira, 1980).

Os macrófagos quando presentes nas cavidades corporais (pleura e peritônio) são chamados de macrófagos residentes, os quais tem um tempo de vida relativamente longo, variando de meses a anos. Nos diferentes tecidos, eles têm características próprias, assim são designados de maneiras diferentes, como histiócitos, células de Kupffer, micróglia, osteoclastos e células sinoviais A (Van Furth, 1982; Gordon, 1986). Nessas cavidades pode ocorrer repovoamento decorrente da migração de monócitos do sangue periférico (Van Furth, 1988). Além disso, a literatura mostra que na cavidade peritoneal, baço e linfonodo os macrófagos podem se replicar localmente, bem como, recircular como os linfócitos, migrando das cavidades para o sangue periférico e do sangue para os órgãos linfóides secundários como o baço, linfonodo e órgãos linfóides associados a mucosa (Gordon, 1986; Van Furth, 1988).

Diversos estímulos exógenos podem alterar significativamente a produção, o recrutamento e a recirculação de macrófagos para os tecidos e cavidades corporais. A injeção de algumas substâncias ou de microorganismos pode induzir um grande influxo de células para o local injetado. Estes macrófagos foram denominados de macrófagos elicitados ou inflamatórios (Van Furth, 1978). Dentre as diversas substâncias que elicitam os macrófagos na cavidade peritoneal estão: lipopolissacarídeo (LPS) de diversas bactérias, adjuvante de Freund completo e incompleto, tioglicolato (Tg), fitohemaglutinina, concanavalina A e carragenina (Cg). Sabe-se, entretanto, que a atividade funcional destes macrófagos não é igual e varia dependendo do agente inoculado (Raz et alli, 1977; Steeg et alli, 1982; Benbehani et alli, 1985; Vijayakumar et alli, 1989).

É bem conhecido que macrófagos são células altamente secretórias, tendo sido descrito mais de cem produtos derivados de macrófagos incluindo enzimas, inibidores enzimáticos, proteínas do sistema complemento, proteínas regulatórias

tipo interleucina-1 (IL-1 α e β), interleucina-6 (IL-6), interleucina-8 (IL-8), Fator de Necrose Tumoral (TNF-α), interferon (IFN-α); fatores de estimulação de colônia para granulócitos e macrófagos (CSF-G/M), hormônio adrenocorticotrófico, além de derivados do ácido aracdônico (Takemura & Werb, 1984; Werb et alli 1986; Nathan,1987). Grande parte dessas moléculas são importantes no processo inflamatório, sendo que, a secreção de muitas delas depende do estado metabólico do macrófago (Nathan, 1987). Um simples produto de macrófago pode ter diversas atividades e, uma única atividade, pode refletir a ação de várias substâncias secretadas por macrófagos (Bauhmann & Gauldie, 1994).

Experimentos realizados com IL-1 recombinante humano, mostraram que essa citocina causava migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos, por um mecanismo indireto, via liberação de um fator quimiotáxico para neutrófilo derivado de macrófagos residentes (MNCF). O pré-tratamento dos animais com glicocorticóides ou a depleção da população de macrófagos peritoniais (por lavagem da cavidade peritoneal) aboliu a migração de neutrófilos induzida pela injeção intraperitonial de IL-1 (α e β) e TNF (α e β), mas não afetou a migração induzida pela injeção de MNCF (obtida de monocamadas de macrófagos estimulados com LPS). Estes resultados indicaram que o mecanismo quimiotáxico dessas citocinas era indireto e provavelmente dependente da liberação de um fator quimiotáxico para neutrófilos por células peritoniais residentes (Faccioli et alii, 1990).

Os neutrófilos são células predominantes no início da maioria das reações inflamatórias. Com o desenvolvimento do processo, surgem progressivamente outros tipos celulares. Acredita-se atualmente, que a demora no aparecimento dos macrófagos seja devido ao fato dos monócitos (macrófagos circulantes) necessitarem de maior tempo para migrarem do que os neutrófilos (Issekutz & Lopes, 1993).

São várias as substâncias que induzem migração de leucócitos recrutando-os da microcirculação para o espaço extravascular, por aumentar a adesão destas células à parede do endotélio. Uma vez aderidos, os leucócitos passam por entre as junções das células endoteliais (diapedese), deslocando-se através da membrana basal do vaso, até atingirem o foco de lesão (Harkness,1981). Essas substâncias que induzem migração são chamadas de fatores quimiotáxicos. Esses fatores podem ser liberados pelas células quando estimuladas (p. ex. no processo inflamatório) sendo considerados como fatores endógenos, entre os mais importantes temos: IL-1, IL-8, TNF, LTB_4, IFN, linfocinas, C5a, peptídeos liberados por macrófagos e outros (Smith et alli, 1980; Ming et alii, 1987; Cybulsky et alii,1986; Ribeiro et alii, 1990; Faccioli et alii, 1990; Ribeiro et alii,1991). Os fatores quimiotáxicos também podem induzir migração indiretamente através da liberação e/ou ativação dos fatores quimiotáxicos endógenos. Entre estes estão os chamados fatores exógenos (Carragenina, Tioglicolato, Endotoxinas bacterianas, como o LPS). O peptídeo N-Formil-L-Metionil-L-Leucil-L-Fenilalanina (FMLP), embora seja um fator exógeno, é capaz de agir diretamente no neutrófilo, ativando seus mecanismos de aderência e locomoção (Cunha et alii 1988; Souza et alii, 1988; Sedwick & Willoughby, 1989; Wilkinson, 1989).

Têm-se demonstrado que a adesão de leucócitos à parede do endotélio vascular envolve uma série de processos complexos de interações específicas entre moléculas de adesão complementares, presentes nos leucócitos e nas superfícies das células endoteliais (Harlan,1985; Bevilacqua et alii, 1989; Osborn, 1990; Mackay & Imhof, 1993).

Uma classificação recente das moléculas de adesão quanto a sua estrutura molecular compreende um conjunto de três diferentes famílias de acordo com suas homologias estruturais: ① a família das selectinas; ② a família das integrinas e ③ a superfamília das imunoglobulinas (Cronstein & Weissman, 1993).

Destacam-se na família das selectinas: a L-selectina, a E-selectina (ELAM-1: Endothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1) e a P-selectina/GMP 140. A L-selectina é constitutivamente expressa por todos os leucócitos e células da medula óssea, desaparece dos leucócitos assim que se inicia a adesão firme destes ao endotélio. A ELAM-1 é expressa somente pelas células endoteliais, horas após ativação com LPS, TNF ou IL-1. Desaparece dentro de um período de 24 horas após a ativação e determina a adesão de monócitos e neutrófilos ao endotélio. A P-selectina se expressa principalmente em células endoteliais minutos após ativação com trombina, histamina e substância P, e nas plaquetas após estímulo trombótico. As citocinas não induzem sua expressão. Geralmente as selectinas se ligam à carboidratos contendo ácido siálico, como sialil Lewis^x (sLex). As selectinas P e E do endotélio podem se ligar a carboidratos contendo sLex ligado a L-selectina dos leucócitos (Carlos & Harlan,1990; McEver, 1991; McEver,1992; Mackay & Imhof, 1993).

As integrinas são glicoproteínas heterodiméricas constituídas de duas cadeias, α e β, associadas. Participam da interação do neutrófilo com o endotélio e também da ligação de receptores da superfície de neutrófilos na estrutura da fibronectina (Smith et alii, 1988; Brown & Goodwin, 1988.). As integrinas são divididas em três subfamílias principais: β_1, β_2 e β_3. As β_2 são exclusivas de leucócitos e têm um importante papel na sua interação com o endotélio. Na subfamília β_1 existe a integrina VLA-4 (Very Late Antigen-4), importante na interação leucócito-endotélio, principalmente para linfócitos e monócitos (Hynes, 1987; Smith et alii,1988; Hogg,1989; Osborn, 1990; Carlos & Harlan,1990). Essas sub-famílias também estão envolvidas na adesão dos leucócitos às células endoteliais, através da interação com moléculas pertencentes a super-família das imunoglobulinas (Smith et alii, 1988).

A importância fisiológica das integrinas na mediação da adesão entre neutrófilos e endotélio foi demonstrada em indivíduos que apresentam síndrome de deficiência de adesão de leucócitos, nos quais a expressão dessas

glicoproteínas na superfície dos neutrófilos é anormal, alterando a adesão e a migração desses leucócitos (Mackay & Imhof, 1993), ocasionando nestes indivíduos uma maior susceptibilidade à infecções.

Constituindo a superfamília das imunoglobulinas tem-se as ICAMs (Intercellular Adhesion Molecules), as VCAMs (Vascular Cell Adhesion Molecules) e as PECAMs (Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecules), sendo que ICAM-1, ICAM -2 e VCAM-1 são expressas no endotélio e em outros tipos celulares como os fibroblastos. A ICAM-3 é encontrada principalmente nos linfócitos-T, monócitos e neutrófilos e sua expressão é aumentada por mitógenos, sugerindo um envolvimento na resposta imune. A ICAM-1 pode ser induzida por IFN-γ, IL-1, TNF e LPS. A expressão de ICAM-2 não é aumentada por citocinas. Encontra-se VCAM-1 no endotélio, que é induzida pelos mesmos mediadores que induzem ICAM-1, sendo que sua expressão basal é menor do que ICAM-1 (Staunton et alii, 1990; McEver, 1992).

Utilizando-se várias condições experimentais concluiu-se que os diversos eventos envolvidos na migração celular seguem basicamente os seguintes passos:

1°- deslizamento (rolling) dos leucócitos pela parede do vaso, através de interações de baixa afinidade entre leucócitos e células endoteliais, envolvendo a expressão de moléculas de adesão endotelial (selectinas e integrinas), induzida por diversas citocinas;

2°- ativação dos leucócitos por ação de agentes quimiotáxicos ou integrinas;

3°- adesão de alta afinidade devido à mudança conformacional do leucócito por ação das integrinas;

4°- migração dos leucócitos do lúmem vascular para o espaço extravascular (Smith et alii 1988; Bevilacqua et alii, 1989; Smith et alii, 1991; Mackay & Imhof, 1993).

O aparecimento dos diferentes tipos celulares no local da inflamação pode ser devido, em parte, à modulação gradativa da expressão das moléculas de adesão ao longo do tempo. Por exemplo, o aumento da expressão de ICAM-1 e VCAM-1 após a expressão de ELAM-1, tornaria o endotélio menos adesivo para neutrófilos e mais adesivo para monócitos e linfócitos. Nessa situação, as células endoteliais e/ou macrófagos residentes liberariam citocinas quimiotáticas, tais como, proteína quimiotática para monócitos (MCP-1) e IL-8, que atuariam, respectivamente, sobre monócitos e linfócitos, desencadeando a migração, explicando dessa forma o surgimento tardio das células mononucleares no foco da inflamação (Cronstein & Weissman, 1993).

3.0 - Estresse, Depressão e Resposta Inflamatória

O termo estresse tem sido usado de maneira vaga e indiscriminada para caracterizar situações de desvio da normalidade, às vezes referindo-se ao conjunto de reações de um indivíduo, às vezes a condições (por exemplo, estresse físico, químico ou psicossocial) determinante de tais reações. Neste trabalho o termo é utilizado para significar o conjunto de reações do indivíduo em resposta a um estímulo, quer seja físico, químico ou psicossocial, no sentido de restabelecer seu equilíbrio fisiológico (homeostase).

Tem sido demonstrado que a natureza e(ou) intensidade do estímulo estressor, assim como as características biológicas e psicossociais do indivíduo, podem determinar um padrão específico de reação (Stein et alii, 1985). Os autores citam, por exemplo, que estímulos como falar em público ou exercício

físico produzem, ambos, aumentos nas concentrações plasmáticas de noradrenalina e adrenalina. No entanto, a concentração de noradrenalina é maior do que a de adrenalina no exercício, enquanto que a de adrenalina é muito maior durante a experiência de falar em público. Outro exemplo, a resposta de produção de anticorpos, em ratos, é diferente, dependendo do sexo do animal (Stein et alii, 1985). Entretanto, a resposta a estímulos estressores pode envolver várias etapas finais comuns, incluindo aumento da secreção adrenocortical, com liberação de glicocorticóides (GCs), e ativação do sistema nervoso simpático (terminações nervosas periféricas e medula da adrenal), com liberação de catecolaminas (Chrousos, 1995).

A liberação de corticóides da córtex adrenal é estimulada pelo ACTH (hormônio adrenocorticotrófico). Este, por sua vez, é liberado pela ação do fator liberador de corticotrofina (CRF), o principal regulador fisiológico de sua secreção e de opióides endógenos e outros derivados peptídicos da hipófise anterior (Dantzer & Kelley, 1989; Panerai, 1992). O CRF é o mediador químico predominante pelo qual o SNC controla a atividade do eixo hipófise-adrenal, sendo o responsável pela orquestração da resposta endócrina no estresse (Shavit et alii, 1990). Muitos autores sugerem fortemente que o CRF não integra somente respostas endócrinas mas também autonômicas, imunológicas e comportamentais nos organismos mamíferos durante o estresse. Neurônios liberadores de CRF inervam neurônios noradrenérgicos centrais e vice-versa (Chrousos, 1995). Uma atividade neuronal liberadora de CRF inapropriada pode manifestar-se como diversos distúrbios psiquiátricos, incluindo desordens afetivas, ansiedade e anorexia nervosa, além de doenças neurológicas como a doença de Alzheimer (Owens & Nemeroff, 1991). Recentemente, tem sido demonstrado que o CRF está envolvido, também, na resposta febril, um importante sinal sistêmico de reações inflamatórias. Zampronio e colaboradores (1994) mostraram que a atividade pirogênica da IL-8 dependia da liberação de CRF, pois a febre induzida por esta citocina podia ser bloqueada por um antagonista específico, o CRF_{9-41} em a-hélice. Sugeriu-se que essa atividade era independente da liberação de

prostaglandinas e estava associada com a estimulação simpática e aumentos na taxa metabólica e na termogênese em tecido adiposo marrom (Rothwell, 1990; Zampronio et alii, 1994).

Durante anos acumularam-se muitas evidências mostrando que o SNC interage com o sistema imune e pode modular a atividade de vários de seus elementos. Essa intersecção entre estes dois sistemas está comumente envolvida na regulação da defesa do hospedeiro. Muito do interesse envolvendo o CRF e o sistema imune resultou de longas observações de que no estresse ocorre, na maioria da vezes, depressão da resposta imune, celular e humoral, tanto em animais como em seres humanos (Owens & Nemeroff,1991).

A administração central de CRF diminui a citotoxicidade das células natural killer (NK), sendo este efeito bloqueado pela administração central de seu antagonista competitivo, o CRF_{9-41} de α hélice (Irwin et alli, 1987). Esta ação foi observada logo aos 10 minutos após a injeção e persistiu por cerca de 60 minutos. No entanto, a concentração de corticosterona plasmática permaneceu elevada por algum tempo. Isto sugeriu que esta ação não era mediada por GCs. Além disso, essa redução na atividade das células NK foi também observada após a indução de estresse por choque elétrico na pata de animais, podendo ser bloqueada por administração central de antisoro anti-CRF (Shavit, 1990; Owens & Nemeroff, 1991). Além dos efeitos sobre o SNC, foi demonstrado que o CRF era capaz de inibir as alterações vasculares de reações inflamatórias de origem neurogênica ou causada por estímulo térmico, por um mecanismo independente de ACTH, b-endorfina ou glicocorticóide, sugerindo-se uma ação direta sobre células endoteliais (Owens & Nemeroff, 1991)

Smith e colaboradores (1986) reportaram que o CRF estimula a liberação de ACTH e β-endorfinas de leucócitos. Este efeito foi bloqueado pelo glicocorticóide sintético dexametasona, sugerindo que o CRF e o gene da pró-

opiomelanocortina podem ser expressos em leucócitos (Smith et alii, 1986; Owens & Nemeroff, 1991).

Esses resultados, em conjunto, sugerem uma possível ação periférica para CRF, ACTH e opióides endógenos, com papel modulador local de reações inflamatórias e imunes.

As reações inflamatórias são profundamente afetadas tanto por fibras simpáticas aferentes como por fibras eferentes e pela glândula adrenal (Chrousos, 1995). A inflamação pode ser entendida, também, como um estímulo estressor. Há muito se sabia que na vigência de um processo inflamatório prévio, o desenvolvimento de outro, posterior, era bastante afetado. Em um dos trabalhos pioneiros, realizados em nosso País, demonstrou-se que a administração prévia (2,5 h de antecedência) de carragenina em uma das patas traseiras de ratos inibia marcadamente a reação inflamatória induzida pela injeção do mesmo estímulo na pata contra-lateral. Esta atenuação não foi observada em animais adrenalectomizados (Garcia-Leme & Shapoval, 1975), sugerindo que um aumento na concentração endógena de GCs e(ou) catecolaminas, teria um papel modulador sobre o desenvolvimento do processo inflamatório (Garcia-Leme, 1985).

O mesmo racíocinio pode ser ampliado para o controle da resposta imune. A IL-1 quando liberada por macrófagos estimula a síntese de IL-2 em linfócitos. A IL-2 se liga a linfócitos T e estimula a proliferação celular. Os GCs inibem a produção de IL-1 e, também, de IL-2. A supressão destes dois fatores representam duas vias pelas quais os GCs podem inibir a proliferação e expansão clonal de linfócitos, modulando a intensidade da resposta imune (Munck et alii, 1984).

O papel dos GCs na resposta inflamatória é extremamente complexo e não totalmente entendido (Blalock et alii, 1985; Derijk & Berkenbosch, 1991). Seu

efeito antiinflamatório está relacionado a sua capacidade de afetar o desenvolvimento de eventos vasculares e celulares da reação inflamatória, alterando tanto a produção e liberação de mediadores específicos da inflamação, como a função de células responsáveis pelo desenvolvimento de uma resposta adequada (Chrousos, 1995). Entre os vários mecanismos propostos, além da capacidade de induzir a liberação de lipocortinas, estão as alterações dos níveis de nucleotídeos cíclicos intracelulares, da fluídez da membrana e da permeabilidade de canais iônicos, eventos que ocorrem precocemente para que ocorra síntese de proteínas de novo e que podem diretamente afetar a resposta celular (Goldstein et alii, 1992).

