SOLANGE APARECIDA MALACRIDA

EFEITOS DO ESTRESSE SOBRE O CRESCIMENTO E DIFERENCIAÇÃO DAS CÉLULAS PRECURSORAS DA MEDULA ÓSSEA (CFU-C) EM RATOS

Orientadora: Prof. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz
Co-Orientadora: Prof. Dra. Nancy Airoldi Teixeira

Este exemplar corresponde à versão final da tese de Mestrado, apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do título de Mestre em Ciências, na Área de Farmacologia da Bióloga Solange Aparecida Malacrida.

Campinas, 05 de dezembro de 1996

Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz
- Orientadora -

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências na área de Farmacologia

Campinas - SP

1996

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE BC
N.º CHAMADA TIUNICAMP
M29e
V. Ex.
TOMBO BC/ 30253
PROC. 281/97
C D
PREÇO R$ 11,00
DATA 20/05/97
N.º CPD

CM-00097720-7

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS UNICAMP

Malacrida, Solange Aparecida

M29e Efeitos do estresse sobre o crescimento e diferenciação das células precursoras da medula óssea (CFU-C) em ratos / Solange Aparecida Malacrida. Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador : Mary Luci de Souza Queiroz

Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Glândulas supra - renais. 2. Hematopoese . 3. Drogas . I. Mary Luci de Souza Queiroz. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

UNICAMP

Banca examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:

Profa. Dra. Mary Lucia de Souza Queiroz

Membros:

1. Profa. Dra. Mary Lucia de Souza Queiroz
2. Prof. Dr. Ramon Kameno
3. Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos

Curso de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data:

05/12/96.

Dedico este trabalho

À minha família e ao Marinho
com carinho

AGRADECIMENTOS

Esta tese é fruto da participação direta e indireta de inúmeras pessoas e a todas elas desejo expressar o meu profundo sentimento de gratidão. Em especial:

À professora orientadora Dra. Mary Luci de Souza Queiroz, que pacientemente compreendeu as minhas ansiedades, apoiando, orientando e estimulando a realização desse trabalho com carinho e paciência.

À professora Dra. Nancy Airoldi Teixeira pela co-orientação, valiosas discussões e incentivo.

Aos professores da banca pela leitura e valiosas sugestões.

Aos profissionais e colegas do laboratório de CFU, pelo auxílio e cooperação no decorrer das minhas aitividades.

Ao técnico Adilson pelo auxílio e disposição durante a realização dos experimentos.

Aos amigos Luiz Di Vernieri, Max e Ineka pelo auxílio e orientação no uso do computador.

Ao CNPq, Fapesp e Hemocentro pelo auxílio financeiro.

Ao Departamento de Farmacologia, que possibilitou a elaboração desta tese de mestrado.

A todos os professores do Departamento de Farmacologia desta Universidade.

Se chegarmos a descobrir uma teoria completa, com o tempo esta deveria ser compreensível para todos e não só para um pequeno grupo de cientistas. Então, todo o mundo poderia discutir sobre a existência do ser humano e do Universo. No caso de encontrarmos a resposta a esta questão, alcançaríamos o triunfo final da razão humana, porque neste momento conheceríamos a mente de Deus. Teríamos tornado realidade todos os nossos sonhos.

Stephen Hawking.

SUMÁRIO

I. RESUMO.....1

II. INTRODUÇÃO.....4

III. OBJETIVOS.....9

IV. MATERIAL E MÉTODOS.....11

V. RESULTADOS.....19

VI. DISCUSSÃO.....28

VII. CONCLUSÃO.....34

VIII. APÊNDICE.....36

IX. SUMMARY.....44

X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....47

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

I. Figuras

Figura 1.....22
Figura 2.....23
Figura 3.....24
Figura 4.....25
Figura 5.....26
Figura 6.....27

Tabelas

Tabela 1.....37
Tabela 2.....37
Tabela 3.....38
Tabela 3a.....38
Tabela 4.....39
Tabela 4a.....39
Tabela 5.....40
Tabela 5a.....40
Tabela 6.....41
Tabela 6a.....41
Tabela 7.....42
Tabela 7a.....42
Tabela 8.....43
Tabela 8a.....43

I. RESUMO

Neste trabalho investigamos o crescimento e diferenciação das células precursoras da medula óssea após estresse induzido pelo modelo do desamparo aprendido.

Ratos Wistar fêmeas pesando 180 ± 20 g foram divididos em 4 grupos: **Grupo Controle**; **Grupo Confinado** (CF); **Grupo Estressado** (CHE) - recebeu 60 choques escapáveis de 1 mA com intervalos randômicos variando de 5 a 25 segundos e com duração determinada pela fuga do animal; **Grupo Deprimido** (CHI) - recebeu choques inescapáveis de mesma intensidade, freqüência e duração dos administrados aos animais do grupo CHE.

A medula óssea foi retirada 24 h após o tratamento e as células formadoras de colônias (CFU-C) estudadas através da técnica de cultura clonal em meio semi-sólido.

Os resultados demonstraram que ocorre redução reversível significativa no número de CFU-C nos animais dos grupos CHI e CF.

Estudamos também o envolvimento do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal na resposta observada através do tratamento dos animais CHI, CF e Controle com o inibidor da síntese de corticóides metirapone (0 ou 47 mg/Kg/dia) ou com dexametasona (0 ou 1 mg/Kg). O envolvimento dos receptores opióides foi estudado através do uso da naltrexona (0 ou 8 mg/Kg) ou indução de tolerância cruzada à morfina (0 ou 12 mg/Kg/dia).

A administração de metirapone reduziu o número de CFU-C no grupo Controle mas não alterou o quadro de mielossupressão observado anteriormente nos grupos CHI e CF. Por outro lado, a administração de dexametasona promoveu uma proteção contra os efeitos mielossupressores do estresse. Observamos também uma reversão da mielossupressão após bloqueio dos receptores opióides com o antagonista naltrexona e após a suspensão da administração de morfina em animais tratados cronicamente com a droga.

Concluímos portanto, que a proteção contra a mielossupressão causada pelo estresse depende da integridade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. As endorfinas promovem mielossupressão que pode ser revertida

pelo uso de antagonistas ou pela redução na liberação de fatores hipotalâmico-hipofisários, induzida por altos níveis de corticóides.

II. INTRODUÇÃO

Exposição do organismo a estímulos estressantes psicosociais e ambientais alteram de forma significativa o funcionamento do sistema imunológico (DANTZER & KELLEY, 1989; KHANSARI, MURGO, FAITH, 1990; SANDI, BORRELL, GUAZA, 1992). No entanto, os mecanismos pelos quais o estresse altera o funcionamento das células mielóides e linfóides, assim como a liberação de citocinas durante o estresse, não estão completamente estabelecidos.