Atualmente um crescente número de evidências indicam que certos estressores psicológicos, como doenças graves em familiares, separação entre casais, luto e doenças psiquiátricas, como a depressão, podem estar associados ao desenvolvimento e(ou) progressão de doenças físicas (Stein, 1989). A maioria dos trabalhos mostra que nessas condições tanto a resposta imune celular como humoral estão reduzidas, sugerindo uma forte ação do SNC sobre o sistema imune (Calabrese et alii, 1987; Stein, 1989; Weiss et alii, 1989). Mais interessante, ainda, é a possibilidade de que mediadores derivados de células do sistema imune, principalmente macrófagos, possam estar envolvidos na gênese/manutenção de desordens afetivas, principalmente, na depressão (Smith, 1991a,b). A sugestão de que a secreção excessiva de monocinas, tais como IL-1, IFN-α e TNF-α , seria causadora de depressão, é baseada em algumas observações, tais como: 1) voluntários normais apresentam sinais e sintomas de depressão maior após administração dessas citocinas; 2) IL-1 desencadeia as alterações hormonais observadas na depressão; 3) doenças ou intercorrências nas quais sabidamente macrófagos desempenham um papel fundamental, como em vários casos de cancer, são acompanhadas de altas taxas de depressão; 4) a terapia com antidepressivos triciclicos é capaz de normalizar a concentração e os ciclos hormonais em pacientes deprimidos; 5) o tratamento profilático com carbonato de lítio não apenas previne o aparecimento da depressão como

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

estimula o sistema imune e 6) células microgliais podem secretar citocinas (Smith, 1991a,b).

A busca de modelos animais para um melhor entendimento da interrelação entre alterações psicológicas e(ou) doenças psiquiátricas e os sistemas de defesa do organismo tem sido bastante estimulada.

Já foi reportado que fatores estressores incontroláveis produzem altos níveis de corticosteróides circulantes, muito mais do que estressores controláveis (Landenslager et alii, 1983; Restak,1989), embora existam dados contraditórios mostrando que animais submetidos cronicamente a situações estressoras (seções de choques escapáveis e inescapáveis, por 4 dias consecutivos) falharam em mostrar diferenças na reatividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (níveis de corticosterona e ACTH plasmáticos) e do sistema imune (respostas imunes humoral e mediadas por células). A possibilidade de que ocorreu uma adaptação do eixo HHA e do sistema imune à repetidos estímulos estressores, pode ser considerado neste caso, pois as consequências fisiológicas e comportamentais ao estímulo estressor dependem de uma interrelação entre o ambiente e fatores individuais (Sandi et alii, 1992).

Outras observações reforçaram o papel modulador da adrenal sobre o desenvolvimento de reações inflamatórias de origem imune ou não. Foi observado que macrófagos peritoneais obtidos de animais adrenalectomizados liberam concentrações maiores de mediadores pró-inflamatórios, tais como, IL-1 e PGE_2, que aqueles obtidos de animais falso-operados (Perreti et alli, 1989). Animais adrenalectomizados também apresentaram concentrações de $PGF_{1\alpha}$, TxB_2 e LTB_4 cerca de 2 a 4 vezes maiores que a de seus controles (Flower et alli, 1986; Boschetto et alli, 1993). Além desse efeito sobre a síntese e liberação de mediadores inflamatórios foi demonstrado que as alterações vasculares em resposta a administração de PAF (fator de agregação plaquetária), por exemplo, estavam potenciadas em animais submetidos a adrenalectomia (Boschetto et alli,

1993). Resposta semelhante a adrenalectomia foram obtidas pelo tratamento de animais com RU 486, um antagonista competitivo dos GCs (Laue et alii, 1988).

Em resposta a injeção de carragenina, tanto na cavidade peritoneal como na pleural, animais adrenalectomizados apresentam uma resposta de migração de neutrófilos e de aumento da permeabilidade vascular potenciada, em relação aos animais falso-operados (controles). A reposição, em níveis fisiológicos, de GCs restabelece o padrão normal de resposta, enquanto que a sua administração, em doses farmacológicas, bloqueia a reação inflamatória aguda por inibir tanto a migração de neutrófilos como a síntese de ecosanóides (Flower et alli, 1986; Laue et alli, 1988). Paradoxalmente, tem sido demonstrado que a resposta migratória de monócitos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina ou tioglicolato é significativamente reduzida em animais adrenalectomizados. Essa inibição foi revertida pelo tratamento de reposição de GCs (Heluy Neto, 1994). No entanto, a maioria das evidências sugere que a terapia com GCs inibe tanto a migração para o foco de lesão como a atividade citotóxica de células fagocíticas (Goldstein et alii, 1992).

Entre os muitos mecanismos inibitórios dos GCs atribui-se papel destacado a inibição da produção de eicosanóides, por indução da síntese de uma família de proteínas chamadas lipocortinas, pertencentes a uma superfamília de proteínas dependentes de cálcio, as chamadas anexinas (Flower, 1988; Peers et alii, 1993). Essas proteínas possuem atividade antifosfolipase A_2, reduzindo, assim, a biossíntese de eicosanóides (prostaglandinas e leucotrienos) e PAF (Flower,1990). Entretanto, a administração de lipocortina purificada, embora capaz de inibir o edema de pata de rato induzido por carragenina, não foi capaz de alterar a resposta edematogênica da dextrana. Por outro lado, o tratamento com GCs era efetivo em ambos os modelos de inflamação. Assim, a indução da formação de lipocortinas não é a única ação antiinflamatória dos GCs (Goldstein et alii, 1992).

Outro efeito dos GCs é a inibição da liberação e/ou da ação de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, IL-6, IL-8 e TNF (Blalock et alii,1985; Waage et alii, 1990). Essas citocinas estão envolvidas em várias etapas da reação inflamatória, incluindo alterações vasculares, quimiotaxia de leucócitos, febre, dor e síntese/ liberação de proteínas de fase aguda (Ribeiro et alii, 1991; Ferreira et alii, 1993; Bauhmann & Gauldie, 1994; Zampronio et alii, 1994).

Várias citocinas pró-inflamatórias, especialmente IL-1 e IL-6, podem ativar o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. A IL-1 estimula a secreção de ACTH pela glândula hipofisária anterior, por agir diretamente sobre a glândula ou por estimular a liberação de CRF de células hipotalâmicas (Lumpkin, 1987; Cunningham & De Souza, 1993). A neurosecreção de CRF é estimulada pela injeção sistêmica de IL-1 e IL-2, mas não por TNF-α ou IFN-γ (Owens & Nemeroff, 1991). Dessa forma, pode ser estabelecida uma alça de controle negativo: estímulo inflamatório, secreção de IL-1, secreção de CRF/ACTH, liberação de GCs, inibição da secreção de IL-1(e outras citocinas) e da progressão da resposta inflamatória.

A maioria dos trabalhos realizados com animais de experimentação, para demonstrar o efeito do estresse sobre a resposta imune, utiliza um protocolo envolvendo exposição do animal a situações estressoras tais como, choques escapáveis e inescapáveis (Laudenslager et alii, 1983; Weiss et alii, 1989; Amat et alii, 1993), natação forçada (teste de Porsolt); (Peeters & Broekkamp, 1994), substâncias de sabor aversivo (Peeters & Broekkamp, 1994) e ruídos de alta intensidade (Laudenslager et alii, 1983), em roedores, e separação de mãe e filhote ou de casais, realizados com macacos (Laudenslager et alii, 1983; Willner, 1990). O resultado mais comum é que a exposição aguda a essas diversas situações estressoras causa imunussupressão. Avalia-se, predominantemente, em um protocolo ex vivo, citotoxicidade e proliferação de linfócitos; variações de contagens, fagocitose e citotoxicidade de neutrófilos; produção de citocinas, principalmente IL-1 e interferons, e de anticorpos; distribuição de células T-helper

e razão helper/supressor (Weiss et alii, 1989). Entretanto, existem resultados mostrando aumento ou supressão da resposta blastogênica de linfócitos a concanavalina A, dependendo da intensidade e do tempo de exposição ao estímulo estressor (Amat et alii, 1993). Uma importante questão é: são as alterações celulares do sistema imune encontradas in vitro, indicadoras de alterações na suceptibilidade dos organismos a doenças? Relativamente poucos estudos envolvendo a resposta imune e o desenvolvimento de doenças, in vivo, existem. Amat e colaboradores demonstraram que a resposta produtora de anticorpos a um antígeno estava deprimida, enquanto que reação de rejeição a células do carcinoma de Walker estava aumentada em ratos submetidos ao choque intermitente das patas por 4 dias concecutivos (Amat et alii, 1993). Portanto, o mesmo estímulo estressor pode afetar diferentemente a imunidade humoral e celular.

Diversos trabalhos vem tentando explicar a interação neuroimune. Um desses trabalhos se baseou na observação dos efeitos benéficos da aplicação de luz artificial na depressão, sugerindo uma possível participação da glândula pineal. Esta glândula capta informações básicas do ambiente (luz, temperatura) e as transmite em sinais que modulam alguns mecanismos neuroendócrinos, seguido pela síntese e secreção de melatonina. Este processo segue o ritmo circadiano, pois na maioria dos animais a melatonina é sintetizada e liberada nas horas de escuro (durante a noite), portanto alterações neste rítmo são associadas a distúrbios do sono, ansiedade e depressão (Restak, 1989). Além disto, desordens afetivas e psicológicas que exibem uma maior incidência de infecções, câncer e imunossupressão estão relacionadas com baixos níveis de melatonina. O aumento de secreção de corticosteróides, observado no estresse e na depressão, inibe a síntese de melatonina (Restak, 1989). Portanto, a secreção de corticosteróides tem sido considerado um mecanismo de modulação da imunidade induzido por fatores estressantes e por doenças (Stein, 1989).

A regulação da função imune em resposta ao estresse, no entanto, pode não ser limitada ao efeito modulador por corticosteróides ou outros mediadores derivados da adrenal. Experimentos realizados com animais adrenalectomizados demonstram que a linfopenia induzida por estímulo estressor foi dependente da adrenal, enquanto que a estimulação de linfócitos foi independente. Estes achados indicam que a modulação da imunidade no estresse é um fenômeno complexo envolvendo alguns, se não múltiplos, mecanismos. Alterações nos níveis de hormônios da tireóide, pineal, hormônio de crescimento, opióides endógenos e esteróides sexuais têm sido associadas ao estresse e envolvidos na modulação da função imune (Stein, 1989; Parker et alii, 1992).

A incapacidade do estresse em adaptar-se ao estímulo inicial e manter a homeostase pode ser o divisor de águas entre os estados de normalidade e do aparecimento de doenças físicas ou mentais, incluindo a depressão (Biondi & Pancheri, 1991; Smith, 1991a,b). A depressão está associada a ativação do eixo HHA. Elevação persistente na concentração plasmática de cortisol, não responsiva ao controle negativo da administração de dexametasona, tem sido encontrado em pacientes severamente deprimidos (Tecoma & Huey, 1985). Uma correlação positiva entre concentração elevada de cortisol, depressão e imunossupressão tem sido sugerida (Tecoma & Huey, 1985; Smith, 1991a,b). Além disso, tem sido demonstrado que drogas utilizadas no tratamento e prevenção da depressão são, também, imunoestimuladoras e normalizam os desvios nas concentrações hormonais, incluindo corticóides (Smith, 1991b).

3.1 - MODELO DE DEPRESSÃO EXPERIMENTAL

Nos últimos 20 anos tem-se expandido muito a procura por modelos animais para o estudo de doenças mentais, em especial da depressão. Os primeiros estudos realizados na busca de um modelo experimental para a depressão envolviam modelos farmacológicos que se baseavam em interações

entre antidepressivos e drogas que induziam a uma sintomatologia semelhante a depressão.

Porém, já na década de 70 e início da década de 80, alguns trabalhos condenavam a validade dos modelos farmacológicos no estudo da depressão. Por exemplo, os modelos não identificavam novas drogas antidepressivas que diferiam estruturalmente dos antidepressivos tricíclicos e inibidores da monoamina-oxidase (IMAO); dentre estas drogas estava o trazodone (Silvestrini, 1982).

A suspeita de que condições ambientais seriam um fator precipitante nas depressões endógenas (LLoyd, 1980) fez com que os pesquisadores direcionassem seus estudos para modelos animais não estruturados no uso de drogas (Anisman & Zacharko, 1982).

Apartir desse momento, a psicologia experimental passou a ter um papel importante no desenvolvimento de modelos animais de depressão pois se buscava, a nível experimental, modificações no ambiente que induzissem sinais ou sintomas e alterações bioquímicas e/ou comportamentais nos animais, semelhantes àquelas causadas pela depressão endógena em humanos.

Análises criteriosas dos modelos experimentais verificaram que o modelo de Desamparo Aprendido, utilizado neste trabalho, era potencialmente útil, preenchendo os critérios para um modelo animal de indução da depressão (Seligman, 1975; Willner, 1990). O modelo consiste basicamente em se instalar no animal uma não contingência entre seu comportamento e o término do estímulo aversivo. Acredita-se que o desamparo acarreta um déficit motivacional, cognitivo e emocional no animal (Seligman, 1975). Este efeito se mantém por até uma semana após a sessão de choques (Seligman, 1975; Willner, 1986). Foram descritos os seguintes aspectos para caracterizar o Desamparo Aprendido em animais (Weiss et alii, 1982): ① Desempenho fraco em tarefas que requer comportamento ativo; ②Diminuição no consumo de alimentos e água; ③Perda de

peso; ④Perda de comportamentos habituais como "limpeza" e "brincadeiras"; ⑤ Alterações nas fases do sono.

Esses aspectos observados em animais submetidos ao Desamparo Aprendido apresentam estreita correspondência com a sintomatologia de pacientes humanos com depressão endógena (**ver tabela 1**; Diagnostic and Statistical Manual of Psychiatric Disorders, 1980; Willner, 1986), entre eles a elevação dos níveis séricos de corticosteróides neste modelo (Nelson & Charney, 1981). Além disso, muitos trabalhos comprovam a sensibilidade do modelo aos tratamentos clinicamente eficazes nos casos de depressão (Willner, 1986; Willner, 1990).

Tabela 1: Comparação entre a sintomatologia de pacientes com depressão endógena e os efeitos observados em animais após a indução da depressão experimental pelo método do Desamparo Aprendido.

PACIENTE DEPRIMIDO	DESAMPARO APRENDIDO
1- Alterações psicomotoras e/ ou menor energia ou cansaço - Indecisão e diminuição da capacidade de pensar (pensamento lento) - Inadequação de sentimentos (auto-estima baixa)	1- Diminuição do rendimento em tarefas que requerem comportamento ativo
2- Alterações do apetite	2- Diminuição no consumo de água e alimentos
3- Alterações de peso	3- Perda de peso
4- Drástica redução no interesse das atividades do dia-a-dia	4- Diminuição no comportamento agressivo e de rivalidade - Diminuição do comportamento normal como "brincadeiras" e "limpeza"
5- Alterações no padrão de sono	5- Alterações no padrão de sono
6- Responsividade ao tratamento com drogas antidepressivas	6- Responsividade ao tratamento com drogas antidepressivas

Apesar do estabelecimento do modelo de depressão e de um número relativamente grande na literatura de trabalhos mostrando o efeito sobre a resposta imune, in vitro, e o potencial envolvimento de citocinas no controle do sistema neuro-endócrino-imune, pouco se sabe ainda sobre os efeitos da depressão e seu tratamento sobre a resposta inflamatória aguda inespecífica, *in vivo*.

3.2 - CLORETO DE LÍTIO E RESPOSTA INFLAMATÓRIA

O lítio é a droga de escolha para tratamento da desordem bipolar (mania e depressão), sendo também útil em outras doenças psiquiátricas ou não. Suas ações a nivel de SNC ainda não são bem conhecidas, mas sabe-se que a nível celular há envolvimento do sistema de segundos mensageiros (fosfoinositol e adenilato ciclase), hormônios e neurotransmissores (Klemfuss, 1992).

O lítio é o 3° elemento da tabela periódica dos metais alcalinos, como o sódio, o potássio, o rubídio e o césio. É naturalmente encontrado na água do mar (0,03 mM) e nos tecidos de mamíferos em concentrações que variam de 0,001 a 0,01 mM, dependendo da concentração de lítio na alimentação e na água. Estudos nos quais animais tem sido restringidos de lítio na dieta, indicam que ele pode ser um elemeto essencial no metabolismo celular (Anke et alli, 1991).

Administrado oralmente na forma de sal (cloreto, carbonato), o lítio é rápida e completamente absorvido no trato gastrointestinal na forma de íon, atingindo um pico, no plasma sanguíneo, em 3 horas, em homens e animais experimentais. Ele se distribui lentamente para outros tecidos, atingindo níveis máximos no fluido cérebro-espinhal no homem de 6 a 8 horas após a administração oral (Klemfuss, 1993).

Alguns autores citam os efeitos do lítio na estimulação de células sanguíneas brancas, sugerindo que ele pode ter alguma importância no tratamento de desordens hematológicas por aumentar a granulopoiese e assim induzir neutrofilia (Shuit & Krebs, 1982; Prakash, 1985). São sugeridos dois mecanismos: uma ação direta sobre células pluripotentes ou uma inibição da atividade de linfócitos-T supressores sobre a hematopoiese (Barr & Galbraith, 1983).

Há evidências de que um possível mecanismo de aumento de granulopoiese, induzida por terapia com lítio, esteja relacionado com aumento na produção de fator estimulador de colônia de granulócitos e monócitos na medula óssea, tanto *in vitro* como *in vivo*, efeito este, dose-dependente (Tisman et alli, 1973; Bille et alli, 1975; Anderson et alli, 1982). Por outro lado, o lítio pode inibir a eritropoiese (Prakash, 1981).

Existem relatos de casos de anemia em paciente sob terapia com lítio, demonstrando que este pode estar inibindo a eritropoiese. Em alguns pacientes,a anemia megaloblástica, devido a deficiência de folato, parece estar claramente relacionada com a terapia com lítio (Prakash et alli, 1981).

O efeito mais característico do lítio nas células brancas do sangue é o aumento de neutrófilos, sendo menos uniforme no número de eosinófilos, monócitos e linfócitos, podendo estes estarem diminuídos, aumentados ou permanecer inalterados (Prakash, 1985). Alguns autores tem descrito que esses achados não são observados clinicamente em humanos (Prakash, 1985), outros suportam esses efeitos com resultados clínicos em que a terapia com lítio bloqueia a neutropenia induzida por agentes quimioterápicos administrados a pacientes com câncer (Lyman et alli, 1981; Richman et alli, 1984).

Um mecanismo proposto para o aumento da granulocitose pelo lítio é por aumentar a transcrição de RNAm para TNFα, com decorrente aumento na

produção e secreção de TNFα por monócitos, sendo que o TNFα pode estimular células endoteliais a produzirem fator estimulador de colônias de granulócitos e monócitos (CSF-G/M) (Kleinerman et alli, 1989).

Outros estudos sugerem que o lítio pode estimular diretamente a função de leucócitos,especialmente a motilidade de neutrófilos e a transformação de linfócitos induzida por mitógenos (Anderson et alli, 1982). O lítio também age reduzindo os níveis elevados de AMPc intracelular, levando a normalidade de locomoção dos leucócitos polimorfonucleares; isto porque, quando os níveis de AMPc estão aumentados ocorre uma deficiência na locomoção normal de leucócitos polimorfonucleares. Células normais tratadas com lítio não tiveram sua motilidade afetada (Anderson et alli, 1982).

Friedenberg & Marx (1980), descreveram que o lítio causa aumento no número de leucócitos mas diminui sua capacidade bactericida. O mecanismo do efeito do lítio na função fagocítica ainda não está claramente definido, mas parece estar relacionado com a diminuição de níveis elevados de AMPc, induzindo a normalização da atividade fagocítica, pois altos níveis de AMPc ocasiona atividade anormal de leucócitos (Perez et alli, 1980).

Devido a estes efeitos, grande parte dos pesquisadores sugerem que o lítio controla o risco de infecção. Em contradição,Turkozan e colaboradores (1993), propoem que o lítio causa enfraquecimento dos mecanismos de defesa de pacientes com infecção decorrente da diminuição da atividade de enzimas importantes que participam do burst respiratório celular durante a infecção.

Também tem sido proposto que o efeito terapêutico desta droga pode derivar da inibição da hidrólise de fosfatidilinositol, resultando na inibição de inositol monofosfatase, o que causa depleção de inisitol, que por sua vez depleta fosfoinositol (Berridge et alli, 1982). Esta ação pode ser paticularmente importante no cérebro, pois este tem pouca facilidade em sintetizar inositol (Berridge et alli,

1982). O fosfatidilinositol é um importante componente da membrana celular, podendo então, o lítio interferir com a composição das membranas do cérebro (citado em Klemfuss, 1992; Jope & Williams, 1994). Tanto *in vitro*, como *in vivo*, o lítio interfere com a ação do adenilato ciclase que cataliza a produção de AMPc (adenosina monofosfato cíclica) em resposta a ativação de receptores como os β-adrenérgicos (Klemfuss, 1992)

Recentes observações demonstram que o lítio afeta funções de proteína-G, a expressão de genes, a fosforilação proteica e outros processos que podem ter longo alcance nas funções celulares totais (Jope & Williams, 1994).

Beyaert e colaboradores (1993), propõem que o lítio aumenta a citotoxicidade de algumas linhagens de células, tais como L929. Sabendo-se que o lítio inibe fosfatidilinositol, os autores sugerem um envolvimento do metabolismo de inositol na citotoxicidade do TNF. Neste sentido, demonstram que o aumento da citotoxicidade do TNF por LiCl é de fato relacionado com a acumulação de fosfatidilinositol mediada por fosfolipase-C em células tratadas com TNF + LiCl.

O lítio pode também aumentar a produção de IL-2 de células mononucleares por um mecanismo envolvendo a diminuição intracelular dos níveis de AMPc no sistema do adenilato ciclase (Wu & Yang, 1991; Kucharz et alli, 1993).

Estudos usando a toxina colérica, a qual pode aumentar os níveis intracelulares de AMPc, mostram uma diminuição da atividade de células Killer ativadas por linfocinas (LAK). No entanto, o lítio reverte parcialmente este efeito inibitório, indicando que ele aumenta a atividade de células LAK por diminuir níveis de AMPc (Jones et alli, 1990; Wu & Cai, 1992). O lítio também aumenta os níveis de RNAm para TNFα quando células LAK são estimuladas por IL-2, resultando em um forte efeito inibidor no cresciemnto de tumor (Wu & Cai, 1992).

Resultados de dois estudos em pacientes com desordens psiquiátricas indicam que a terapia com lítio foi acompanhada por um aumento nos níveis de cortisol plasmático, outros resultados revelaram que esta terapia não estava associada com alterações na função adrenocortical (citado em Barr & Galbraith, 1983). Voluntários sem desordens psiquiátricas que usaram doses terapeuticas de lítio, apresentaram uma redução nos níveis de cortisol no início da manhã, mas não apresentaram outras alterações. Sugerindo que o lítio e o cortisol possuem alguns efeitos em comum (Malloy et alli, 1978).

Portanto, devido a essas observações clínicas e experimentais sugere-se que a terapeutica do lítio é útil, não somente, para desordens psiquiátricas mas também para desordens hematológicas e imunológicas e em falhas do desenvolvimento da resposta inflamatória.

OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi estudar num modelo de Depressão Experimental, em ratos, o desenvolvimento da resposta inflamatória, avaliando-se aspectos como:

2.1- A migração de neutrófilos e de células fagocíticas mononucleares, *in vivo*, induzida por Carragenina (Cg) ou Lipopolissacarídeo de *E. coli* (LPS) e Tioglicolato (Tg), respectivamente;

2.2- A influência do tratamento profilático com a droga antidepressiva Cloreto de Lítio (LiCl) sobre a migração destas células;

2.3- A liberação, *in vitro*, de fatores quimiotáticos para neutrófilos por macrófagos de animais tratados ou não com Cloreto de Lítio, estimulados com LPS.

MATERIAIS E MÉTODOS

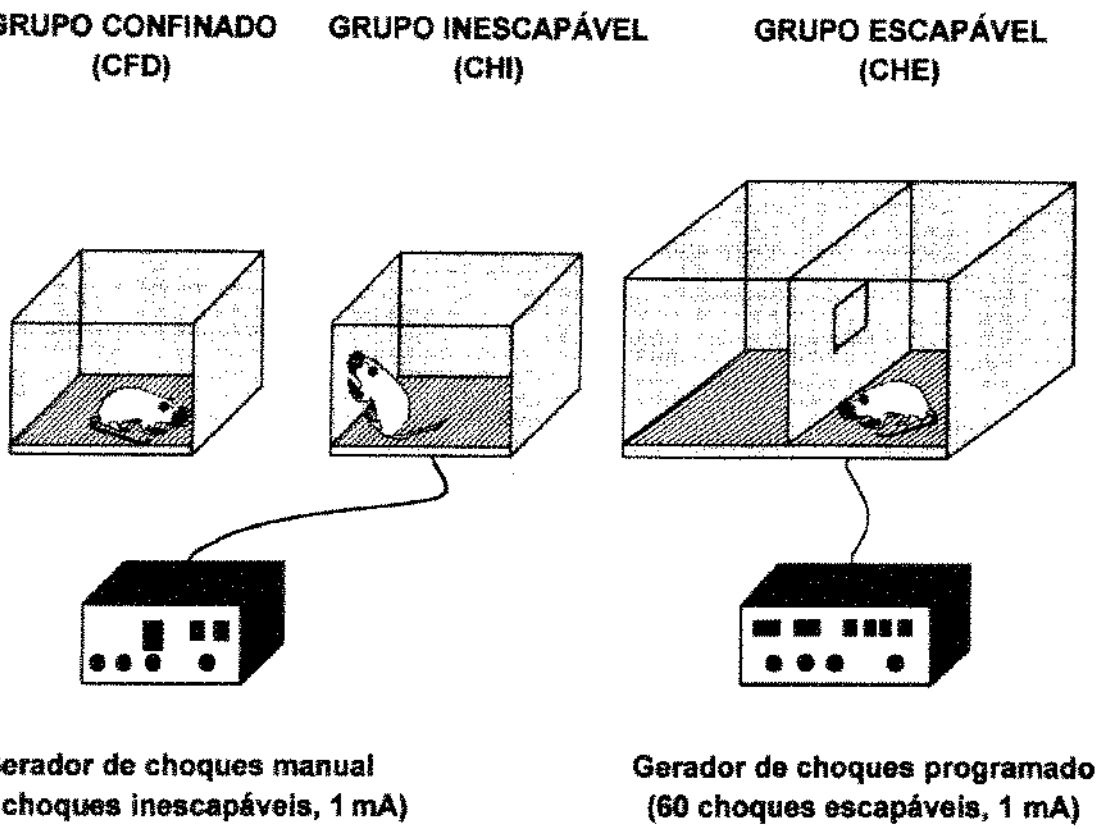
1.0 - ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar, de ambos os sexos, pesando entre 180 e 230g, fornecidos pelo Centro Multi-Institucional de Bioterismo (CEMIB-UNICAMP). As fêmeas foram usadas para verificação do efeito da depressão experimental (Modelo de Desamparo Aprendido) no desenvolvimento da resposta inflamatória aguda, colocadas para adaptação no biotério do Laboratório de Toxicologia Comportamental do Departamento de Farmacologia/FCM - UNICAMP, mantidas individualmente em gaiolas de arame (30x16x19cm), obedecendo um ciclo de 12/12h, claro/escuro, sob temperatura ambiente constante de 26±2°C, com alimentação (ração Nuvilab) e água fornecidas *ad libitum*. Os ratos machos foram utilizados apenas para as medidas de Atividade Biológica do Sobrenadante de Cultura de Macrófagos (ver seção 6.0). Estes foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia por um período mínimo de 24 horas, agrupados em gaiolas de plástico (10 animais, no máximo), obedecendo um ciclo de 12/12h, claro/escuro, com alimentação (ração Nuvilab) e água *ad libitum*.

2.0 - MODELO DE DEPRESSÃO (DESAMPARO APRENDIDO) E GRUPOS EXPERIMENTAIS

Toda parte experimental referente ao modelo de Desamparo Aprendido e tratamento com lítio, foi realizado no laboratório de Toxicologia Comportamental sob orientação da Prof. Dra. Nancy A. Teixeira, do Departamento de Farmacologia-FCM-UNICAMP.

Este modelo compreendeu três sujeitos experimentais manipulados simultaneamente **(Esquema 1).** Um dos sujeitos (**grupo CHE-ESTRESSADOS**) foi submetido a uma sessão de choques escapáveis, enquanto o outro (**grupo CHI- DEPRIMIDOS**) foi submetido a choques inescapáveis. No terceiro e último grupo, o sujeito apenas permaneceu confinado em outra caixa sem, no entanto, receber choques (**grupo CFD- CONTROLES).**



Esquema 1: Equipamentos para indução do estresse e da depressão experimental, sistema emparelhado (Yoked).

2.1 - GRUPO CHE - ESTRESSADOS

Equipamento:

A caixa de choques do tipo "vai e vem" (shuttle box) que foi utilizada correspondia a uma caixa de alumínio medindo 50x29x29cm, com tampa e parede frontal de acrílico transparente. Internamente, era dividida em dois compartimentos iguais, separados por uma parede de alumínio onde havia um orifício retangular de 7,5cm de altura e 6,0cm de largura, distante 8,0cm acima do piso da caixa, o qual permitia a locomoção do animal de um compartimento para o outro.

Cada compartimento possuía duas fotocélulas, distando 6,0cm uma da outra, sensíveis (por interrupção do feixe de luz) ao movimento do sujeito experimental entre os compartimentos. Desse modo, era possível se registrar o tempo de travessia do animal de um compartimento para o outro, além da sua presença em um dado compartimento, a cada momento da sessão. Essas informações eram dirigidas automaticamente ao aparelho de comando programável (ALBARSCH) que liberava os choques.

O piso era composto por barras de latão de 0,3cm de diâmetro, distantes 1,0cm entre sí, através das quais os choques elétricos eram ministrados com mecanismo *scrambler.*

Procedimento:

A sessão se iniciou com a colocação do animal em um dos compartimentos da caixa de choque. O aparelho gerador de choques foi programado para ministrar o primeiro choque somente após decorrido um tempo de 3 minutos (início da sessão), afim de que o animal pudesse se acostumar as condições da caixa e explorá-la. Decorrido este tempo, um primeiro choque de 1 mA foi

deflagrado através das barras de latão do assoalho da caixa. Os próximos choques, todos de 1 mA, foram ministrados sempre no compartimento em que se encontrava o animal, até um total de 60 choques. O intervalo entre os choques foi randômico, variando entre 5 a 25 seg.

A resposta exigida do animal para o término do choque foi a de saltar de um compartimento para o outro. Registrou-se o tempo desde o início de cada choque até o término deste (**latência de fuga ou tempo de choque**).

O tempo máximo de duração por choque foi de 30 segundos, sendo que se o animal não cruzasse os compartimentos novo choque era imediatamente iniciado. O cronômetro uma vez alcançado o valor de 30 segundos, voltava automaticamente ao zero e iniciava-se, imediatamente, nova contagem de latência.

2.2 - GRUPO CHI - DEPRIMIDOS

Equipamento:

Para a realização da sessão de choques inescapáveis (sessão de incontrolabilidade) utilizou-se como fonte geradora de choque um gerador manual (ALBARSCH). Este gerador foi conectado a uma caixa medindo 25x20x20cm (caixa de choques), sendo a parede frontal de acrílico transparente e as outras de alumínio, com tampa no teto. O piso consistia de 15 barras de latão medindo 0,3cm de espessura, distantes 1,0cm uma da outra, através da qual os choques inescapáveis eram ministrados.

Procedimento:

A sessão foi iniciada simultaneamente à sessão de choques escapáves. Após o início do choque da sessão escapável **(condicionamento de fuga)** ministrava-se manual e simultaneamente um choque na caixa de sessão inescapável **(indução de Desamparo Aprendido)**. Nessa situação, a cada tentativa, o sujeito experimental recebia um choque de intensidade e frequência iguais aos choques do grupo CHE **(modelo emparelhado- Yoked).** A duração de 8 segundos correspondia a média de duração dos choques do grupo CHE, visto que a latência de fuga era diferente a cada tentativa. Portanto, a densidade de choques nos grupos era a mesma, porém, no grupo CHI não eram dependentes de nenhuma resposta do animal, sendo portanto, incontroláveis.

2.3 - GRUPO CFD - CONTROLES

Equipamento:

Para a realização do confinamento utilizamos uma caixa idêntica àquela descrita no item 2.2 (Grupo CHI). No entanto, esta caixa não foi acoplada a nenhum gerador de choques.

Procedimento:

A sessão foi iniciada simultaneamente à sessão de choques escapáveis e inescapáveis. Entretanto, os animais não receberam nenhum choque, permanecendo apenas confinados até o término das sessões dos outros grupos.

3 - MODELOS DE INFLAMAÇÃO

3.1 - MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS *IN VIVO*

A migração de neutrófilos foi avaliada após injeção, na cavidade peritoneal, dos estímulos Carragenina (BDH Chemicals Ltda England) na dose de 150 µg/cavidade, Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (SIGMA, 0111:B4) na dose de 200 ng/cavidade ou salina 0,9% estéril, em volume de 1 ml.

Após 4 horas, injetou-se 10 ml de PBS-HEPARINA-BSA (Salina Tampão Fosfato, Heparina 5 UI/ml, Soro Albumina Bovina 3%, p/v) e, depois de leve massagem da cavidade peritoneal, foi coletado o maior volume possível do líquido. Em seguida, foram feitas as contagens total e diferencial de leucócitos. A contagem total foi feita em câmara de Neubauer, onde 20µl do lavado peritoneal eram diluídos em 400µl de solução de Turk. O restante do lavado foi centrifugado (1500 rpm/5 min.) a temperatura ambiente e o sobrenadante descartado. O precipitado leucocitário foi ressuspendido em 300µl de BSA 3%, e desta suspensão fez-se esfregaços em lâminas de vidro, posteriormente corados (corante de Rosenfeld). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em microscópio óptico (lente de imersão), contando-se, em 100 células, os números de neutrófilos, eosinófilos, mastócitos e células mononucleares. Os resultados foram expressos em números de neutrófilos/ml.

3.2 - MIGRAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES *IN VIVO*

A migração de células mononucleares foi avaliada 96 horas após injeção intraperitoneal de 150 ou 300 mg/cavidade de Tioglicolato, nos volumes de 5 ou 10 ml ou salina 0,9% estéril (controle), no volume de 5 ml (CUNHA & FERREIRA,

1986). Alguns animais receberam 10 ml de salina. A lavagem peritoneal e as contagens total e diferencial foram realizadas como descritas no item 3.1. Os resultados foram expressos em números de células mononucleares/ml.

4.0 - TRATAMENTO CRÔNICO COM CLORETO DE LÍTIO

A solução mãe de Cloreto de Lítio (Merck) foi preparada diluindo-se o sal em água deionizada de maneira a se obter uma concentração de 1,0 N. Alíquotas desta solução foram então diluídas em água de torneira, em quantidades suficientes para uma concentração final igual a 20 mM, usadas para o tratamento.

Após 3 dias de adaptação dos animais no biotério, a solução de LiCl foi fornecida, como única fonte de bebida ao grupo tratado (animais agrupados, no máximo 10 por caixa) durante 28 dias consecutivos.

Passado o período de tratamento, os animais foram divididos aleatoriamente nos grupos experimentais, isolados e submetidos ao Modelo de Desamparo Aprendido, como descrito no item 2.0.

4.1 - EFEITO DO TRATAMENTO COM LiCl SOBRE A MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS

Após 24h da sessão de choques, os grupos tratados receberam 1 ml de Cg (150 μg/cavidade) ou 1 ml de salina 0,9% estéril (controle), via intraperitoneal. A análise da migração de neutrófilos foi realizada conforme descrito no item 3.1. Os resultados foram expressos em números de neutrófilos/ml.

4.2 - EFEITO DO TRATAMENTO COM LiCl SOBRE A MIGRAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES

Depois de 24h da sessão de choques, os animais receberam 300 mg/cavidade de Tioglicolato 3%, via intraperitoneal. Estes animais foram sacrificados e analisados, quanto a migração de células mononucleares, após 96 horas do estímulo, seguindo método descrito no item 3.3.1. Os resultados foram expressos em números de células mononucleares/ml e comparados com aqueles obtidos de animais não tratados com LiCl, que receberam a mesma dose de Tioglicolato.

5.0 - ESTUDO *IN VITRO* DA LIBERAÇÃO DE FATORES QUIMIOTÁTICOS PARA NEUTRÓFILOS POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS RESIDENTES ESTIMULADOS COM LPS

As etapas da liberação de fatores quimiotáticos, por macrófagos, foram realizadas em condições assépticas com a utilização de câmara de fluxo laminar horizontal e material autoclavado (127°C/1h). Os meios de cultura foram preparados imediatamente antes do uso com água deionizada e autoclavada, sendo ainda filtrados em membranas Millipore (poros 0,22 μm de diâmetro).