Estudos realizados sobre os efeitos do estresse no sistema imunológico, apresentam resultados controversos. Foi demonstrado que camundongos estressados apresentam menor rejeição a enxertos de pele heterólogos (WISTAR & WILDEMANN, 1960; RILEY, 1981). Observou-se também que a imobilização e exposição a som de alta intensidade aumentam a mortalidade de animais infectados por vírus e reduzem a produção de interferon (LEVINE, 1962; CHANG & RASMUSSEN, 1965; JENSEN, 1968). Por outro lado, alguns agentes estressores podem estimular vários aspectos da resposta imune, aumentando assim a resistência do hospedeiro a organismos patogênicos (LYSLE et al., 1987; DANTZER & KELLEY, 1989; GROSS, 1972; BLECHA, BARNY, KELLEY, 1982, CROISET et al., 1987).

A possibilidade de se produzir e controlar a ocorrência do estressor é um fator crítico na influência do estresse sobre as funções fisiológicas e imunológicas. MINEKA & HANDERSEN (1985); SANDI et al., (1992) demonstraram que uma única sessão de choque elétrico, do qual o animal não podia escapar aumentou o crescimento de tumor em ratos quando comparado com animais aos quais foi dada a oportunidade de escapar do choque. Choque inescapável, mas não o escapável, também reduziu significativamente a capacidade de rejeição de tumores (VISINTAINER, VOLPICELLI, SELIGMAN, 1982) e a resposta linfoproliferativa a lectinas (LAUNDENSLAGER et al., 1983).

As vias comuns de manifestação fisiológica do estresse podem ser corticosteróide-dependentes ou independentes. Na via dependente ocorre estímulo da secreção adrenocortical com conseqüente aumento nos níveis de glicocorticóides e ativação do sistema nervoso simpático com liberação de

catecolaminas (SAPOLSKY & DONNELLY, 1985; KHANSARI et al, 1990). Um claro exemplo do envolvimento de corticosteróides na imunocompetência foi demonstrado por SAPOLSKY et al., 1985. Estes autores observaram que ratos idosos secretam grandes quantidades de corticosterona e tornam-se mais sensíveis aos efeitos tumorígenicos causados pelo estresse, quando comparados com ratos jovens que secretam quantidades menores do hormônio. Esta vulnerabilidade foi reproduzida em ratos jovens através do aumento na resposta do eixo hipófise-adrenal. Os mecanismos corticosteróide-independentes podem ser estudados pela adrenalectomia ou injeção de metirapone, um inibidor enzimático da síntese de corticosteróides. Estudos realizados com macacos separados de suas mães na idade infantil, demonstraram que a adrenalectomia não modificou as alterações funcionais observadas em linfócitos e neutrófilos desses animais (COE, ROSEMBERG, LEVINE, 1988).

As catecolaminas são os mediadores mais prováveis dos efeitos imunológicos corticosteróide-independentes do estresse. Estas moléculas parecem influenciar certos processos imunológicos como a formação de anticorpos e o aparecimento de marcadores de diferenciação nos linfócitos (DANTZER et al., 1989). O estudo da fisiologia dos sistemas nervoso e imunológico, tem mostrado uma série de semelhanças entre ambos. Esses sistemas possuem receptores de membrana comuns e funcionam sob a ação de mecanismos auto-reguladores.

A modulação do sistema imunológico pelo sistema nervoso envolve também a liberação de substâncias analgésicas pelo sistema nervoso simpático e pela hipófise, as chamadas peptídeos opióides .

O sistema imunológico é composto de órgãos e populações celulares. Entre os órgãos linfóides primários a medula óssea serve como sítio de origem das células pluripotenciais das quais se originam as células do sistema hematopoético, incluindo as famílias de células imunologicamente ativas. Portanto, é essencial que qualquer estudo sobre alterações no funcionamento do sistema imunológico causadas por estímulos externos leve em conta as

possíveis modificações no crescimento e diferenciação destas células pluripotenciais.

As primeiras técnicas para o crescimento *in vitro* destas células precursoras da medula óssea foram desenvolvidas por Bradley & Metcalf (1966). Nestas culturas uma única célula pluripotencial, em presença de fatores de crescimento específicos, forma uma colônia de células-filhas maduras. A utilização destas técnicas de cultura clonal, além de permitir o estudo do crescimento e diferenciação das células mielopoéticas, favorece a detecção dos diferentes graus de comprometimento celular após estímulos que alteram a homeostase do organismo.

Trabalhos realizados em nosso laboratório demonstram que o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos constitui um indicador sensível dos efeitos de drogas e xenobióticos no processo de mielopoese. Efeitos mielossupressores foram observados após a administração a camundongos de doses subtóxicas de chumbo. Este efeito parece ocorrer por ação direta do chumbo nas células precursoras, uma vez que nenhuma alteração ocorreu nos níveis séricos de interleucinas (BINCOLETO & QUEIROZ , 1996). Esta mielossupressão explica, pelo menos em parte, a diminuição na resistência à infecção em animais expostos ao metal. Em outro estudo observamos que a administração *in vivo* de deltametrina (inseticida do grupo piretróide) e/ou hidrocortisona também levou a redução na resistência a infecções com aumento de granulócitos e macrófagos na medula óssea sugerindo uma ação indireta da deltametrina via córtex da supra-renal (QUEIROZ, 1993).

Nesse trabalho investigamos os efeitos diretos do estresse no crescimento e diferenciação das células precursoras da medula óssea, através do uso de um fator estimulador produzido a partir de baço de camundongo (SCM), que possui atividade multiestimuladora. O modelo para produção de estresse utilizado foi o de desamparo aprendido, que é um dos principais modelos no estudo da etiologia e terapêutica da doença mental, em especial a

depressão (WILLNER, 1986, 1990; TEIXEIRA, 1995a; MIGUEL et al.,1994). Os efeitos mielopoéticos do estresse foram também investigados em animais submetidos à adrenalectomia química através da administração de metirapone, em animais onde se provocou a tolerância cruzada à morfina, por sua administração crônica, com o antagonista opióide naltrexona, e com o glicocorticóide sintético dexametasona.

III. OBJETIVOS

O principal objetivo desse trabalho foi investigar os efeitos do estresse no crescimento e diferenciação de células precursoras de medula óssea, assim como identificar a participação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) nos efeitos mielopoéticos observados, através da administração de dexametasona, metirapone, naltrexona e indução de tolerância cruzada à morfina.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

1- Animais

Para a realização dos experimentos (in vivo) foram utilizados ratas da linhagem Wistar com idade em torno de 90 dias pesando 180 ± 20 g, fornecidas pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas. Os animais foram mantidos isolados por pelo menos 72 horas antes da realização dos experimentos em sala climatizada com ciclo claro-escuro de 12 horas sob temperatura ambiente constante de 26±2° C, com alimentação e água oferecidas *ad libitum*. Os experimentos foram realizados em grupos de animais submetidos aos seguintes tratamentos: a) animais controle, sem tratamento, apenas isolados; b) animais apenas confinados no mesmo ambiente, e pelo mesmo tempo que os animais que receberam choques; c) animais que receberam choques; d) animais que receberam drogas (dexametasona, metirapone, naltrexona ou morfina) e a seguir os tratamentos conforme descrito em a, b e c. Os estudos mielopoéticos foram realizados 24, 72 e 120 horas após o estresse nos grupos iniciais e fixados posteriormente para 24 horas.