5.1 - OBTENÇÃO DOS MACRÓFAGOS PERITONEAIS RESIDENTES

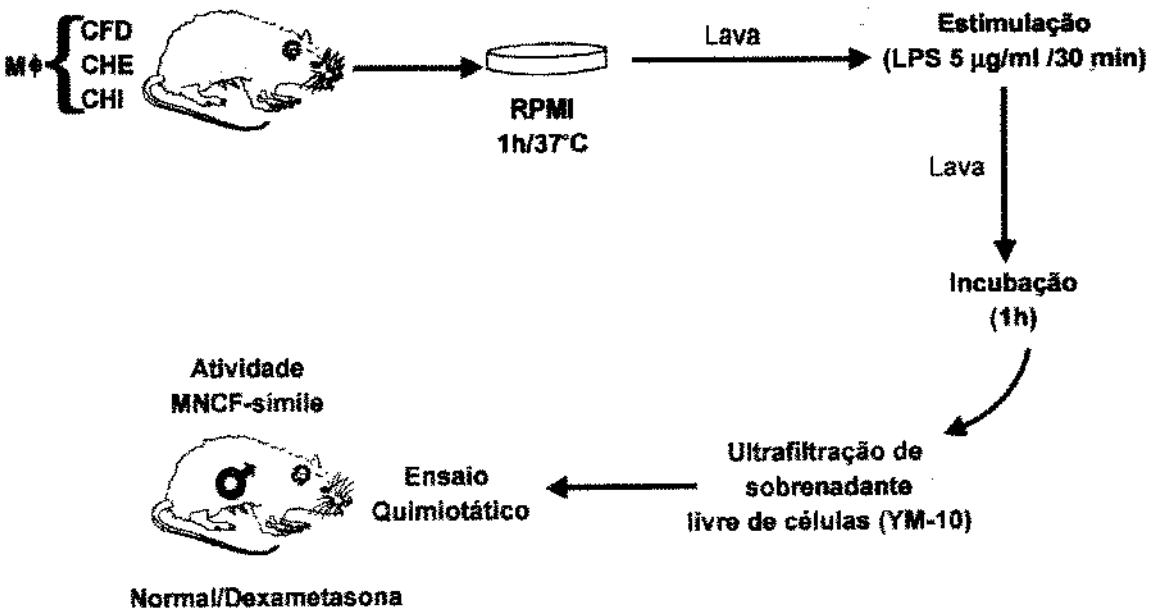
Os macrófagos foram obtidos de cavidades peritoneais de ratas dos grupos CFD, CHE e CHI tratadas ou não com LiCl, conforme descrito no item 2.0.

Para a coleta dos macrófagos peritoneais residentes, os animais foram sacrificados com éter e injetados, via intraperitoneal, com 10 ml do meio de cultura RPMI 1640 (INTERLAB) contendo 25 mM de HEPES (SIGMA), 100 UI/ml de penicilina (SIGMA) , 100 μg/ml de streptomicina (SIGMA) e heparina (5 UI/ml). Após leve massagem das cavidades retirou-se o maior volume possível do meio injetado.

Os lavados peritoneais foram distribuídos em placas de cultura de plástico estéreis, incubados por 1 hora a 37°C, em ambiente umidificado contendo 5% de CO_2, para que os macrófagos pudessem aderir ao fundo das mesmas. Os sobrenadantes foram desprezados e as células aderidas lavadas 3 vezes com salina 0,9% estéril. Com este procedimento eliminou-se a maioria das outras células presentes no lavado.

5.2 - ESTIMULAÇÃO DOS MACRÓFAGOS EM CULTURA E OBTENÇÃO DOS SOBRENADANTES

Após aderirem, os macrófagos foram estimulados por 30 minutos com LPS (5μg/ml). As placas foram, então, lavadas 3 vezes com salina 0,9% estéril e incubadas novamente, somente com 3 ml de RPMI 1640 (mesma composição do item acima, com exceção da heparina), por 1 hora. Após este período os sobrenadantes foram recolhidos e concentrados 10 vezes, por ultrafiltração, em Aparelho de Amicon com membrana YM-10 (retém substâncias com peso molecular acima de 10.000 Daltons), e divididos em três partes iguais para posteriores ensaios de atividade quimiotática, atividade MNCF-símile e efeito do aquecimento sobre a atividade quimiotática **(Esquema 2).**



Esquema 2: Obtenção do sobrenadante de macrófagos, estimulados com LPS, e ensaio de sua atividade quimiotática.

6.0 - MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS *IN VIVO* INDUZIDA PELO SOBRENADANTE DE CULTURA DE MACRÓFAGOS EM ANIMAIS NORMAIS E PRÉ-TRATADOS COM DEXAMETASONA

Os sobrenadantes concentrados 10x foram filtrados em membrana Millipore com poros de 0,22 µm de diâmetro e injetados (1 ml, i.p.) em ratos machos normais ou pré-tratados com Dexametasona (Merck-Sharp-Dohme; 0,5 mg/Kg, s.c., 1 hora antes da injeção do sobrenadante). A atividade do sobrenadante capaz de induzir migração de neutrófilos, mesmo em animais pré-tratados com dexametasona, foi chamada de MNCF-símile (Fator Quimiotático para Neutrófilo derivado de Macrófagos; Cunha & Ferreira, 1986). As migrações de neutrófilos

foram analisadas 4 horas após a injeção do sobrenadante conforme descrito no item 3.1. Os resultados foram expressos em números de neutrófilos/ml.

6.1 - EFEITO DA TEMPERATURA SOBRE A ATIVIDADE QUIMIOTÁTICA PARA NEUTRÓFILOS DO FATOR LIBERADO POR MACRÓFAGOS

O sobrenadante foi incubado, sob leve agitação, à 100°C por 20 minutos. Ao final, o sobrenadante foi resfriado e injetado no volume de 1 ml nas cavidades peritoneais de animais normais. As migrações de neutrófilos foram avaliadas 4 horas após seguindo item 3.1. Os resultados foram expressos em números de neutrófilos/ml.

7.0 - PREPARAÇÃO DE SOLUÇÕES, DROGAS E REAGENTES

Todos os reagentes e soluções utilizados foram de grau analítico ou P.A., obtidos, principalmente, da MERCK, REAGEN ou RIEDEL.

7.1 - CORANTE DE ROSENFELD MODIFICADO

Giemsa azul-eosina	0,97 g
May-Greenwald-eosina	0,53 g
Metanol p.a.	1,00 l

7.2 - LÍQUIDO DE TURK

Ácido acético.	2,00 ml
Água destilada q.s.p.	100 ml

Após a mistura dos dois líquidos, foram adicionados alguns cristais de azul de metileno, com função de aumentar o contraste para a contagem de leucócitos na câmara de Neubauer.

7.3 - SOLUÇÃO DE ALBUMINA A 3%

Albumina bovina (SIGMA).	3,00 g
Água destilada q.s.p.	100 ml

Colocar a albumina sobre a água destilada e deixar em repouso até completa dissolução.

7.4 - SOLUÇÃO SALINA TAMPONADA (PBS): SOLUÇÃO CONCENTRADA 10X

NaCl	80,00 g
Kcl	2,00 g
$Na_2HPO_4.12H_2O$.	28,90 g
KH_2PO_4.	2,00 g
Água destilada q.s.p.	1,00 l

A solução de trabalho foi obtida pela diluição (1:10) da solução acima.

7.5 - SOLUÇÃO DE TIOGLICOLATO 3%

Tioglicolato (DIFCO)	3,0 g
Água destilada	100 ml

Misturar os reagentes em becker e aquecer sob agitação constante até mudança de coloração da solução.

8.0 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Aos resultados obtidos foram efetuados cálculos para determinação das médias e dos erros-padrões das médias (EPM). Diferenças estatisticamente significantes ($p<0,01$ e $p< 0,05$) entre grupos foram determinadas utilizando-se um ou combinações dos seguintes testes: ANOVA (Denenberg, 1976) e teste de Duncan para comparações múltiplas (Duncan, 1955; Kramer, 1956).

RESULTADOS

1.0 - EFEITO DA DEPRESSÃO EXPERIMENTAL SOBRE A MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS PARA A CAVIDADE PERITONEAL

A injeção (1 ml) de Cg (150 μg/cavidade) ou LPS (100 ng/cavidade) causou significativa migração de neutrófilos para cavidade peritoneal de ratos, em todos os grupos estudados, quando comparados aos seus respectivos grupos salina 0,9% (1 ml/cavidade).

Animais submetidos à sessão de choques escapáveis (CHE) apresentaram migração de neutrófilos, em resposta à administração i.p. desses estímulos, semelhante àquela observada nos animais controles (CFD). Entretanto, independentemente do estímulo utilizado, observou-se inibição, estatisticamente significante ($p < 0,01$ - ANOVA e Teste de Duncan), da resposta de migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal no grupo de animais submetidos à depressão experimental (CHI). Essa inibição foi em torno de 45 e 60%, para os grupos Cg e LPS, respectivamente (**Figuras 1 e 2**).

2.0 - EFEITO DA DEPRESSÃO EXPERIMENTAL SOBRE A MIGRAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES PARA A CAVIDADE PERITONEAL

A injeção de Tg em animais CFD e CHE, nas doses de 150 e 300 mg/cavidade, causou migração dose-dependente de células mononucleares para a cavidade peritoneal (**Figura 3-A**).

Na dose de 150 mg não foi observada diferença estatística entre os grupos. No grupo CHE essa dose causou significativa migração de células mononucleares ($p < 0,05$; ANOVA e Teste de Duncan, em relação ao grupo salina), comparável

àquela observada em animais CFD (1,8±0,2 e 2,0±0,2 x 10^6 células/ml; n=12 para cada grupo, respectivamente). No entanto, no grupo CHI o Tg, nessa mesma dose, não foi capaz de induzir migração de células mononucleares. Observou-se um aumento de apenas 24% no número dessas células, em relação ao seu controle (**Figura 3-A**).

Após injeção i.p. de 300 mg de Tg/cavidade observou-se intensa migração de células mononucleares para o peritôneo de animais do grupo CFD. O número dessas células chegou a dobrar ($p<0,01$; ANOVA e Teste de Duncan) em relação aos valores obtidos em animais que receberam injeção i.p. de salina (**Figura 3-B**). No grupo CHE essa resposta foi cerca de 35% menor ($p< 0,05$; ANOVA e Teste de Duncan). Por outro lado, em animais submetidos a depressão experimental, a injeção dessa dose de Tg não causou migração de células mononucleares. De maneira semelhante ao observado com a menor dose, 300 mg de Tg/cavidade induziu um insignificante aumento no número dessas células (18%), que não foi estatisticamente diferente do grupo salina (**Figura 3-A**). Em relação ao grupo CFD, o grupo de animais deprimidos (CHI) mostrou uma redução do efeito quimiotático do Tg, para células mononucleares, em mais de 80% (**Figura 3-A e B**).

3.0 - EFEITO O TRATAMENTO COM LiCl SOBRE A MIGRAÇÃO DE NEUTRÓFILOS PARA A CAVIDADE PERITONEAL

Em animais tratados com Cloreto de Lítio (20 mM) por 28 dias, v.o., *ad libitum*, a injeção de Cg (150 μg/cavidade) causou significativa ($p<0,01$; ANOVA e Teste de Duncan) migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, nos três grupos experimentais analisados, em relação aos seus respectivos grupos controle. Esse efeito foi de intensidade semelhante nos grupos CFD, CHE e CHI (2,3±0,2; 1,8±0,6 e 2,2±0,3 x 10^6 células/ml, respectivamente; n=8 para todos os grupos), não havendo diferenças estatísticas entre eles (**Figura 4**). Este fato foi

diferente daquele observado em animais não tratados com LiCl, onde se observou significativa redução da migração de neutrófilos em animais do grupo CHI (ver Figura 1).

As contagens total e diferencial de leucócitos circulantes em animais tratados cronicamente com LiCl não foi diferente dos animais controles não tratados (número total de leucócitos: tratados com LiCl= 10925 ± 468; não tratados= 11525 ± 1822.

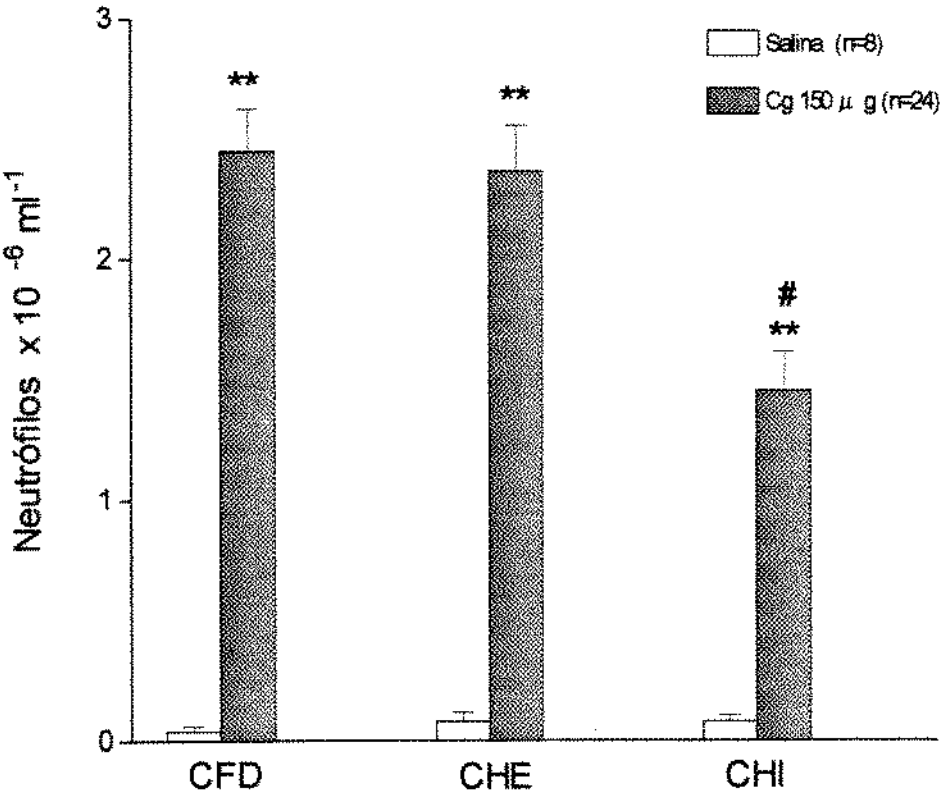


FIGURA 1 - A depressão experimental reduziu a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal de ratos estimulada com Carragenina (Cg : 150 µ g/cavidade). A migração de neutrófilos foi avaliada 4 h após a injeção i.p. de Cg. As barras representam as médias ± EPM do número de neutrófilos. O número de animais utilizados está indicado na legenda. ** $p< 0,01$, em relação ao seu respectivo controle (salina) e # $p<0,01$, em relação ao grupo CFD (ANOVA e Teste de Duncan).

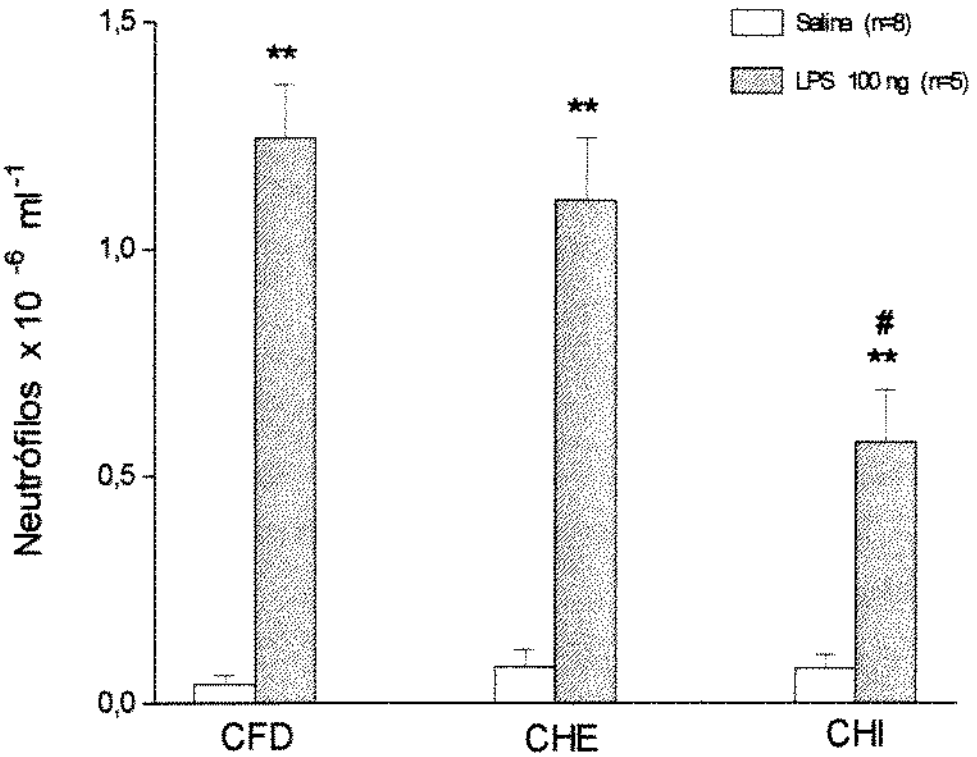


FIGURA 2 - A migração de neutrófilos induzida por LPS (100 ng/cavidade) foi reduzida em ratos submetidos à depressão experimental. A migração de neutrófilos foi avaliada 4 h após a injeção i.p. de LPS e os resultados estão expressos como média ± EPM. O número de animais utilizados está indicado na legenda. ** p< 0,01, em relação ao seu respectivo controle (salina) e # p<0,01, em relação ao grupo CFD (ANOVA e Teste de Duncan).