2- Tratamento

2.1- Modelo de depressão

O modelo para produção de estresse utilizado foi o de desamparo aprendido. Este modelo compreendeu 4 grupos experimentais. Um grupo (CHE - estressados) foi submetido a uma sessão de choques escapáveis, enquanto outro grupo (CHI - deprimidos) foi submetido a choques inescapáveis. No terceiro grupo os animais permaneceram no mesmo ambiente apenas confinados em outra caixa sem, no entanto, terem recebido choques (CF). Como controle utilizamos animais sem qualquer tratamento (Controle).

2.1.1- Indução do estresse por choque

A produção do estresse foi realizada no laboratório de Psicofarmacologia do Departamento de Farmacologia da Unicamp, sob orientação da Prof. Dra. Nancy Airoldi Teixeira. Para padronização do número de choques, realizamos alguns experimentos onde um grupo de animais permaneceu apenas confinado (CF), um segundo grupo recebeu 60 choques com intensidade de 1 mA e com possibilidade de fuga (CHE) e, acoplado a esse grupo, um outro recebeu a mesma densidade (tempo de choque/tempo de sessão) de choques, mas sem possibilidade de fuga (CHI).

Os treinamentos foram realizados com a ajuda de 3 "shuttle box". A caixa de choques do tipo "vai e vem" utilizada para ministrar os choques do tipo escapável (CHE - condicionamento de fuga), media 50x25x30 cm, com tampa e parede frontal de acrílico transparente sendo dividida internamente em 2 compartimentos iguais, separados por uma parede de alumínio. Esta parede divisória continha um orifício retangular de 7,5 cm de altura por 6,0 cm de largura distante 8,0 cm acima do piso da caixa, o que permitia o deslocamento do animal de um compartimento ao outro (FARIA & TEIXEIRA, 1993). Cada compartimento continha 2 fotocélulas sensíveis ao movimento do animal. O piso das caixas era composto por barras de latão de 0,3 cm de diâmetro, distantes 1,0 cm entre si, através dos quais os choques elétricos foram liberados.

Os choques foram liberados automaticamente por um aparelho de comando (ALBARSCH) programado para deflagrar os 60 choques. A resposta exigida do animal para o término de cada choque era a de saltar de um compartimento ao outro, onde era deflagrado o próximo choque. O intervalo entre os choques foi randômico variando de 5 a 25 segundos.

Para a sessão de choques do tipo inescapável (CHI - indução do desamparo aprendido), utilizou-se uma caixa medindo 25x25x30 cm, 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 0,3 cm de espessura, distantes 1,0 cm uma da outra, através das quais os 60 choques inescapáveis foram liberados. Os choques inescapáveis tiveram duração de 8 segundos

cada e intensidade de 1 mA e a sessão foi controlada por um microcomputador (HERMINI et al., 1994). A duração de 8 segundos de choque corresponde a densidade idêntica ao grupo anterior (CHE). O intervalo entre os choques também variou de 5 a 25 segundos.

Para a realização do confinamento (CF) utilizamos uma caixa idêntica aquela descrita para o grupo inescapável (CHI) sem acoplar a mesma à um gerador de choques.

2.2 - Tratamento com dexametasona

A dexametasona é um glicocorticóide sintético conhecido por inibir a liberação de ACTH e β endorfina pela pituitária anterior, e bloquear a forma opióide de analgesia no estresse induzido. Assim, estudamos o efeito mielopoético do estresse em animais tratados, 2 horas antes do choque, com 1 mg/Kg de fosfato sódico de dexametasona (Decadron®, Merk Sharp & Dohme) por injeção intraperitoneal (MAC LENNAN et al., 1982). Os grupos de animais foram divididos em: a) animal não estressado (ST); b) animal confinado (CF) e c) animal estressado (CHI). O grupo controle recebeu salina 0,9% pela mesma via de administração da droga.

2.3 - Adrenalectomia química

Tendo em vista que uma das principais vias da expressão do estresse é através da liberação de corticosteróides da supra-renal, estudamos os efeitos mielopoéticos do estresse em animais submetidos a adrenalectomia química através da administração da droga metirapone (2-methyl-1,2-di-3-pyridyl-1propanone, Sigma).

Metirapone (0,5 mg/ml) foi dissolvido em água destilada e consumido pelos animais por 40 horas antes das sessões de tratamento (NOGAMI & TACHIBANA, 1993), atingindo a concentração de 47 mg/kg. Os animais foram divididos em grupos como segue: a) animal recebeu metirapone e não foi estressado (ST); b) animal recebeu metirapone e foi confinado (CF) e c) animal recebeu metirapone e foi estressado (CHI). O animal Controle ingeriu água.

2.4 - Tratamento com naltrexona

A naltrexona antagoniza as ações dos opióides endógenos que são mobilizados pela dor ou estresse. Assim observamos o efeito mielopoético do estresse em animais que receberam cloreto de naltrexona (Sigma) na concentração de 8 mg/kg por injeção intraperitoneal 1 hora antes da seção de choques (MAIER et al., 1980). Os grupos de animais foram: a) animal recebeu naltrexona e não foi estressado (ST); b) animal recebeu naltrexona e foi confinado (CF) e c) animal recebeu naltrexona e foi estressado (CHI). O animal controle recebeu injeção de salina.

2.5 - Tratamento com morfina

A morfina pode causar imunosupressão em animais e humanos, e assim é sugerido que receptores opióides podem estar envolvidos na imunomodulação. Observamos o efeito mielopoético do estresse em animais que receberam sulfato de morfina (Dimorf SP 10 mg) por injeção subcutânea na dose de 4mg/kg durante 6 dias administrada 3 vezes ao dia (às 9:00; 12:00 e 17:00 h), sendo a dose total diária de 12 mg/Kg. O estresse foi aplicado no sétimo dia, 18 horas após a última injeção. Os animais foram separados em quatro grupos: a) animal recebeu morfina e não foi estressado (ST); b) animal recebeu morfina e foi confinado (CF) e c) animal recebeu morfina e foi estressado (CHI). Os animais do grupo controle não receberam qualquer tratamento.

3- Padronização de metodologia de cultura clonal de precursores hematopoéticos da medula óssea (CFU-C)

O número de células na cultura foi ajustado para possibilitar a contagem das colônias em cada placa de petri, e acertar a utilização do fator estimulador de crescimento (CSF) em concentrações supramáximas.

3.1- Preparação das células dos ratos para cultura:

Ao sacrificar o animal com éter e deslocamento cervical, limpou-se a pele do animal com álcool 70% e após a exposição do fêmur, removeu-se a cartilagem sobre o orifício na extremidade distal e cortou-se o osso na junção superior. A medula óssea foi transferida com o auxílio de seringa e agulha para um tubo contendo meio de cultura e o tubo mantido no gelo. O número de células na suspensão foi contado em câmara hemocitométrica após diluição (1:10) das células em eosina 10%.

3.2- Determinação do número ideal das células na cultura:

Foram testadas as concentrações de 1×10^4 e 1×10^5 células por ml de cultura. As células foram cultivadas em presença de fator estimulador específico (SCM) que regula o crescimento e diferenciação das células precursoras hematopoéticas. As diluições testadas foram: 1:1; 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32 e 1:64. O teste que apresentou melhores características para proporcionar um número de colônias que melhor permitissem a sua visualização foi obtido utilizando-se a diluição do meio condicionado de células esplênicas de 1:4 com a concentração de células de 1×10^5. Os resultados das titulações realizadas em cultura de 7 dias, estão apresentadas nas tabelas 1 e 2 no apêndice.

3.3- Escolha do meio semi-sólido:

Foi utilizado ágar para a produção do meio semi-sólido considerando experimento realizado anteriormente neste laboratório (BINCOLETO et al., 1996).

3.4- Descrição da técnica para preparação das células em ágar:

a) Contou-se o número de células na suspensão.

b) Preparou-se o meio mais ágar:

30% de meio (DME-Difco) 2 x concentrado

20% de soro bovino fetal

50% de ágar (0,6%)

c) Adicionou-se o volume apropriado de células quando o meio mais ágar estava a 37°C.

d) Ressuspendeu-se as células e distribuiu-se o volume de 1 ml em cada placa de petri, que já continha 0,1 ml do fator estimulador.

e) Distribuiu-se por toda a superfície da placa de petri.

f) Deixou-se gelificar e incubou-se por 7 dias a 37° C com 10% de CO_2.

g) Contou-se o número de colônias.

3.5- Contagem de colônias:

O número de colônias por placa de petri foi determinado com o auxílio de um microscópio de dissecção com aumento de 40 vezes.

Para estudo morfológico as colônias foram fixadas com glutaraldeído 2,5% (v/v) e coradas com Luxol Fast Blue/ Hematoxilina.

4- Preparação do fator estimulador de crescimento de colônias (CSF)

4.1- Meio condicionado de células esplênicas (SCM):

Baços de camundongos Balb/c foram removidos sob condições assépticas e passados delicadamente através de peneira de aço inoxidável estéril. Preparou-se uma suspensão com 2 x 10^6 células/ml em meio RPMI - 1640 (Difco) contendo 10% de soro humano inativado (30 minutos a 56° C).

Adicionou-se ao meio 5 x10^{-5} M de M2 - Mercaptoetanol (concentração final de 0,05 ml) de "pokeweed mitogen" por ml de meio.

Incubou-se por 7 dias em estufa úmida contendo 10% de CO_2 no ar.

Centrifugou-se o sobrenadante e filtrou-se em filtros millipore.

A atividade funcional do CSF foi determinada através dos estímulos produzidos sobre o crescimento clonal de células progenitoras hematopoiéticas em meio semi-sólido.

5- Métodos estatísticos

Todas as variáveis de estudo rejeitaram a hipótese de normalidade, testada através do teste de Shapiro-Wilks, sendo necessária a utilização de testes não-paramétricos.

Para testar se existia diferença significativa entre os tratamentos (mais de 2 tratamentos) foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis (bilateral) e, posteriormente para testar se existia diferença significativa entre dois tratamentos dentro de cada grupo foi utilizado o teste de Mann-Whitney.

De uma maneira geral a hipótese testada foi se o número médio de colônias após o tratamento A era igual ao número de colônias após o tratamento B. Em todas as medidas o α foi de 5% bicaudal, ou seja, só quando a probabilidade foi menor que 0,05 as diferenças foram consideradas significantes.

V. RESULTADOS

O estudo do crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos da medula óssea em ratos apenas confinados e em ratos estressados por 60 choques aleatórios, de forma escapável e não-escapável, 24 h após o tratamento, demonstrou um efeito supressor no número de precursores de granulócitos e macrófagos da medula óssea, tanto nos animais submetidos a choques quanto nos animais apenas confinados, em relação aos controles. (Figura 1, e, Tabela 3 no apêndice).

1 - Efeito mielossupressor 24, 72 e 120 h após estresse:

Um efeito mielossupressor acentuado ($p < 0,05$ - Teste de Mann Whitney) foi observado em culturas da medula óssea, iniciadas 24 h após a sessão de choques ou confinamento em relação ao controle. Inicialmente observamos reversão do efeito mielossupressor do estresse no grupo CF após 72 h e posteriormente no grupo CHI após 120 h, demonstrando que o efeito mielossupressor do estresse é reversível. Os resultados estão demonstrados na figura 2, e, tabela 4 no apêndice. Diante desses resultados resolvemos padronizar o intervalo de 24 h após o tratamento para o início das culturas em animais tratados com as drogas.

2 - Efeito do estresse após hipofisectomia química pela administração de alta dose de dexametasona:

Um efeito protetor contra a mielossupressão foi também observado após a administração do glicocorticóide sintético dexametasona. Conforme demonstrado na figura 3 essa proteção ocorreu tanto no grupo confinado quanto no submetido a choques. Os valores estão representados na tabela 5 do apêndice.

3 - Efeito do estresse após adrenalectomia química com metirapone:

O estudo do efeito do estresse, em animais submetidos a adrenalectomia química através da administração de metirapone demonstrou que não ocorre reversão ou potenciação do efeito mielossupressor do choque ou confinamento.

Por outro lado, a adrenalectomia química demonstrou causar efeito mielossupressor em animais não submetidos a choques e não confinados quando comparados com animais controle não tratados com metirapone. Esses resultados estão demonstrados na figura 4, e, tabela 6 no apêndice.

4 - Efeito do estresse após a administração de naltrexona:

A administração de naltrexona proporcionou um efeito protetor da mielossupressão causada pelo estresse e confinamento, conforme pode ser observado na figura 5, e, tabela 7 no apêndice.

5 - Efeito do estresse após indução de tolerância cruzada à morfina:

Da mesma forma que com a naltrexona e dexametasona, a tolerância cruzada à morfina proporcionou proteção contra o efeito mielossupressor do estresse. Não observamos diferença significativa no número de células formadoras de colônias nos animais submetidos a choques e confinados que receberam a morfina com relação aos animais controle. Estes resultados podem ser observados na figura 6, e, tabela 8 no apêndice.

Os dados das figuras representam a média e o desvio padrão, e os valores estatísticos de U e p estão apresentados nas tabelas 3a, 4a, 5a, 6a, 7a e 8a, no apêndice.