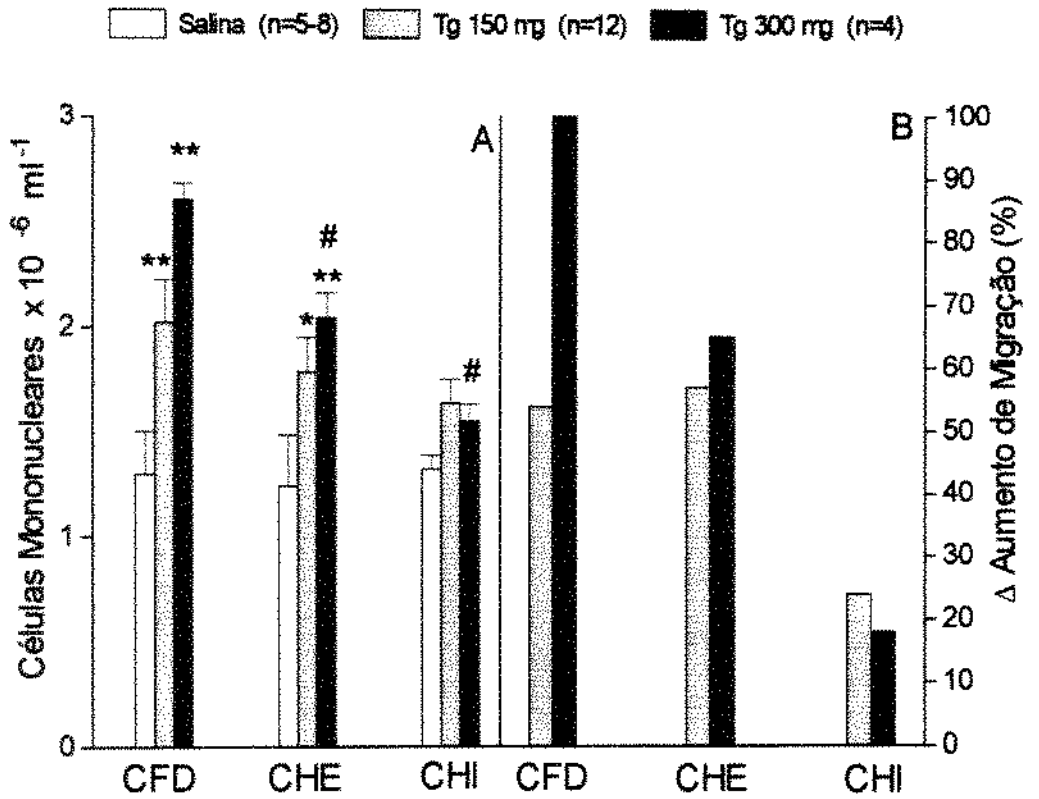


FIGURA 3 - O estresse reduziu a migração de células mononucleares para a cavidade peritoneal de ratos estimulada com Tioglicolato (Tg: 150mg e 300mg/cavidade). Painel A: número de células mononucleares que migraram após injeção de salina 0,9% (5 ml) ou Tg (150 e 300 mg). **Painel B:** aumento percentual da migração de células mononucleares, nos grupos CFD, CHE e CHI, em relação a média do número de células mononucleares encontrada em seus respectivos grupos salina. A migração de células mononucleares foi avaliada 96 h após a injeção i.p. de Tg e os resultados representam as médias ± EPM. O número de animais utilizados está indicado na legenda. Não foi encontrada diferença estatística entre os números de células mononucleares após injeção de 5 ou 10 ml de salina (1,3±0,2 e 1,3±0,1 x10^6 células /ml, n=12 e n=8, respectivamente). * $p<0,05$ e ** $p< 0,01$, em relação ao seu respectivo controle salina e # $p<0,01$, em relação ao grupo CFD; (ANOVA e Teste de Duncan).

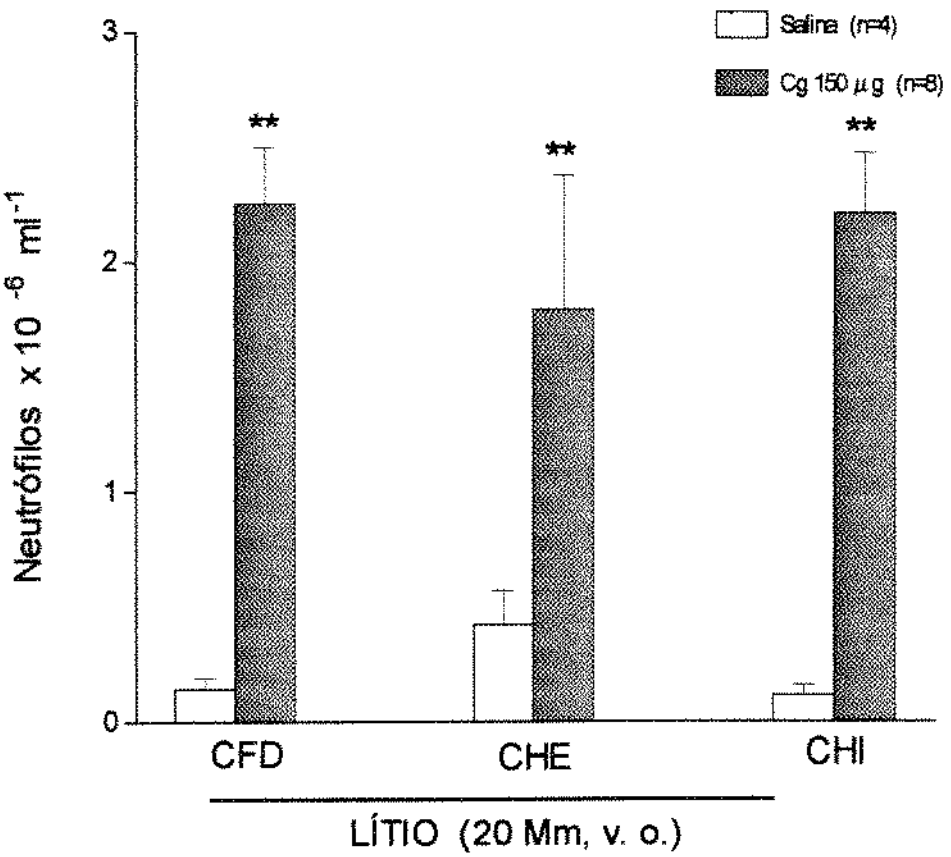


Figura 4 - O tratamento profilático, de ratos submetidos a depressão experimental, com cloreto de lítio previniu a inibição da migração de neutrófilos. A migração de neutrófilos foi avaliada 4 h após injeção i.p. de Cg (150 µg/cavidade). O LiCl (20 mM) foi oferecido por 28 dias, v.o., *ad libitum*. Os resultados são representados como média ± EPM. O número de animais avaliados está indicado na legenda. ** $p<0,01$, em relação ao seu respectivo controle salina (ANOVA e Teste de Duncan).

4.0 - EFEITO DO TRATAMENTO COM LiCl SOBRE A MIGRAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES PARA A CAVIDADE PERITONEAL

A injeção de 300 mg/cavidade de Tg, em animais tratados cronicamente com LiCl (20mM) por 28 dias, oferecidos v.o., *ad libitum*, induziu migração de células mononucleares em todos os grupos de animais estudados. Essa migração não apresentou diferenças estatísticas entre os grupos CFD, CHE e CHI muito embora tenha sido, em relação ao grupo CFD, de menor intensidade no grupo de animais estressados (2,5±0,3; 1,9±1,6 e 2,6±0,2 x 10^6 células/ml, respectivamente; n=8 para todos os grupos) (**Figura 5**). Quando se comparou os efeitos das injeções de Tg em animais tratados ou não com LiCl, nos três grupos estudados, observou-se diferença estatística apenas na resposta de animais submetidos à depressão experimental (CHI; controle=1,6±0,1; n=4 e tratado=2,6± 0,2 x 10^6 células/ml; n=8).

5.0 - DETECÇÃO DA ATIVIDADE MNCF-SÍMILE E EFEITO DO AQUECIMENTO DO SOBRENADANTE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS RESIDENTES PROVENIENTES DOS GRUPOS CFD, CHE E CHI

A injeção intraperitoneal, em ratos machos, do sobrenadante de monocamadas de macrófagos estimulados com LPS (5 μg/ml), provenientes de animais do grupo CFD, apresentou significativa atividade quimiotática para neutrófilos em comparação à injeção do sobrenadante de macrófagos não estimulados com a endotoxina (1,8±0,6; n=4 e 0,5±0,2 x 10^6 células/ml; n=5, respectivamente - $p<0,01$ - ANOVA e Teste de Duncan). Essa atividade foi observada mesmo quando o sobrenadante era injetado em animais pré-tratados com dexametasona (2,1±0,2 x 10^6 células/ml; n=5), caracterizando a presença de uma atividade MNCF-símile. O aquecimento (100°C/20 min) aboliu a atividade

quimiotática para neutrófilos, demostrando o caráter termolábil desse sobrenadante.

O sobrenadante proveniente de macrófagos, estimulados com LPS (5 μ g/ml), do grupo CHE, também apresentou atividade quimiotática para neutrófilos embora em menor intensidade (cerca de 30%) que a do sobrenadante do grupo CFD. A injeção i.p. do sobrenadante em animais pré-tratados com dexametasona apresentou-se significantemente reduzida, em relação ao seu respectivo controle (0,2±0,08 e 1,2±0,1 x 10^6 células/ml, respectivamente; n=5 para cada grupo; $p<0,01$- ANOVA e Teste de Duncan). Quando aquecido (100ºC/ 20min), o sobrenadante apresentou redução da atividade quimiotática em mais de 60%, comparando-se ao seu respectivo sobrenadante bruto (controle) ($p<0,05$-ANOVA e Teste de Duncan), caracterizando a termolabilidade deste.

O sobrenadante bruto de monocamadas de macrófagos, de animais deprimidos (CHI), estimulados com LPS (5 μg/ml) apresentou migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal na ordem de 0,7±0,3 x 10^6 células/ml. Embora de intensidade muito menor que a atividade do sobrenadante do grupo CFD, esta diferença não foi estatisticamente significante. A injeção desse sobrenadante em animais pré-tratados com dexametasona causou insignificante migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal quando comparada ao seu respectivo controle (0,1±0,01 e 0,74±0,3 x 10^6 células/ml, respectivamente; $p<0,01$- ANOVA e Teste de Duncan). A atividade do sobrenadante aquecido (100ºC/ 20 min), neste grupo, não apresentou diferença estatística quanto a migração de neutrófilos em relação a atividade do sobrenadante bruto (controle) (**Figura 6**).

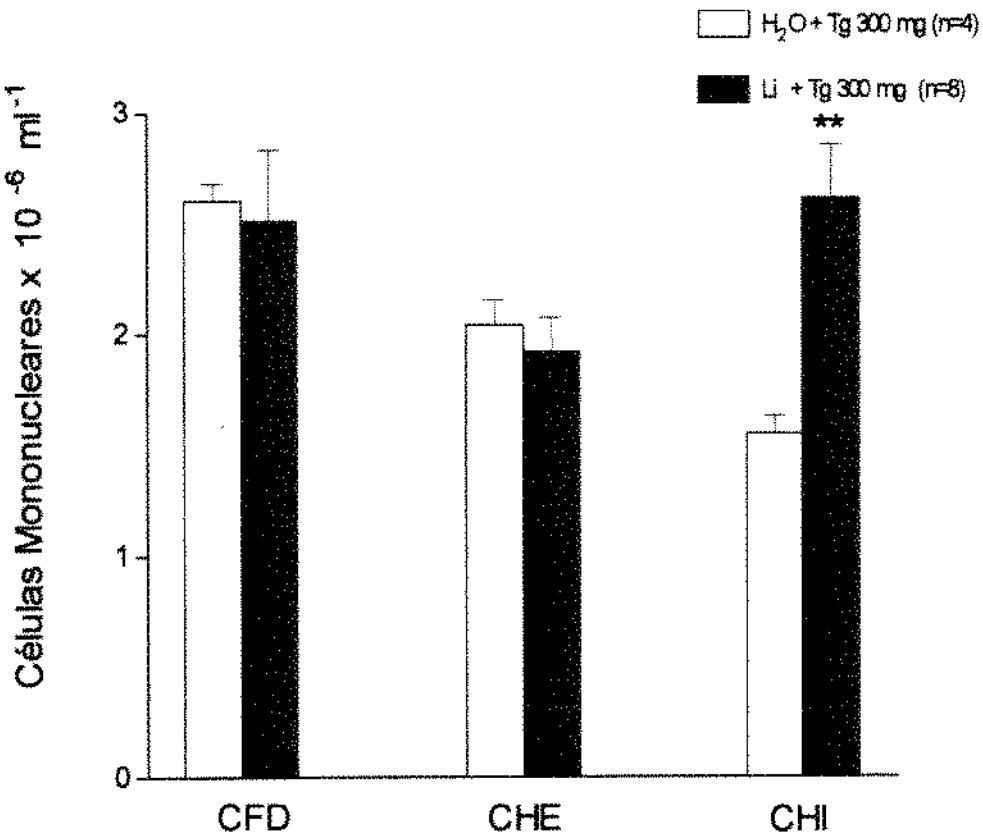


FIGURA 5 - O tratamento profilático com LiCl previniu a inibição da migração de células mononucleares, induzidas por Tg (300 mg/cavidade), apenas em ratos submetidos a depressão experimental. A migração de células mononucleares foi avaliada 96 h após a administração de Tg (300mg/cavidade). O LiCl (20 mM) foi oferecido por 28 dias, v.o., *ad libitum*. Os resultados estão expressos como média ± EPM. O número de animais avaliados está indicado na legenda. ** $p < 0,01$, em relação ao seu respectivo grupo controle salina (ANOVA e Teste de Duncan).

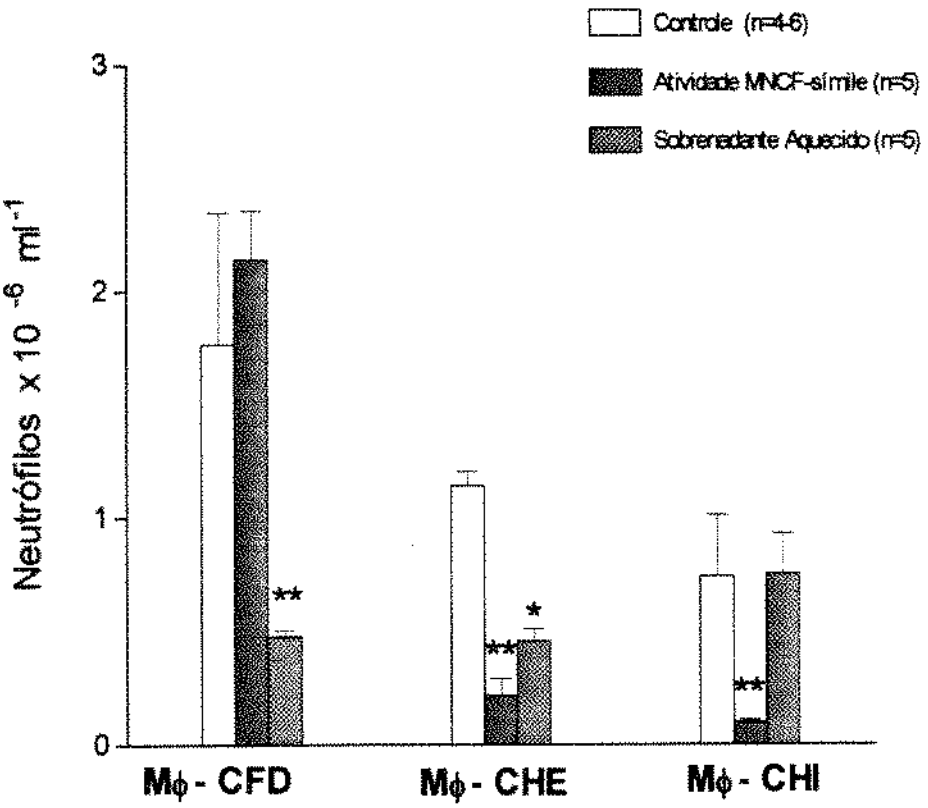


FIGURA 6 - Detecção da Atividade MNCF-símile e Efeito do Aquecimento do Sobrenadante de Monocamadas de Macrófagos, Estimulados com LPS (5μ g/ml), sobre essa Atividade. Os macrófagos em cultura foram estimulados por 30 min. com LPS (5μg/ml). A migração de neutrófilos foi avaliada 4 h após a injeção i.p. de 1 ml do sobrenadante da cultura esterilizado, em ratos normais ou pré-tratados com dexametasona (0,5 mg/Kg; 1h antes). A atividade do sobrenadante observada em animais pré-tratados com o corticóide foi denominada de atividade MNCF. A atividade dos sobrenadantes aquecidos (100°C/20 min) foi avaliada em animais normais. Os resultados estão expressos como média ± EPM do número de neutrófilos. O número de animais avaliados está representado nas legendas. A migração de neutrófilos induzida pelo sobrenadante de macrófagos de animais normais não estimulados com a endotoxina foi de 0,5± 0,2 x 10^6 células/ml, (n=5). * $p<0,05$ e ** $p< 0,01$, em relação aos seus respectivos controles (ANOVA e Teste de Duncan).

6.0 - DETECÇÃO DA ATIVIDADE MNCF-SÍMILE E EFEITO DO AQUECIMENTO DO SOBRENADANTE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS RESIDENTES PROVENIENTES DOS GRUPOS CFD, CHE E CHI PRÉ-TRATADOS CRONICAMENTE COM LiCl

Os sobrenadantes de monocamadas de macrófagos provenientes de animais tratados cronicamente por 28 dias, v.o., *ad libitum*, com Cloreto de Lítio (20 mM), estimulados com LPS (5 μg/ml), dos grupos experimentais em estudo, foram injetados em ratos machos e foram avaliadas suas capacidades em induzir resposta migratória de neutrófilos para a cavidade peritoneal (**Figura 7**).

O sobrenadante bruto de macrófagos do grupo CFD induziu, comparativamente, migração de neutrófilos de menor intensidade (1,0±0,06, 1,7± 0,4 e 2,3±0,08 x 10^6 células/ml, respectivamente, para os sobrenadantes de macrófagos dos grupos CFD, CHE e CHI). Quando esse sobrenadante foi injetado em animais pré-tratados com dexametasona, contrastando com os resultados obtidos com o sobrenadante de animais CFD não tratados com LiCl (ver figura 6), houve uma potente inibição da migração de neutrófilos, em relação ao seu respectivo grupo controle (redução de mais de 90%; $p<0,01$- ANOVA e Teste de Duncan). O aquecimento (100ºC/ 20min) do sobrenadante revelou sua termolabilidade devido a redução, em mais de 80%, da migração de neutrófilos em relação ao seu sobrenadante bruto (controle).

A injeção do sobrenadante bruto proveniente de macrófagos do grupo CHE, induziu migração de neutrófilos para cavidade peritoneal em maior intensidade que o grupo CFD. No entanto, esta diferença de, cerca de 70%, não foi estatisticamente significante. Nos animais pré-tratados com dexametasona, a

injeção do sobrenadante induziu migração de neutrófilos significativamente maior que a do grupo CFD (0,7±0,1 e 0,09±0,02 x 10^6 células/ml; p<0,01- ANOVA e Teste de Duncan). No entanto, essa migração foi reduzida em cerca de 60%, quando comparada com aquela induzida pelo sobrenadante de animais controles (p<0,01- ANOVA e Teste de Duncan). Observou-se, ainda, potente redução da migração, em relação ao seu sobrenadante bruto (p<0,01- ANOVA e Teste de Duncan), quando o mesmo era aquecido (100ºC/ 20min).