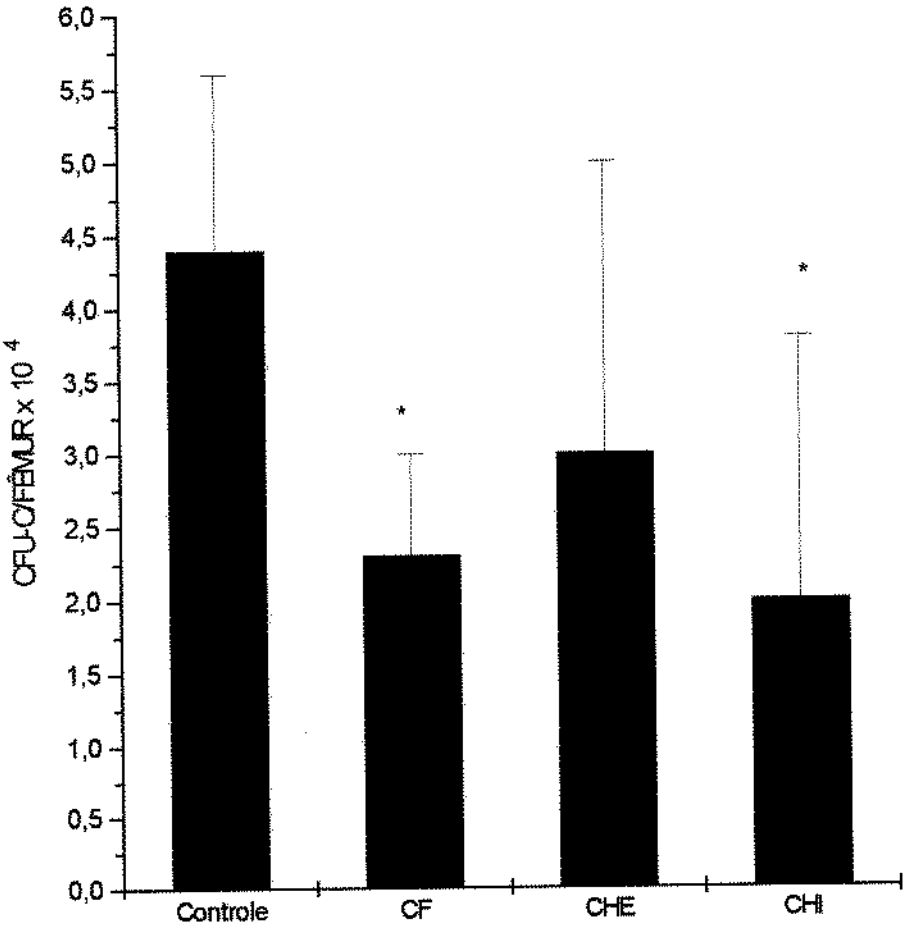

Figura 1 - Número de células formadoras de colônias (CFU-C/ fêmur x 10^4) em ratos confinados (CF), chocados com 60 choques aleatórios administrados de forma escapável (CHE) ou inescapável (CHI) e controles (não confinados e não chocados).*$p<0,05$ em relação ao controle.

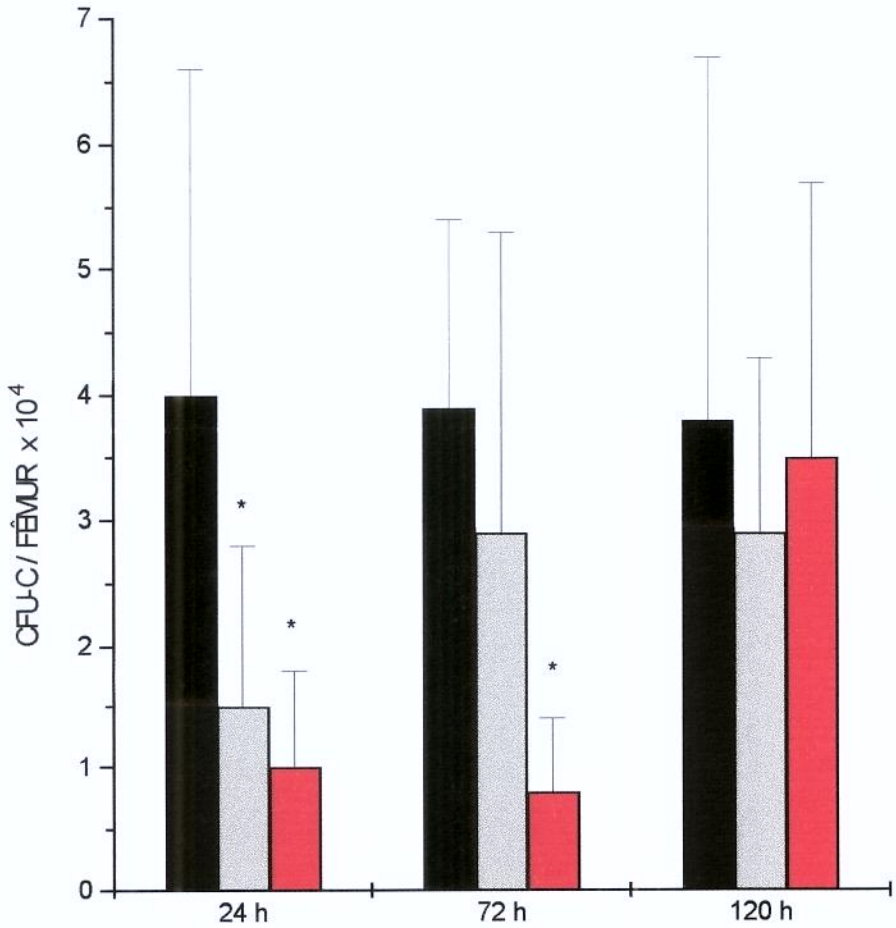

Figura 2 - Número de células formadoras de colônias (CFU-C/ fêmur x 10^4) em ratos apenas confinados (CF) ☐, submetidos a choques (CHI) ▭, e controles ■ 24, 72 e 120 h após tratamento. *p<0,05 em relação ao seu respectivo grupo controle.