A migração de neutrófilos, induzida pela injeção do sobrenadante de macrófagos de animais deprimidos, foi potenciada (120% maior), quando comparada a atividade do sobrenadante do grupo CFD (2,3±0,8 e 1,0±0,06 x 10^6 células/ml, respectivamente; p<0,01-ANOVA e Teste de Duncan). Quando o sobrenadante foi ensaiado em animais pré-tratados com dexametasona ocorreu uma potente inibição da migração, em relação ao observado em animais controles (cerca de 90% de redução; p<0,01- ANOVA e Teste de Duncan). Da mesma forma, quando se aqueceu esse sobrenadante, mais de 80% da atividade foi reduzida, em comparação com aquela presente no sobrenadante bruto (0,3±0,07 e 2,3±0,08 x 10^6 células/ml, respectivamente; p<0,01- ANOVA e Teste de Duncan).

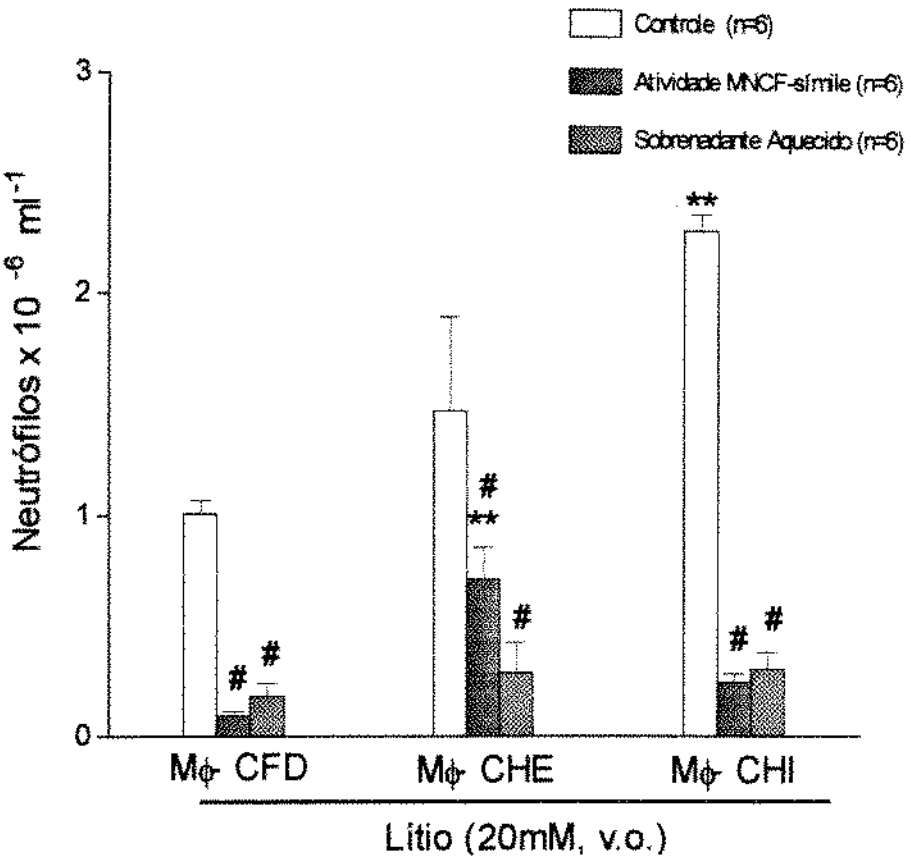


FIGURA 7- Atividade Quimiotática para Neutrófilos e Efeito do Aquecimento sobre esta Atividade, em Sobrenadante de Monocamadas de Macrófagos Provenientes de Animais Tratados Profilaticamente com LiCl. Os macrófagos, em cultura, foram estimulados por 30 min com LPS (5μg/ml). A migração de neutrófilos foi avaliada 4 h após a injeção i.p. de 1 ml do sobrenadante da cultura esterilizado, em ratos normais ou pré-tratados com dexametasona (0,5 mg/Kg, 1h antes). A atividade dos sobrenadantes aquecidos (100°C/20 min) foi avaliada em animais normais. O tratamento com LiCl (20 mM) ocorreu por 28 dias, v.o., *ad libitum*. Os resultados representam as médias ± EPM do número de neutrófilos. O número de animais avaliados está representado nas legendas. ** $p < 0,01$, em relação ao grupo CFD e # $p<0,01$, em relação aos seus respectivos controles (ANOVA e Teste de Duncan).

DISCUSSÃO

Uma mobilização de leucócitos adequada e em tempo hábil é fundamental para a defesa do organismo. Dessa forma, uma deficiência de migração para o foco inflamatório e(ou) uma alteração na capacidade microbicida dessas células pode aumentar os riscos de infecção (Harkness, 1981; Wilkinson,1994).

Tem sido demonstrado na literatura que estados depressivos estão associados com redução das defesas do organismo e aumento na incidência de doenças infecciosas e neoplasias, tanto em modelos experimentais, como em estudos com seres humanos, sugerindo, então, estreita ligação entre o sistema imune e o SNC (Faith et alii, 1991; Landmann et alii, 1991; Peterson et alii, 1991).

No presente trabalho demonstrou-se que a depressão experimental reduz a migração de neutrófilos e de células mononucleares para a cavidade peritoneal de ratos, em resposta a carragenina, LPS e tioglicolato, sugerindo, dessa maneira, que a capacidade de resposta a estímulos inflamatórios inespecíficos, de caráter não imune, está comprometida.

Diante estímulos inflamatórios inespecíficos como carragenina e LPS, os animais do grupo CHI, experimentalmente deprimidos, tiveram sua capacidade migratória reduzida em relação aos animais controles. Este efeito não foi observado nos animais do grupo CHE (estressados), que permaneceram iguais ao controle. Sendo a resposta migratória de leucócitos para o foco inflamatório um fenômeno complexo e multimediado, envolvendo várias etapas, entre elas: 1- deslizamento e aderência de leucócitos ao endotélio vascular; 2- passagem através das junções entre células endoteliais; 3- permanência entre a membrana basal e pericitos; 4- secreção de enzimas e digestão de componentes da membrana basal; 5- acesso à matriz do tecido conjuntivo extravascular e, por fim, 6- movimento direcionado a favor de um gradiente de fatores quimiotáxicos (Katori

et alii, 1991). Portanto uma das hipóteses para a redução da resposta migratória de neutrófilos e também de células mononucleares, observada neste trabalho, pode ser devida ao bloqueio de uma, ou mais, dessas etapas.

A depressão está associada a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), resultando em elevação na concentração plasmática de catecolaminas e corticóides (Tecoma & Huey, 1985; Stein et alii, 1985; Peeters & Broekkamp, 1994; Chrousos, 1995).

Quando injetamos tioglicolato (Tg) nas cavidades intraperitoneais de ratosCFD e CHE, observou-se a resposta migratória de células mononucleares dose-dependente, estando reduzida nos animais que receberam choques escapáveis (CHE). No entanto, esta resposta foi abolida nos animais que receberam choques inescapáveis (CHI). Este efeito poderia ser explicado pelo fato de que o choque causou liberação de GCs endógenos. Com a posterior injeção de Tg, a resposta migratória esperada para este estímulo foi reduzida ou abolida pois estava sendo modulada pelo GC liberado inicialmente, ocorrendo o fenômeno conhecido como "contra-irritação". Esta hipótese está de acordo com os trabalhos de Garcia-Leme & Shapoval (1975), pois estes autores demonstraram que a injeção prévia de um estímulo inflamatório atenuava a resposta à administração posterior do mesmo estímulo (Cg). Em animais adrenalectomizados, este fenômeno não ocorria, sugerindo que um aumento na concentração endógena de GCs, devido ao primeiro estímulo, teria um papel modulador sobre o desenvolvimento da resposta inflamatória diante um segundo estímulo (Garcia-Leme & Shapoval, 1985).

Os glicocorticóides apresentam atividade antiinflamatória pois são potentes inibidores de alterações vasculares e de várias funções celulares (Chrousos, 1995), tais como: síntese e liberação de eicosanóides (Flower, 1988; Peers et alii, 1993) e citocinas (Goldestein et alii, 1992), e expressão de moléculas de adesão em células endoteliais (Chrousos, 1995). Assim, um aumento nos níveis

plasmáticos de GCs explicaria, pelo menos em parte, a inibição da migração de leucócitos para o foco inflamatório.

No presente trabalho não foram determinados os níveis de corticosterona ou qualquer outro indicador de atividade do eixo HHA, nos diferentes grupos experimentais. Entretanto, já está descrito na literatura que o modelo de Desamparo Aprendido, utilizado por nós neste trabalho, causa elevação nos níveis de corticosteróides circulante (Nelson & Charney, 1981); além disto, as primeiras observações de Selye, em 1935 (citado em Owens & Nemeroff, 1991), relata que mamíferos, incluindo roedores, submetidos a uma situação estressora apresentam níveis séricos elevados de GCs (Stein et alii, 1985; Owens & Nemeroff, 1991; Chrousos, 1995). Ainda, dados preliminares (não mostrados) revelaram que os animais do grupo CHI (experimentalmente deprimidos) apresentaram um número de leucócitos circulantes menor que aquele observado em animais controles (grupo confinado; CFD), e GCs são reconhecidos indutores de leucopenia, com neutrofilia e linfocitopenia relativas (Stein et alii, 1985). A confirmação destes resultados também explicaria, em parte, a redução da migração de neutrófilos e de células mononucleares para a cavidade peritoneal. Isto é, a resposta migratória provavelmente foi menor porque existia um menor número de leucócitos circulantes.

Existem relatos de que animais submetidos a uma sessão de choques inescapáveis apresentam níveis circulantes mais elevados de GCs, quando comparados com aqueles observados em animais submetidos a choques escapáveis (Weiss et alii citado em Laudenslager et alii, 1983; Restak,1989). Entretanto, recentemente Sandi e colaboradores (1992) demonstraram que não existiam diferenças na reatividade do eixo HHA entre ratos submetidos a choques escapáveis e inescapáveis, pois apresentavam níveis, embora significativamente elevados em relação ao controle, comparáveis de ACTH e corticosterona. Entretanto, as condições experimentais utilizadas foram muito distintas, sendo que Sandi e colaboradores (1992) utilizaram animais submetidos cronicamente a

sessões de choques escapáveis e inescapáveis, por 4 dias consecutivos, enquanto que as outras observações foram feitas em modelos de exposição aguda aos estímulos estressores, situação mais próxima a utilizada em nosso trabalho.

Admitindo-se que os níveis de GCs estão alterados nos animais experimentais submetidos a sessão de choques, em relação ao grupo CFD, deve-se imaginar, pelo menos, as seguintes hipóteses:

a) se igualmente aumentados em ambos os grupos, os GCs não devem estar envolvidos na inibição da migração de neutrófilos, pois apenas os animais do grupo CHI, e não do grupo CHE, apresentaram uma atividade migratória dessas células diminuída. Sendo assim, outros mediadores endógenos, presentes ou não em maior quantidade, devem ser considerados. Por exemplo, estímulos estressores induzem a liberação de peptídeos opióides endógenos e tem sido sugerido que estes mediadores estão envolvidos na etiologia de desordens afetivas e causam imunossupressão (Owens & Nemeroff, 1991);

b) se GCs têm algum papel de destaque, deve existir um nível crítico, atingido apenas nos animais submetidos agudamente a sessão de choques incontroláveis, acima do qual o efeito antiinflamatório aparece plenamente. Deve ser observado que a migração de neutrófilos e monócitos é inibida por concentrações farmacológicas de GCs (Rinehart et alii, 1975; Schleimer et alii, 1990), e que concentrações fisiológicas têm um importante papel no controle da atividade migratória normal de monócitos (Heluy Neto, 1994). Como já sugerimos, a sobreposição de um estímulo a outro (contra-irritação) pode contribuir para que este nível crítico de GCs seja atingido. Este fato pode explicar a inibição de células mononucleares nos animais que receberam choques escapáveis (CHE), pois além do estímulo irritante do Tg, a expansão de volume provocada pela injeção deste estímulo (5 e 10 ml) contribuiu para um aumento nos níveis de corticóides (ver figura 3);

c) pode ser que determinadas células ou tecidos envolvidos na gênese e(ou) manutenção da resposta inflamatória, apresentem sensibilidade diferente aos corticóides. Assim, em condições de concentrações equivalentes de GCs nos grupos CHE e CHI, temos que admitir que são mais sensíveis aos GCs os animais submetidos, agudamente, ao estressor incontrolável. Por outro lado, sabe-se que a exposição crônica a um estímulo estressor parece levar a um grau de adaptação do eixo HHA e hiporresponsividade aos GCs (Sandi et alii, 1992). Em pacientes humanos severamente deprimidos observa-se elevação nos níveis séricos de cortisol e incapacidade de controle negativo, em resposta a administração de dexametasona (Tecoma & Huey, 1985). O fato da manutenção de níveis elevados levar a hiporresponsividade torna difícil a explicação para o envolvimento de GCs na redução da migração de células mononucleares para a cavidade peritoneal estimulada por Tg, observada em animais dos grupos CHE e CHI. Mais intrigante, ainda, foi a demonstração de que ratos adrenalectomizados apresentam redução na migração de células mononucleares e que a migração de neutrófilos, entretanto, estava potenciada nesses animais (Heluy Neto, 1994). A reposição hormonal a níveis fisiológicos, pela injeção de GCs, restabeleceu a resposta migratória de monócitos e reduziu o efeito potenciador sobre neutrófilos (Heluy Neto, 1994). O autor sugeriu que GCs devem estimular, em células endoteliais, a expressão de algumas moléculas de adesão específicas para a migração de monócitos e inibir a expressão de outras, envolvidas com a resposta migratória de neutrófilos. Sabe-se também, que vários mediadores gerados no foco inflamatório, por macrófagos residentes ativados, como: LTB_4, IL-1, TNF-α e IL-8, são capazes de induzir migração e ativação de leucócitos, e que a síntese e(ou) liberação desses mediadores são inibidos por GCs (Ferreira, 1989).

Recentemente, tem sido descrito que macrófagos podem estar envolvidos, também, na gênese e(ou) manutenção de várias das alterações observadas na depressão, questionando a visão comum de que o cérebro é o principal foco para a origem das doenças mentais (Smith, 1991b). Tem sido sugerido que uma

produção excessiva de monocinas, tais como IL-1, IFN-α e TNF-α, pode ser a causa da depressão; visto que, a administração desses mediadores a pacientes ou voluntários normais produzem, se não todos, a maioria dos sintomas dessa patologia (Smith, 1991b; Kent et alii, 1992). Dessa forma, mediadores presentes em reações inflamatórias, de caráter imune ou não, podem afetar a fisiologia do SNC, levando a alterações comportamentais e(ou) afetivas; e o SNC, por sua vez, através de uma resposta neuro-endócrina, pode influenciar o curso da resposta inicial, fechando o circuito.

Uma das possibilidades estudadas neste trabalho foi o envolvimento de macrófagos peritoneais no controle da resposta migratória de leucócitos, através da capacidade de geração de fatores quimiotáticos, após estimulação dessas células com LPS. A pergunta era, será que macrófagos oriundos de animais dos grupos CHI, CHE e CFD apresentam diferenças funcionais importantes? Seria a redução da migração de leucócitos, principalmente neutrófilos, devida a menor produção de fatores quimiotáticos?

Macrófagos obtidos de ratos controles, isto é, animais do grupo CFD não submetidos a sessão de choques, estimulados *in vitro* com a endotoxina, secretaram no meio de cultura um fator capaz de induzir migração de neutrófilos, quando administrado na cavidade peritoneal de ratos. Este fator se mostrou termolábil e causou migração, mesmo em animais pré-tratados com dexametasona, caracterizando uma atividade MNCF-símile. Estes resultados confirmam os achados do grupo de Ferreira e colaboradores, que propõem a existência de um fator quimiotático derivado de macrófagos, específico para neutrófilos, o MNCF, que difere das demais citocinas quimiotáticas que têm suas atividades, *in vivo*, inibidas pelo tratamento dos animais com corticóides (Cunha & Ferreira, 1987; Faccioli et alii, 1990; Ribeiro et alii, 1990 e 1991). O MNCF é uma lectina, de característica inusitada entre as citocinas até agora descritas, de 56 kD, que se liga especificamente a resíduos de D-Galactose (Dias-Baruffi et alii, 1994).

O fato da atividade ser termolábil afasta a possibilidade de que o efeito observado fosse devido a contaminação dos sobrenadantes por LPS, visto que esta endotoxina é termorresistente e uma potente indutora da migração de neutrófilos quando injetada na cavidade peritoneal de ratos (Cunha & Ferreira, 1987; Flores et alii, 1993). Além disto, como o sobrenadante foi ultrafiltrado em membranas YM 10, a possibilidade de que a atividade seja devido a produtos derivados de macrófagos com peso molecular abaixo de 10 kD, tais como IL-8 e derivados do ácido araquidônico, deve ser improvável.

Quando comparadas com a atividade do sobrenadante de macrófagos obtidos de animais CFD, as atividades quimiotáticas dos sobrenadantes obtidos de monocamadas de macrófagos de animais dos grupos CHE e CHI, estimuladas com LPS, induziram, em média, uma menor migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal de ratos normais, muito embora não se tenham mostrado estatisticamente diferentes, provavelmente, pelo reduzido número de animais utilizados no grupo controle (n=4) e grande variabilidade dos resultados. A redução na atividade do sobrenadante de macrófagos obtidos de animais do grupo CHE foi cerca de 40%. Entretanto, aquela observada com o sobrenadante de macrófagos obtidos de animais do grupo CHI foi de 60%, um índice absolutamente relevante. Portanto, uma redução na atividade do sobrenadante deve, potencialmente, refletir uma menor concentração ou um padrão diferente de secreção de fatores quimiotáticos.

O fato da migração de neutrófilos induzida por Cg ou LPS ter sido reduzida apenas no grupo de animais submetidos a sessão de choques inescapáveis, revela a complexidade dos fatores envolvidos no fenômemo. Provavelmente, a redução na produção e(ou) liberação de fatores quimiotáxicos derivados de macrófagos não seja suficiente para explicar, por si só, o fenômeno. Uma série de outras etapas podem ser afetadas, entre elas a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais e a ativação de leucócitos.

Quando administramos LiCl cronicamente (28 dias) aos animais CFD, CHE e CHI e, no 29° dia, injetamos Cg não encontramos diferenças estatísticas entre os grupos, em relação ao número de neutrófilos. Claramente, o lítio previniu a inibição da migração de neutrófilos no grupo CHI, que se encontrava reduzida nos animais que não receberam tratamento com LiCl (ver figuras 1 e 2). Isto é, o tratamento profilático com LiCl preveniu a inibição da migração dessas células para o foco inflamatório, apenas nos animais submetidos a choques incontroláveis, não alterando a resposta migratória nos grupos controles (CFD) e estressados (CHE).