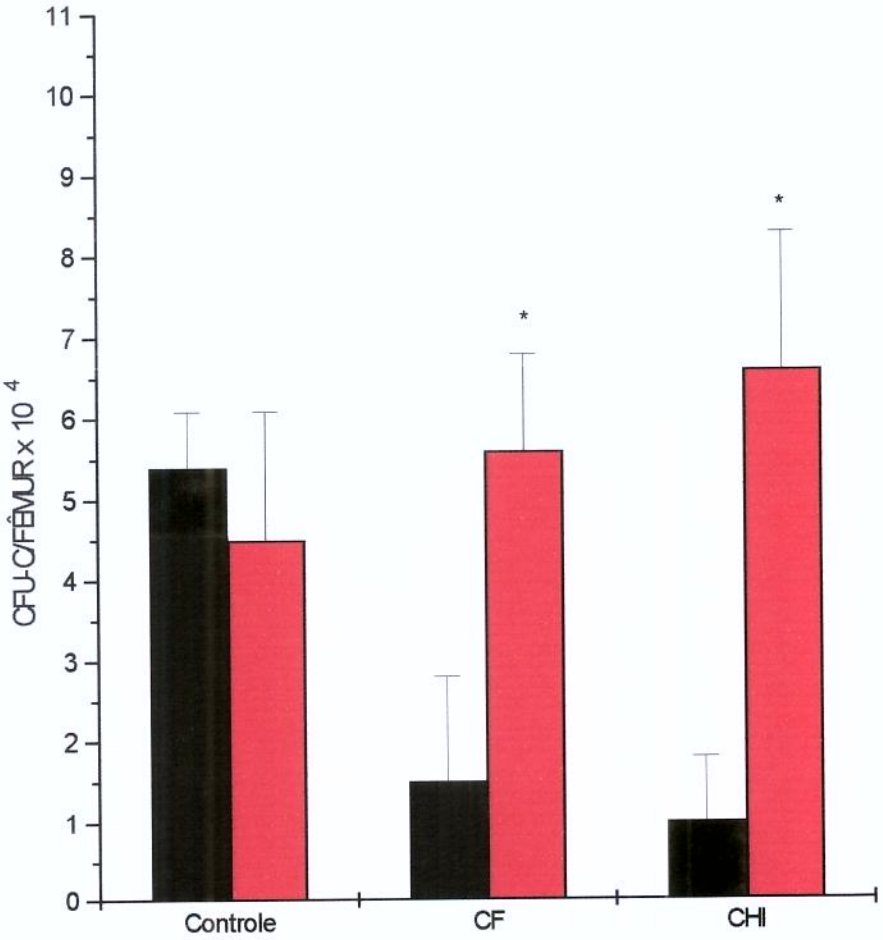

Figura 3 - Número de células formadoras de colônias (CFU-C/ Fêmur x 10^4) em ratos apenas confinados (CF), submetidos a administração de 60 choques inescapáveis (CHI), não confinados nem submetidos a choques (Controle), após tratamento com dexametasona. ■ não tratado ■ tratado.
*p<0,05 em relação ao seu respectivo grupo controle.

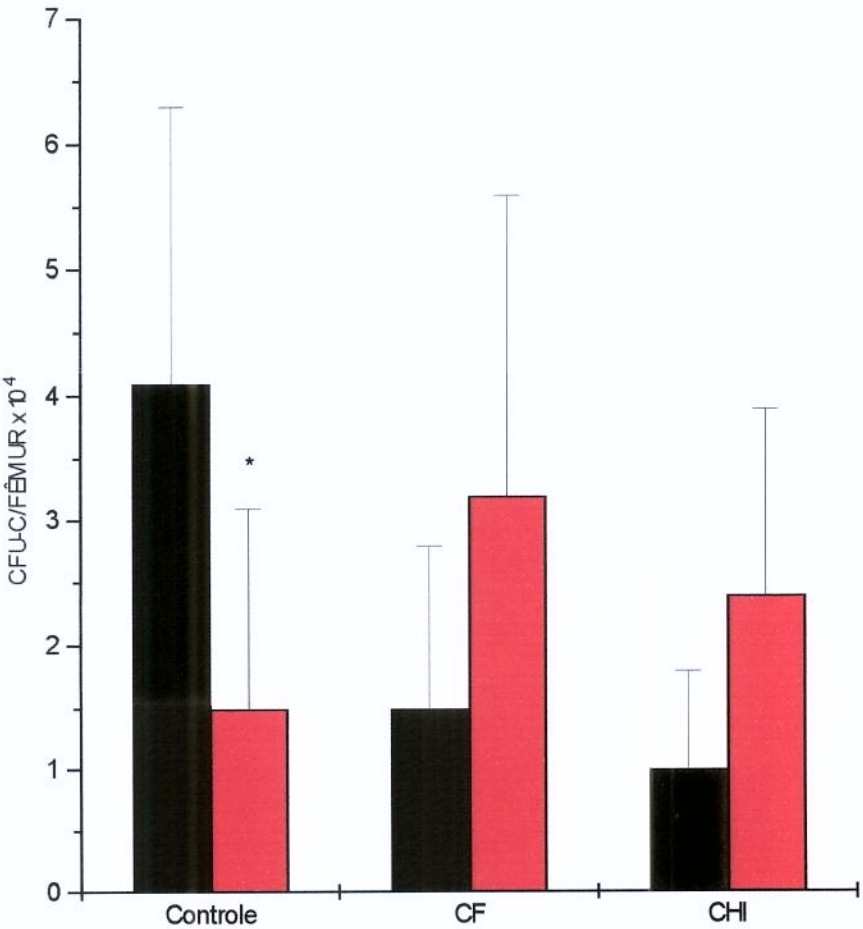

Figura 4 - Número de células formadoras de colônias (CFU-C/ fêmur x 10^4) em ratos apenas confinados (CF), submetidos a choques (CHI), não confinados nem submetidos a choques (Controle), após tratamento com metirapone. ■ não tratado ■ tratado. *p<0,05 em relação ao seu respectivo controle.

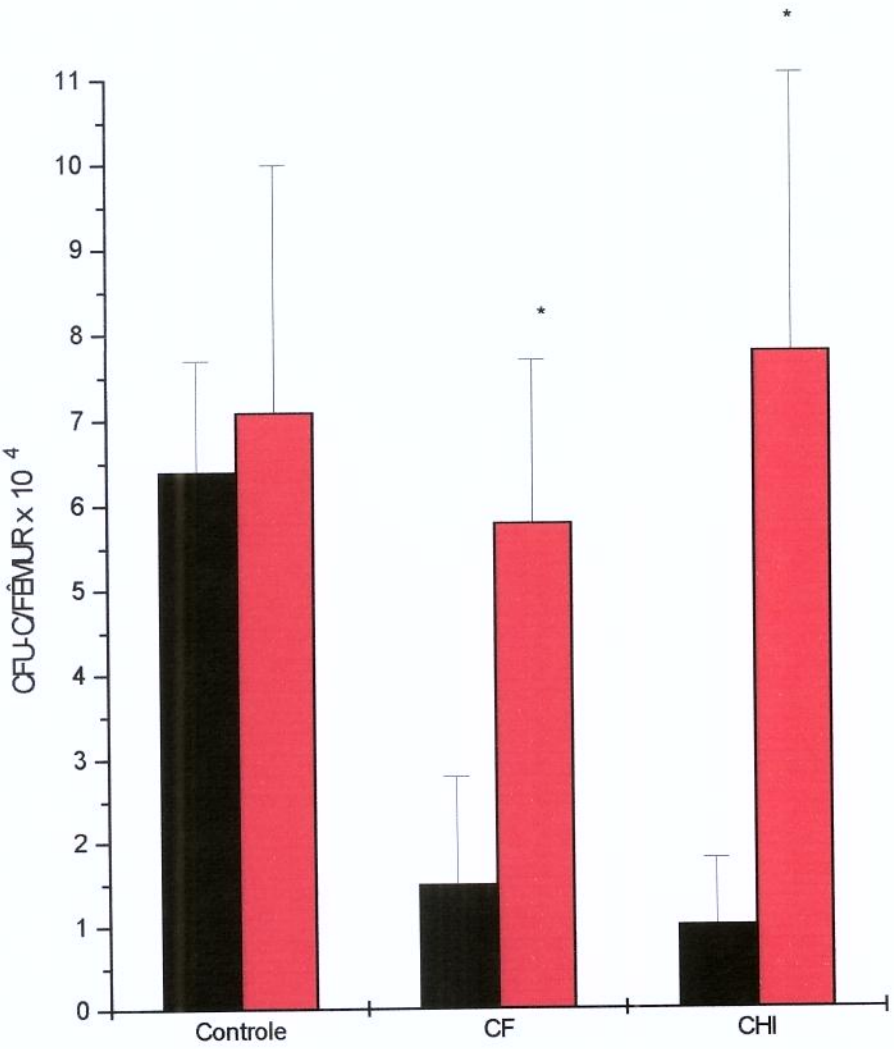

Figura 5 - Número de células formadoras de colônias (CFU-C/ fêmur x 10^4) em ratos apenas confinados (CF), submetodos a choques (CHI), não confinados nem submetidos a choques (Controle), após tratamento com naltrexona. ■ não tratado ■ tratado. *p<0,05 em relação ao seu respectivo controle.