A seletividade do lítio em afetar apenas animais que receberam choques inescapáveis, pode ser confirmada em observações comportamentais realizadas por Faria & Teixeira (1993) . Estes autores demonstraram que o LiCl, administrado no mesmo esquema de tratamento por nós utilizado, alterou apenas o padrão comportamental dos animais submetidos ao estressor incontrolável (CHI). Isto é, os animais que receberam lítio e foram submetidos a choques inescapáveis, aprenderam a tarefa de fuga no mesmo tempo dos animais CHE e CFD (controles). Portanto, tanto a nível comportamental como o que observamos no desenvolvimento da resposta inflamatória, o lítio modifica apenas as respostas dos animais submetidos a depressão experimental.

Uma possível explicação para este fato poderia ser que a terapia com lítio estaria inibindo a secreção excessiva de GCs encontrada nos animais submetidos aos choques inescapáveis. Contrariando esta hipótese, alguns autores descrevem que o lítio pode aumentar níveis de corticóides em pacientes com doenças psiquiátricas (Barr & Galbraith, 1983; citado em Klemfuss, 1992). Alternativamente, pode-se sugerir que o lítio esteja aumentando a sensibilidade do hipotálamo aos altos níveis de GCs, proporcionando uma readaptação do eixo HHA, capacitando-o agora, a um controle negativo da liberação de GCs; com isto podendo restabelecer o número de leucócitos circulantes.

Uma segunda hipótese para se explicar a prevenção da inibição de migração de células para o foco inflamatório, seria o efeito do lítio a nível de estimulação de células pluripotentes ou o efeito inibidor sobre células supressoras da hematopoiese (Barr & Galbraith, 1983; Prakash, 1985), produzindo uma leucocitose. Porém, nossos resultados mostraram que o tratamento com LiCl, em animais normais, não alterou o número de leucócitos totais circulantes quando comparados com o número presente em animais não tratados. A razão para esta diferença, em relação aos dados de literatura, talvez seja devida ao modo de administração da droga e a espécie de animal utilizada. No entanto, os níveis séricos de lítio obtidos com o tratamento (0,4 - 0,8 mEq/l) são compatíveis com os níveis de lítio no soro de pacientes submetidos ao tratamento profilático (Faria & Teixeira, 1993).

A literatura mostra a importância do AMPc na função celular, sendo este capaz de inibir a proliferação de linfócitos e sua citotoxicidade, inibir secreção de citocinas, produção de anticorpos e ainda afetar a motilidade celular (Coffey & Hadden, 1985). É possível que a estimulação β-adrenérgica, que já foi mostrada estar relacionada com o aumento nos níveis de AMPc durante o estresse agudo, pode induzir a um aumento na síntese de AMPc durante o estresse crônico (Okada et alli, 1983). Diante aos choques agudos inescapáveis, temos a hipótese de que os leucócitos de animais do grupo CHI estejam com níveis elevados de AMPc, tendo portanto, a locomoção de leucócitos alterada, o que pode acarretar uma menor migração de células para o foco inflamatório, observada neste grupo. Sabendo-se que o lítio age a nível de segundos mensageiros, inibindo o adenilato ciclase, e como consequência diminui os níveis alterados de AMPc, sendo que este efeito leva a normalização da locomoção de leucócitos (Perez et alli, 1980; Anderson et alli, 1982; Klemfuss, 1992); temos a hipótese de que a prevenção da inibição de migração de leucócitos nos animais CHI, tratados com lítio, possa estar relacionada com este processo.

Foi demonstrado que o LiCl afeta os mecanismos intracelulares de transdução de sinais (Worley et alli, 1988; Jope & Williams, 1994). Estes sinais resultam da clivagem de fosfolipídeos de membrana, produzindo IP_3 (trifosfato de inositol) e o DAG (diacilglicerol). O IP_3 mobiliza cálcio intracelular de mitocôndrias e reticuloendoplasmático; tendo este importância nos mecanismos de secreção e locomoção celular. O aumento de cálcio livre no citosol, juntamente com o DAG, ativam a proteína quinase-C, responsável pela divisão e proliferação celular. A liberação diminuída de cálcio no citosol também inibe a produção e secreção de IL-2 e isto é restaurado pelo lítio (Wu & Cai, 1992; Kucharz et alli, 1993). Por afetar o metabolismo dos fosfatidilinositóis, especula-se que o lítio também possa aumentar a secreção de TNFα, por aumentar a expressão de RNAm para TNFα (Kleinerman et alli, 1989). De acordo com esta hipótese, nossos resultados mostram que o sobrenadante de monocamadas de macrófagos de animais que receberam choques inescapáveis e tomaram lítio cronicamente, apresentou maior capacidade de migração de neutrófilos quando este sobrenadante era injetado em cavidades peritoneais de ratos normais, sugerindo que houve uma restauração na produção e (ou) secreção de fatores quimiotáxicos quando estes são comparados com a atividade quimiotáxica diminuída nos animais do grupo CHI não tratados com lítio. A capacidade migratória deste grupo tratado apresentou-se potenciada em relação ao controle (CFD).

Aparentemente, a atividade do sobrenadante do grupo CFD tratado com lítio estava menor que a atividade deste mesmo grupo sem tratamento, no entanto, pelos métodos estatísticos empregados não foi encontrada diferença significativa. Este fato pode ter ocorrido, provavelmente, pelo reduzido número de animais utilizados e pela grande variabilidade dos resultados encontrados no grupo não tratado. Ainda temos a hipótese de que o lítio esteja alterando a produção e(ou) secreção de alguns fatores liberados por células do grupo controle (CFD) tratado com lítio, visto que, neste caso, o lítio inibiu a atividade migratória encontrada em CFD sem tratamento quando se injetava o sobrenadante em animais pré-tratados com dexametasona (figura 6).

Portanto, observamos que tanto os choques como o tratamento com LiCl inibiu a atividade MNCF-símile, encontrada somente nos animais controles (CFD) que não receberam lítio.

Quando o sobrenadante foi aquecido (100°C/20 min), a atividade dos três grupos experimentais tratados, mostrou-se termolábil; afastando, mais uma vez, o risco de contaminação do sobrenadante pela endotoxina utilizada na estimulação dos macrófagos para liberação de fatores.

Em conclusão, nossos resultados demonstram que o estresse e a depressão experimental causam uma mobilização inadequada de células inflamatórias, alterando a resposta inespecífica de defesa. O padrão de liberação de fatores quimiotáxicos, de células responsáveis pelo início desta resposta, também se encontra quantitativamente e qualitativamente alterado. Sugerimos que estas alterações estejam ocorrendo provavelmente por uma desregulação do eixo HHA, com liberação excessiva de glicocorticóides e(ou) por ação direta na fisiologia celular através de alterações a nível de segundos mensageiros, com consequentes mudanças na secreção de fatores quimiotáxicos por células peritoneais residentes; e(ou) por alterações na expressão de proteínas de adesão por leucócitos ou células endoteliais.

Também mostramos que a terapia com cloreto de lítio, uma droga antidepressiva que previne o quadro de depressão (endógena ou experimental), impede as alterações destas respostas inespecíficas de defesa diante à depressão experimental.

ABSTRACT

Depression is known to affect the development of various physiological functions, including the immune system. Of the various experimental models available for studying depression, the learned heplessness model has been extensively utilized.

In the present work, we have examined the influence of experimental depression and its reversal by treatment with LiCl on the inflammatory response. The latter was assessed by quantifying the migration of monocytes and neutrophils into the peritoneal cavity of treated rats.

Female Wistar rats (±200 g in weight) were divided into three groups as follows: Group 1 : **stressed** rats which received 60 escapable 1mA shocks at a frequency of one shock every 30 s; Group 2 : **helpless** rats wich had received inescapable shocks of the same intensity and frequency as the Group 1 animals; Group 3 : **control** animals which received no shocks. In all groups, neutrophil migration into the peritoneal cavity was evaluated 4h after the injection of eitheir carrageenin (150 μg/cavity) or LPS (100ng/cavity) while the migration of monocytes was assessed 96h after an i.p. injection of 5-10 ml of 3% solution of thioglycollate.

Only in the helpless rats was there any significant inhibition of leukocyte migration. This inhibition could be prevented by pretreating (28 days) the rats with 20 mM LiCl in the drinking water.

We suggest that the depression and its prophylaxis by LiCl treatment are affecting the release of chemotactic factors for neutrophils and monocytes by peritoneal resident cells.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMAT, J.; TORRES, R. A. & LECHÍN, F. Differential effect of footshock stress on humoral and cellular immune responses of the rat. *Life Sciences*; 53: 315; 1993.

ANDERSON, R.; WALTERS, L.; GRABOW, G.; VAN DER MERWE, M. & VAN RENSBURG, C. E. The effects of lithium on the functions of human neutrophils and lymphocytes *in vitro* and *in vivo*. *SA Medical Journal*; 62: 519; 1982.

ANISMAN, H. & ZACHARKO, R. M. Depression: predisposing influence of stress. *Behavioral and Brain Science*, 5: 89; 1982.

ANKE, M.; ARNHOLD, W.; GROPPEL, B. & KRAUSE, U. The biological importance of lithium. In: Lithium in Biology and Medicine, pp. 148-167, Schrauzer, G. N. & Klippel, K. F. (eds); *VCH Publishers*; 1991.

BARR, R. D. & GALBRAITH, P. R. Lithium and hematopoiesis. *Can. Med. Assoc. J.*; 128: 123, 1983.

BAUHMANN, H. & GAULDIE, J..The acute phase response. *Immunology Today*, 15(2): 74;1994.

BENBEHANI, K.; BELLER, D. I. & UNANUE, E. I. The effects of beryllium and other adjuvants on Ia expression by macrophage. *J. Immunol.*, 134: 2047, 1985.

BERRIDGE, M. J.; DOWNES, C. P. & HANLEY, M. R. Lithium amplifies agonist-dependent phosphatidilinositol responses in brain and salivary glands. *Biochem. J.*; 206: 587; 1982.

BEVILACQUA, M. P.; STENGALIN, S.; GIMBRONE, M. A. & SEED, B. Endothelium leukocyte adhesion molecule-1: an inducible receptor for

neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. *Science*, vol. 243: 1160; 1989.

BEYAERT, R.; HEYNINCK, K.; DE VALCK, D.; BOYKENS, F.; VAN ROY, F. & FIERS, W. Enhancement of Tumor Necrosis Factor cytotoxicity of lithium chloride is associated with increased inositol phosphate accumulation. *The Journal of Immunology*; 151(1): 291; 1993.

BILINGHAN, M. E. J. & GORDON, A. H. The role of acute phase reaction in inflammation. *Handbook of Experimental Pharmacology* 50/I, Vane, J.R. and Ferreira,S.H. (eds).*Sprienger-Verlag*, Berlin, 1978.

BILLE, P. E.; JENSEN, M. K.; KAALUND-JENSEN, J. P. & POULSEN, J. C. Studies on the hematologic and cytogenetic effect of lithium. *Acta Med. Scan.*; 198: 281; 1975.

BLALOCK, J. E.; SMITH, E. M. & MEYER III, W. J. The pituitary-adrenocortical axis and the immune system. *J. Clinical Endocrinology and Metabolism,* 14 (4): 1021; 1985.

BOSCHETTO, P.; MUSAJO, F. G.; TOGNETTO, L.; BOSCARO, M.; MAPP, C. E.; BARNES, P. J. & FABBRI, L. M. Increase in vascular permeability produced in rat airways by PAF: potentiation by adrenalectomy. *Br. J. Pharmacol.*; 195: 388; 1992.

BRAIN, S. D. & WILLIAMS, T. J. Inflammatory oedema induced by synergism between calcitonin gen-related peptide (CGRP) and mediators of increase vascular permeability. *Br. J. Pharmacol.*, vol. 86: 855, 1985.

BROIDE, D. H. Inflammatory cells: structure and function. In: *Basic and Clinical Immunology,* Stites, D.D. and Terr, A.I. (eds), Appleton & Lange Edt.,pp 141-183, 1991.

BROWN, E. J. & GOODWIN, J. L. Characterization of the Arg-Gly-Asp bindings proteins of human monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J. Exp. Med.*, 167: 777, 1988.

CALABRESE, J. R.; KLING, M. A. & GOLD, P. W. Alterations in Immunocompetence during stress, bereavement and depression: focus on neuroendocrine regulation. *Am. J. Psychiatry*; 144(9): 1123; 1987.

CARLOS, T. M. & HARLAN, J. M. Membrane protein involved in phagocyte adherence to endothelium. *Immunol. Rev.*, 114:5, 1990.

CHROUSOS, G. P. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. *The New England Journal of Medicine*; 332(20): 1351; 1995.

COFFEY, R. G. & HADDEN, J. W. Neurotransmitters, hormones, and cyclic nucleotides in lymphocyte regulation. *Fed. Proc.*; 44: 112; 1985.

CRONSTEIN, B. N. & WEISSMAN, G. The adhesion molecules of inflammation. *Arthrits and Rheumatism*, vol.136(2): 147; 1993.

CUNHA, F. Q. & FERREIRA, S. H. The release of neutrophil chemotactic factor from peritoneal macrophages by endotoxin: inhibition by glucocorticoids. *Eur. J. Pharmacol.* 129: 65, 1986.

CUNHA, F. Q.; HELUY-NETO, N. E.; KLEIN, A.; SOUZA, G. E. P. & FERREIRA, S. H. Failure of PAF-acether to induce *in vivo* neutrophil migration. *Agents and Actions*, 25 (1/2): 191, 1988.

CUNNINGHAM-Jr, E. T. & DE SOUZA, E. B. Interleukin-1 receptor in the brain and endocrine tissues. *Immunology Today*, 14 (4): 171; 1993.

CYBULSKY, M. I.; COLDITZ, I. G. & MOVAT, A. Z. The role of interleukin-1 in neutrophil leukocyte emigration induced by endotoxin. *Am. J. Pathol.*, 124: 367, 1986.

DALE, M. M. & FOREMAN, J. C. Introduction of immunology and pathology of host defense mechanisms. In: Textbook of Immunopharmacology; Dale, M. M. & Foreman, J. C.(eds). *Blackwell Scientific Publications* (2nd ed.), pp 1-16; 1989.

DANTZER, R. & KELLEY, K. W. Stress and immunity: an integrated view of relationship between the brain and the immune system. *Life Sciences*, 44 (26): 1995, 1989.

DERIJK, R. & BERKENBOSCH, F. The immune-hipothalamo-pituitary-adrenal axis and autoimmunity. *Intern. J. Neuroscience*, 59: 91; 1991.

DIAS-BARUFFI, M.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. & ROQUE-BARREIRA, M. C. Macrophage-release neutrophil chemotactic factor (MNCF) induces PMN-neutrophil migration through lectin-like activity. Agents and Actions; 38: C54, 1993.

DINARELLO, C. A. Interleukin-1 and the pathogenisis of the acute phase response. *New England Journal of Medicine*, 311(22): 1413, 1984.

DINARELLO, C.A.. Molecular mechanisms in endotoxin fever. *Agents and Actions*, 13 (5/6): 470, 1983.

FACCIOLI, L. H.; SOUZA, G. E. P.; CUNHA, F. Q.; POOLE, S. & FERREIRA, S. H. Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factors induce neutrophil migration *in vivo* by indirect mechanisms. *Agents and actions*, 30 (3/4) :344, 1990.

FARIA, M. S. & TEIXEIRA, N. A. Reversal of learned helplessness by chronic lithium treatment at a prophylactic level. *Brasilian J. Med. Res.*, 26: 1201, 1993.

FERREIRA, S. H. Are macrophages the body's alarm cells? *Agents and Actions;* vol 10/3: 229; 1980.

FERREIRA, S. H., LORENZETTI, B.B., CUNHA, F.Q. & POOLE, S. Bradykinin release of TNF-α plays a key role in the development of inflammatory hyperalgesia. *Agents and Actions*, 38: C7,1993.

FERREIRA, S.H. Prostaglandin hyperalgesia and the control of inflammatory pain. In: Bonta,I.L., Bray,M.A. and Parnham,M.J. (Eds), *Pharmacology of inflammation,* Elsevier, pp.107, 1985.

FLORES, C. A.; ZAPPELINI, A. & PRADO-FRANCESCHI, J. Lipoxygenase-derived mediators may be involved in *in vivo* neutrophil migration induced by *Bothrops erythromelas and Bothrops alternatus. Toxicon,* 31: 1551, 1993.

FLOWER, R. J. Lipocortin and the mechanisms of action of glucocorticoids. *Br. J. Pharmacol.*, 94: 987; 1988.

FLOWER, R. J.; PARENTE, L.; PERSICO, P. & SALMON, J. A. A comparison of the acute inflammatory response in adrenalectomised and sham-operated rats. *Br. J. Pharmacol.*; 87: 57; 1986.

FLOWER, R.J. Lipocortin. *Prog. Clin. Biol.* Res., 349: 11; 1990.

FORTES, Z. B., OLIVEIRA, M. A., SCIVOLETTO, R., CARVALHO, M. H. C., de NUCCI, G. & NIGRO, D. Nitric oxide release may be involved in microcirculatory response to acetilcholine. *Eur. J. Pharmacol.*, 182: 143; 1990.

FRIEDENBERG, W. A. & MARX, J. J. The effect of lithium carbonate on granulocyte and platelet function. *Cancer*, 45: 91; 1980.

GARCIA-LEME, J. & SHAPOVAL, E. E. S. Stimulation of hypothalamo-pituitary-adrenal axis by compounds formed in inflamed tissue. *Br. J. Pharmacol.*, 53: 75; 1975.

GARCIA-LEME, J. The neuroendocrine and nervous systems in inflammation: pharmacological considerations. In : Bonta, I. L.; Bray, M. A. & Pahan, M. J. (edts). *Handbook of Inflammation*, vol. 5. Amsterdan-Netherlands Elsevier, cap. 11, pp. 195, 1985.

GARCIA-LEME, J.; Regulatory mechanisms in inflamation news aspects of autopharmacology. *Gen. Pharmac.*,12:15; 1980.

GLYNN, L. E. Regeneration and repair. In: Vane, J.R. and Ferreira, S.H. (Eds). *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 50/I , Sprienger-Verlag, pp. 206, 1978.

GOLDSTEIN, R. A.; BOWEN, D. L. & FAUCI, A. S. Adrenal corticosteroids. In: Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates (2nd ed.); Gallin, J. I.; Goldenstein, I. M. & Snyderman, R. (eds).New York, *Raven Press Ltda*; 55: 1061- 1082; 1992.

GORDON, S. Biology of macrophages. *J. Cell. Sci. Suppl.*, vol. 4: 267; 1986.

HARKNESS, R. A. The caracteristic cell of acute inflammation: The poymorphonuclear neutrophil leukocyte, and its biochemistry. *Molec. Aspects Med.* vol 4(3/4): 191; 1981.

HARLAN, J. M. Leukocyte-endothelial interations. *Blood*, vol. 65:513; 1985.