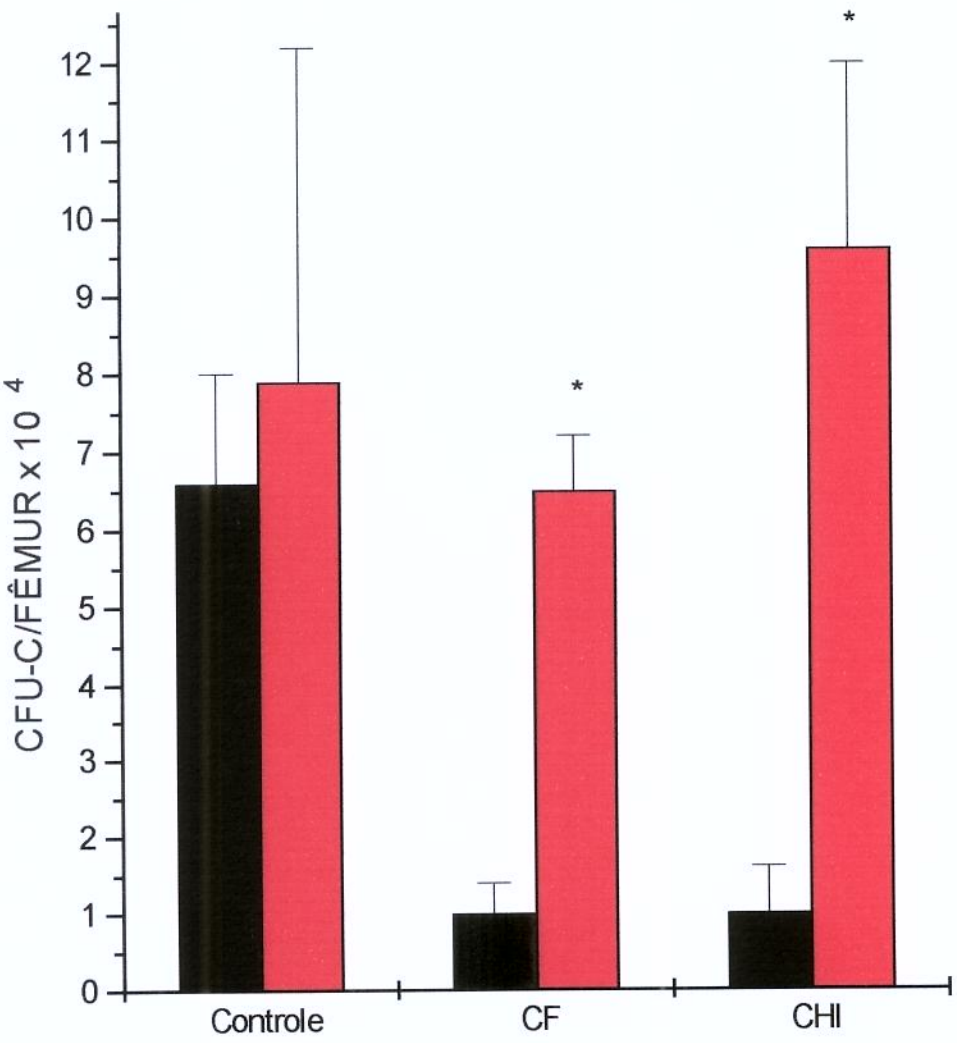

Figura 6 - Número de células formadoras de colônias (CFU-C/ fêmur x 10^4) em ratos apenas confinados (CF), submetidos a choques (CHI), não confinados nem submetidos a choques (Controle), após tratamento com morfina. ■ não tratado ■ tratado. *p<0,05 em relação ao seu respectivo controle.

VI. DISCUSSÃO

O sistema hematopoético é bastante sensível as várias situações de estresse. Essa susceptibilidade está relacionada às demandas fisiológicas para uma renovação celular rápida e extensiva. Portanto, populações de células primitivas da medula óssea são capazes de se auto-renovar, proliferar e diferenciar para suprir essas necessidades do organismo. Neste trabalho, células precursoras hematopoéticas de animais estressados, foram imobilizadas em meio semi-sólido e estimuladas por fatores específicos para formar colônias de células hematopoéticas maduras.

Estresse e uma variedade de outras doenças, principalmente doenças afetivas, estão cada vez mais associadas com imunossupressão. Que o estresse físico pode predispor a doenças, é conhecido há séculos, mas, apenas recentemente atraiu a atenção da comunidade científica em geral. Esse interesse científico recente na influência do estresse nas funções imunológicas resultou na emergência de uma nova área de pesquisa, designada psiconeuroimunologia.

Estudos pioneiros (CANNON, 1914; SELYE, 1956; HOLMS & RAHE, 1967), demonstraram um aumento na ocorrência de doenças após mudanças drásticas na vida. Apesar das dificuldades metodológicas associadas com a quantificação do estresse e com a associação do estresse e o início da doença, o conceito do impacto do estresse na susceptibilidade à várias doenças é bastante aceito. No entanto, é necessário esclarecer o mecanismo pelo qual fatores psicológicos e estresse físico, são traduzidos em mudanças imunopatológicas que aumentam a susceptibilidade a doenças e precedem a manifestação de sintomas clínicos.

O sistema nervoso é capaz de modular o sistema imunológico através do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal por mecanismos neuronais e hormonais. O fator liberador de corticotrofina (CRF) do hipotálamo controla a liberação de corticotrofina (ACTH) que estimula a síntese e a liberação de glicocorticóides do córtex supra-renal. Alguns estudos tem mostrado que o hormônio glicocorticóide diminui a produção de citocinas. Pela glândula hipófise são liberados os peptídeos opióides, juntamente com a adrenalina o CRF/ACTH.

Tanto os peptídeos opióides (endorfinas, encefalinas e dinorfinas) quanto o ACTH são oriundos da pró-opiomelanocortina (POMC) e portanto suas estruturas moleculares são parecidas. Da mesma forma, o α interferon também possui estrutura e efeitos similares ao ACTH e aos peptídeos opióides, estimulando também a produção e secreção do hormônio glicocorticóide e promovendo a analgesia. Os linfócitos também são capazes de secretar tanto o ACTH quanto o α interferon e a β endorfina mostrando que a interação do sistema nervoso e do sistema imunológico se faz de forma multidirecional (BONAMIN, 1994).