HELUY-NETO, N. E. Efeito da adrenalectomia sobre a migração de monócitos para as cavidades pleural e peritoneal. Tese de mestrado apresentada no Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, sob orientação do Prof. Dr. Fernando Queiróz Cunha, 1994.

HOGG, N. The leukocyte integrins. *Immunol.Today*, 10 (4): 11, 1989.

HUA, XIAO-YING. Tachykinins and calcitonin gene-related peptide in relation to peripheral functions of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Acta Physiologica Scandinavia* , (supl.), vol. 551:1, 1986.

HURLEY, J.V. The sequence of early events. In: Vane, J.R. and Ferreira, S.H. (Eds). *Handbook of Experimental Pharmacology* , vol. 50/I, Sprienger- verlag, pp. 26, 1978.

HYNES, R. V. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell,* 48: 549, 1987.

IRWIN, M. R.; VALE, W. & BRITTON, K. T. Central corticotropin releasing factor suppresses natural killer cytotoxicity. Brain Behavioral Immunology; 1: 81; 1987.

ISSEKUTZ, A. C. & LOPES, N. Endotoxin activation of endothelium for polymorphonuclear leukocyte transendothelial migration and modulation by IFN-γ. *Immunology*, 79: 600, 1993.

JONES, J. M.; YERALLAN, O.; HINES, G.; MAHER, M.; ROBERTS, D. W. & BENSON, R. W. Effects of lithium and rubidium on immune responses of rats. *Toxicology Lettres*; 52: 163; 1990.

JOPE, R. S. & WILLIAMS, M. B. Lithium and brain signal transduction systems. *Biochem. Pharmacol.*, 47(3): 429, 1994.

KAMPSCHIMIDT, R. F.. Metabolic alterations elicited by endogenous pyrogens. In: *Fever,* Lipton,J.M. (ed). Raven Press, pp.49, 1980.

KLEINERMAN, E. S.; KNOWLES, R. D.; BLICK, M. B. & ZWELING, L. A. Lithium chloride stimulates human monocytes to secret Tumor Necrosis Factor/ Cachectin. *Journal of Leukocyte Biology*; 46: 484; 1989.

KLEMFUSS, H. Rhythms and the pharmacology of lithium. *Pharmacol. Ther.*; 56: 53; 1992.

KLUGER, M. J. Fever: role of pyrogens and cryogens. *Physiol. Rev.*, 71: 93; 1991.

KUCHARZ, E. J.; SIERAKOWSKI, S. J. & GOODWIN, J. S. Lithium *in vitro* enhances interleukin-2 production by T cells from patients with systemic lupus erythematosus. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*; 15(5): 515; 1993.

LANDENSLAGER, M. L.; RYAN, S. M.; DRUGAN, R. C.; HYSON, R. L. & MAIER, S. F. Coping and Immunossuppression: inescapable but not escapable shock suppresses lymphocyte proliferation. *Science*; 221: 568; 1983.

LAUE, L.; KAWAI, S.; BRANDON, D. D.; BRIGHTWELL, D.; BARNES, K.; KNAZEK, R. A.; LORIAUX, D. L. & CHROUSOS, G. P. Receptor-mediated effects of glucocorticoids on inflammation: enhacement of inflammatory response with a glucocorticoid antagonist. *J. Steroid Biochem.*; 29(6): 591; 1988.

LLOYD, C. Life events and depressive disorders reviewed. Events as predisposing factors. *Archives General Psychiatry*, 37: 541, 1980.

LORENZETTI, B.B. & FERREIRA, S.H. Mode of analgesic action of dipyrone: direct antagonism of inflammatory hyperalgesia. *European Journal of Pharmacology*; vol. 114: 375; 1985.

LUMPKIN, M. D. The regulation of ACTH secretion by IL-1. *Science*, 238: 452; 1987.

LYMAN, G. H.; WILLIAMS, C. C.; PRESTON, D.; GOLDMAN, A.; DINWOODIE, W. R.; SABA, H.; HARTMANN, R.; JENSEN, R. & SHUKOVSKY, L. Lithium carbonate in patients with small cell lung cancer receiving combination chemotherapy. *Am. J. Med.*; 70: 1222; 1981.

MACKAY, C. R. & IMHOF, B. A. Cell adhesion in the immune system. *Immunology Today*, vol. 14(3): 99; 1993.

MAIER, S. F. & SELIGMAN, M. E. P. Learned helplessness: theory and evidence. *Journal of Experimental Psychology*, 105: 3, 1976.

MAJNO, G. Inflammatory mediators: Where are they going? In: Higgs, G.A. & Williams,T.J. (eds). *Inflamatory mediators. Macmillan.* pp. 1-6, 1985.

MALLOY, N. L.; ZAUBER, N. P. & CHERVENICK, P. A. The effect of lithium on blood and marrow neutrophils. *Blood*; 52(supl.): 228; 1978.

MAYHAN, W. G. Role of nitric oxide in modulation permeability of hamster cheeck pouch in response to adenosin 5- diphosphate and bradikinin. *Inflammation*, 16: 295; 1992.

McEVER, R. P. Leukocyte endothelium cell interations. *Current Opnion in Cell Biology*, 4: 840; 1992.

McEVER, R. P. Leukocyte interactions mediated by selectins. *Thromb. Haemost.*, 66: 80; 1991.

MING, W. J.; BERSANI, L. & MANTOVANI, A. Tumor necrosis factor is chemotactic for monocytes and polymorphonuclear leukocytes. *J. Immunol.*, 138 (5): 1469; 1987.

MUNCK, A.; GUYRE, P. M. & HOLBROOK, N. I. Physiological functions of glucocorticoid in stress and their relationship to pharmacological actions. *Endocrine Reviews*, 5: 25; 1984.

NAKAMURA, M. & FERREIRA, S.H. Peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. *European Journal of Pharmacology*;135: 145; 1987.

NATHAN, C. F. Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest.*, 79:319; 1987.

NELSON, J. C. & CHARNEY, D. S. The symptoms of major depression. *Am. J. Psychiat.*; 138: 1; 1981.

OKADA, F.; HONMA, M. & UR, M. Plasma cyclic nucleotide responses to physiological stress in normal and neurotic subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*; 57: 786; 1983.

OSBORN, L. Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation. *Cell,* 62:3; 1990.

OWENS, M. J. & NEMEROFF, C. B. Physiology and Pharmacology of corticotropin-releasing-factor. *Pharmacological Reviews*, 43(4): 426; 1991.

PANERAI, A. E. Cognitive and Noncognitive stress. *Pharmacol. Research,* 26 (3): 273; 1992.

PARKER, J.; SMARR, K.; ANDERSON, S.; HEWETT, J.; WALKER, S.; BRIDGES, A. & CALDWELL, W. Relationship of changes in helplessness and depression to disease activity in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.*, 19: 1901; 1992.

PEERS, S. H.; SMILLIE, F.; ELDERFIELD, A. J. & FLOWER, R. J. Glucocorticoid and non-glucocorticoid induction of lipocortins (annexins) 1 and 2 in rat peritoneal leukocytes *in vivo. Br. J. Pharmacol.*, 108: 66; 1993.

PEREZ, H. D.; KAPLAN, H. B.; GOLDSTEIN, I. M.; SHENKMAN,L. & BORKOWSKY, R. Reversal of an abnormality of polimorphonuclear leukocyte chemotaxis with lithium. *Clin. Immun. Immunopath.*; 16: 308; 1980.

PERRETI, M.; BECHERUCCI, C.; SCAPIGLIATI, G. & PARENTE, L. The effect of adrenalectomy on interleukin-1 release *in vitro* and *in vivo. Br. J. Pharmacol.*; 98: 1137; 1989.

PERSON, M. G.; GUSTAFSON, L. E.; WIKLUND, N. P.; HEDQVIST, P. & MONCADA, S. Endogenous nitric oxide as a modulator of rabbit skeletal muscle microcirculation *in vivo. Br. J. Pharmacol.*, 100: 463; 1990.

PRAKASH, R. A review of the hematologic side effects of lithium. *Haemat. Commun. Psychy.*; 36: 127; 1985.

PRAKASH, R.; SETHI, N. & AGRAWALL, S. S. A case report of megaloblastic anemia secondary to lithium. *American Journal of Psychiatry*; 138: 849; 1981.

RAZ, A.; SHARAR, A. & GOLDMAN, R. Characterization of an *in vivo* induced peritoneal macrophages population following intraperitoneal injection of concanavalin-A. *J. Reticulo Endoth. Soc.*, 22:445, 1977.

RESTAK, R. M. The brain depression and the Immune System. *J. Clin. Psychiatry,* 50 (5): 23; 1989.

RIBEIRO, R. A.; CUNHA, F. Q. & FERREIRA, S. H. Recombinant gama interferon causes neutrophil migration mediated by the release of a macrophage neutrophil chemotactic factor. *J. Exp. Pathol.*, 71: 717; 1990.

RIBEIRO, R. A.; FLORES, C. A.; CUNHA, F. Q. & FERREIRA, S. H. IL-8 causes *in vivo* neutrophil migration by a cell-dependent mechanism. *Immunol.*, 73: 472; 1991.

RICHMAN, C. M.; MAKII, M. M. & WEISNERR, P. A. The effect of lithium carbonate on chemotherapy-induced neutropenia and trombocytopenia. *American Journal of Haematology*, 16: 313; 1984.

ROCHA e SILVA, M.O. Brief history of inflammation. In: Vane, J. R. and Ferreira, S.H. (Eds). *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 50/ I, Sprienger-Verlag, pp. 6-25, 1978.

ROTHWELL, N. J. Mechanisms of the pyrogenic actions of cytokines. *Eur. Cytokine Net.*, 1: 211, 1990.

SANDI, C.; BORREL, J. & GUAZA, C. Behavioral, Neuroendocrine and Immunological outcomes of escapable or inescapable shocks. *Physiological and Behavior*, 51 (5): 651; 1992.

SEDGWICK, A. D. & WILLOUGHBY, D. A. Animals models for testing drugs on inflammatory and hipersensivity reactions. Em: Dale, M. M. and Foreman, J. C. (eds). *Textbook of Immunopharmacology* (2nd ed). Oxford, Blackwell Scientific Publication, cap. 22, pp. 253, 1989.

SEDGWICK, A. D. e WILLOUGBY, D. A. Initiation of the inflammatory response and its prevention. In: Bonta, I. L., Bray, M. A. and Parnhan, M. J. (Eds). *Handbook of Inflammation,* vol.5, Elsevier, pp. 27-47, 1985.

SELIGMAN, M. E. P. Helplessness, a depression development and death. Freeman, W. H. (ed), *San Francisco and London*, 1975.

SHAVIT, Y.; YIRMIYA, R. & BEILIN, B. Stress neuropeptides, immunity and neoplasia. In: Serem, F. (ed) : *The Neuroendocrine-Immune Network*, Boca Raton, Flórida, chaper 12: 164-175; 1990.

SHUIT, K. E. & KREBS, R. E. Depressed blood neutrophil response to lithium stimulation in newborn rats. *Journal of the Reticuloendothelial Society*; 31: 523; 1982.

SILVESTRINI, B. Trazodone- A new type of antidepressant: A discussion of pharmacological data and their clinical implications. In: *Typical and Atypical antidepressants: molecular mechanisms*. Costa, E. and Racagni, G.(eds), Raven Press, New York, pp. 327; 1982.

SMITH, C. W.; KISHIMOTO, T. K.; ABBASS, O.; HUGHES, B.; ROTHLEIN, R.; McINTERE, L. V.; BUTCHER, E. & ANDERSON, D. C. Chemotactic factors regulated lectin adhesion molecule 1 (LECAM-1) dependent neutrophil adhesion to cytokine-stimulated endothelial cells in vitro. *J. Clin. Invest.*, 87: 609, 1991.

SMITH, C. W.; ROTHELEIN, R.; HUGHES, B. J.; MARISCALCO, M. M.; SCHMALSTIEGE, F. C. & ANDERSON, D. C. Recognition of endothelium determinant for CD 18 -dependent neutrophil adherence and transendothelial migration. *J. Clin. Invest.*, 82: 1746; 1988.

SMITH, E. M.; MORRIL, A. C.; MEYER III, W. J. & BLALOCK, J. E. Corticotropin-Releasing-Factor inductin of leukocyte-derived immunoreactive ACTH and endorfins. *Nature*, 322: 881; 1986.

SMITH, M. J. H.; FORD-HUTCHINSON, A. W. & BRAY, M. A. Leukotriene B: A potential mediators of inflammation. *J. Pharmacol.*, 32 : 517; 1980.

SMITH, R. S. The immune system is a key factor in the etiology of psychosocial disease. *Medical Hypotheses*; 34: 49; 1991-b.

SMITH, R. S. The macrophage theory of depression. *Medical Hypotheses*; 35: 298; 1991-a.

SNYDERMAN, R. & UHING, R. J. Chemoattractant stimulus-response coupling. In: Inflammation : Basic Principles and Clinical correlates. Gallin, J. I.; Goldestein, I. M. & Snyderman, R. (eds), 2 nd edition; *Raven Press*, New York, p. 421; 1992.

SOUZA, G. E. P.; CUNHA, F. Q.; MELO, R. & FERREIRA, S. H. Neutrophil migration induced by inflammation stimuli is reduced by macrophage depletion. *Agents and Actions*, 24 (3/4): 377; 1988.

STAUNTON, D. E.; DUSTIN, M. L.; ERICKSON, H. P. & SPRINGER, T. A. The arrangement of immunoglobulin-like domains of ICAM-1 and the binding sites for LFA-1 and rhinovirus. *Cell*, 61: 243, 1990.

STEEG, P. S.; JOHNSON, H.M. & OPPENHEIM, D. O. Regulation of murine macrophage Ia antigen expression by an immune interferon-like lymphokine inhibitory effect of endotoxin. *J. Immunol.*, 129: 2402, 1982.

STEIN, M. Stress, Depression, and the Immune System. *J. Clin. Psychiatry*, 50 (5): 35; 1989.

STEIN, M.; KELLER, S. E. & SCHLEIFER, S. J. Stress and immunomodulation: the role of depression and neuroendocrine function. *The Journal of Immunology*, 135(2): 827; 1985.

STENBERG, V. I.; BOULEY, M. G.; KATZ, B. M.; LEE, K. J. & PARMAR, S. S. Negative endocrine control system for inflammation in rats. *Agents and Actions*, 29 (3/4): 189; 1990.

TAKEMURA, R. & WERB, Z. Secretory products of macrophages and their physiological functions. *Am. J. Physiol.*, 246(15): C1, 1984.

TECOMA, E. S. & HUEY, L. Y. Psychic distress and the immune response. *Life Sciences*; 36: 1799; 1985.

TISMAN, G.; HEBERT, V. & ROSENBLATT, S. Evidence that lithium induces human granulocyte proliferation elevated serum vitamin B_{12} binding capacity and vivo and granulocyte colony proliferation *in vitro*. *Br. J. Haematol.*; 24: 767; 1973.

TURKOZKAN, N.; DURMUS, O. & BORAN, N. Biochemical investigation of leukocyte functions during lithium therapy. *Int. J. Biochem.*; 25(10): 1501; 1993.

UNANUE, E. R. & ALLEN, P. M. The basis for immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. *Science*, 236: 551; 1987.

VAN FURTH, R. Current view on the mononuclear phagocyte system. *Immunobiology*, vol. 161: 178; 1982.

VAN FURTH, R. Mononuclear phagocytes in inflammation. In: Vane, J. R. & Ferreira, S. H. (eds). *Handbook of Experimental Pharmacology*, vol. 50/1, Sprienger-Verlag, pp. 68: 1978.

VAN FURTH, R. Origin and turnover of monocytes and macrophages. Currents Topics in Pathology, 79: 125; 1988.

VIJAYAKUMAR, R. K., PALANIVEL, V. & MUTHUKKARUPPAN. Influence of carrageenan in peritoneal macrophages. *Immunology Letters*, 23:55, 1989.

WAAGE, A.; SLUPPAUG, G. & SHALABY, R. Glucocorticoids inhibit the production of IL-6 from monocytes, endothelial cells and fibroblasts. *Eur. J. Immunol.*; 20: 2439; 1990.

WEISS, J. M.; BAILEY, M. H.; GOODMAN, P. A.; HOFFMAN, L. J.; AMBROSE, M. J.; SALMAN, S. & CHARRY, J. M. A model for neurochemical study of depression. In: *Behavioral Models and Analysis of Drug Action.* Spiegelstein, M. Y. & Levy, A. (eds), Elsevier, Amsterdam, pp. 195; 1982.

WEISS, J. M.; SUNDAR, S. K.; BECKER, K. J. & CIERPIAL, M. A. Behavioral and neural influences on cellular immune responses: effects of stress and interleukin-1. *J. Clin. Psychiatry*, 50(5): 43; 1989.

WERB, Z.; CHIN, J. R. & TAKEMURA, R. The cell and molecular biology of appoliprotein and syntesis by macrophages. *Biochemistry of Macrophage: CIBA Foundation Symposium*; 118: 155; 1986.

WILKINSON, P. C. Cellular acumulation and Inflammation. Em: Dale, M. M. and Foreman, J. C. (edts). *Textbook of Immunopharmacology* (2nd ed), Oxford, Blackwell Scientific Publication, cap. 18, pp. 217, 1989.

WILLIAMS, T.J. Mechanisms of inflammatory oedema formation. In: Dale,M.M. and Foreman,J.C. (Eds) *Textbook of a Immunopharmacology,* Blackwell Scientific Publications, pp. 210-216, 1984.

WILLNER, P. Animal models of depression: An overview. *Pharmacology and Therapeutics,* 45:425; 1990.

WILLNER, P. Validating criteria for animal models of human mental disorders: Learned Helplessness as a paradigm case. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry;* 10: 677; 1986.

WORLEY, P. F.; HELLER, W. A.; SNYDER, S. H. & BARABAN, J. M. Lithium blocks a phosphoinositide-mediated cholinergic response in hippocampal slices. *Science*; 239: 1428; 1988.

WU, Y. & CAI, D. Study of the effect of lithium on lymphokine-activated Killer cell activity and its antitumor growth. *Soc. Exp. Biol. and Med.*; 201: 284; 1992.

WU, Y. & YANG, X. Enhancement of interleukin-2 production in human and Gibbon T cells after *in vitro* treatment with lithium. *Soc. Exp. Biol. and Med.*; 198: 620; 1991.

ZAMPRONIO, A. R.; SOUZA, G. E. P.; SILVA, C. A. A.; CUNHA, F. Q. & FERREIRA, S. H. Interleukin-8 induces fever by a prostaglandin-independent mechanism. *Am. J. Physiol.*, 266(35): R1670; 1994.

...e a vida continua...