Trabalhos realizados demonstraram a sensibilidade do modelo de desamparo aprendido aos tratamentos clinicamente eficazes nos casos de depressão (WILLNER, 1986, 1990). Animais submetidos a choques inescapáveis demonstraram dificuldade de escape em situações onde a fuga era possível (MAIER, 1986). Além disso choques inescapáveis promovem uma analgesia de longa duração mediada por mecanismo opióide (TEIXEIRA, PEREIRA, E HERMINI, 1995b; JACKSON, LOON, MAIER, 1979). MIGUEL, et al., 1994, observaram uma inibição significativa na migração de leucócitos, revertida pelo tratamento com lítio, em animais deprimidos (CHI). Neste sentido, nossos resultados obtidos em ratos submetidos a depressão através do modelo de desamparo aprendido, demonstram um efeito supressor do estresse sobre o crescimento e diferenciação de precursores hematopoiéticos da medula óssea, os quais são responsáveis pelo suprimento das células maduras do sistema imunológico. Através da metodologia para o crescimento e diferenciação desses precursores *in vitro* pudemos observar um comprometimento reversível na biologia de formação dessas células em animais estressados.

No estresse ocorre liberação concomitante de corticóide e fatores hipotalâmicos-hipofisários (CRF/ACTH e β endorfina). Com a administração de alta dose do glicocorticóide sintético dexametasona ocorre redução dos fatores hipotalâmicos por *feedback* negativo. Este efeito mimetiza uma hipofisectomia referente ao eixo HHA. Nossos resultados demonstraram que a dexametasona promove uma proteção aos efeitos mielossupressores do estresse. Diante

disso, concluímos que o efeito de mielossupressão do estresse não seria devido ao aumento na liberação de glicocorticóides provocada pelo estresse. Suspeitamos então que a depressão imune provocada pelo estresse devia ser causada pelo aumento na liberação dos fatores hipotalâmicos e que os mesmos pudessem ter sido suprimidos pela droga. A administração da droga metirapone promove uma redução de corticosterona circulante e um conseqüente aumento de CRF, ACTH e β endorfina por *feedback* positivo. Nossos resultados demonstraram uma redução na proliferação das células precursoras da medula óssea nos animais controle, mas não houve modificação naqueles animais submetidos ao estresse. Observamos então que, em nossas condições experimentais, a ausência de corticóide afeta a imunidade basal. Como a depressão do controle provocada pelo metirapone foi da mesma magnitude daquela provocada pelo estresse, e, no estresse não ocorre queda na liberação do corticóide, foi reforçada a hipótese de que a mielossupressão causada pelo estresse possa ocorrer devido aos fatores hipotalâmicos estarem presentes em maior quantidade. Estes resultados indicam que a ativação do eixo HHA, com a manutenção de sua homeostasia, tem uma importante função na proteção contra os efeitos mielossupressores do estresse. Muitos neuropeptídeos, neurotransmissores e hormônios como ACTH e β endorfina têm sido implicados na imunomodulação e, embora a patofisiologia da imunossupressão pelo estresse não esteja clara, alguns trabalhos demonstraram que o CRF e interleucina-1 (IL-1) agem de forma essencial no prejuízo da função imune após o estresse (JAIN et al., 1991; AUDHYA et al., 1991; SAPERSTEIN et al.,1992).

Vários estudos tem demonstrado a importância dos sistemas neurotransmissores na regulação das funções endócrinas. Alguns estudos sugerem que catecolaminas e acetilcolina estimulam as funções imunológicas, enquanto que neurotransmissores serotoninérgicos e opióides têm efeito inibitório sobre a resposta imune (HALL & GOLDSTEIN, 1981).

O efeito imunossupressor da morfina é bem documentado. A administração crônica de morfina produz depressão na resposta imunocelular, redução no peso do timo, redução na produção de células formadoras de

anticorpos e na produção de interleucina-2 (IL-2), (PERITT, HOLADAY, BRYANT, 1988). Todos estes efeitos são revertidos pela administração de naltrexona.

Nossos resultados mostraram também uma reversão da mielossupressão causada pelo estresse após bloqueio dos receptores opióides com o antagonista naltrexona. Estes resultados foram observados também após a suspensão da administração de morfina em animais tratados cronicamente com a droga. Esta supressão leva a um quadro de tolerância cruzada que é semelhante a uma anergia de receptores opióides, onde os opióides liberados endógenamente (pelo estresse) encontram menor número de receptores ou receptores menos sensíveis, quadro portanto semelhante a administração do antagonista. Portanto, estes resultados indicam que o efeito supressor do estresse sobre o crescimento e diferenciação dos precursores hematopoiéticos é mediado, em grande parte, pelos receptores opióides. Com a administração de naltrexona e morfina não ocorre mudança nos níveis sistêmicos de corticóide, CRF e ACTH, porém ocorre redução na ação das β endorfinas.

Roy et al. (1991), demonstraram que a administração de naloxona e morfina a camundongos não provocou alterações na mieloproliferação em culturas de células estimuladas com fator estimulador de colônias para granulócito e macrófago (GM-CSF), mas a morfina comprometeu a proliferação quando foi utilizado o fator estimulador de colônias para macrófago (M-CSF).

Os nossos resultados demonstram claramente que a mielossupressão observada é mediada principalmente por receptores opióides, uma vez que o bloqueio desses receptores com o antagonista ou a indução de tolerância cruzada dos receptores à morfina reverteram este efeito mielossupressor do estresse. Neste sentido, foi demonstrado na literatura que a indução de imunossupressão inibe o desenvolvimento de tolerância e dependência física à morfina (MEISHERI & ISOM, 1978; DOUGHERTY, HARPER, DAFNY, 1986), reforçando a suposta interdependência entre sistema imune e opióide.

No animal apenas estressado parece ocorrer uma preponderância da via opióide, o que se manifesta no nosso modelo através de mielossupressão.

O estresse libera grandes quantidades de β endorfinas as quais são responsáveis pela depressão imunológica. Esta depressão foi revertida neste trabalho por hipofisectomia química ou pela ação das β endorfinas com o uso de um antagonista opióide ou pela indução de subsensibilidade dos receptores para opióides.

VII. CONCLUSÕES

O presente estudo sobre os efeitos do estresse na proliferação e diferenciação das células precursoras da medula óssea permite concluir que:

1) Existe depressão imune frente ao estresse, porém não é qualquer estresse que age de maneira mielossupressora. Isso ocorre apenas quando o estresse é inevitável e o animal não consegue fugir. Assim, o efeito mielossupressor do estresse foi significativo no caso dos animais confinados (CF) e submetidos a choques de maneira inescapável (CHI).

2) Observamos que o efeito mielossupressor do estresse nestes grupos é reversível, sendo que a reversão no grupo apenas confinado ocorreu 72 h após o choque e no grupo CHI após 120 horas.

3) Os nossos estudos demonstraram:

a) Dose alta de corticóide reverte a mielossupressão e não afeta os animais controle.

b) Através do bloqueio químico da supra-renal com metirapone o hipotálamo é estimulado a aumentar sua produção de CRF e β endorfinas. Esta situação não alterou a atividade mielossupressora já deprimida do animal estressado. No entanto, no animal controle observamos uma depressão na resposta mielossupressora demonstrando a importância da presença de corticóides na resposta imune basal.

c) Da mesma forma o bloqueio da ação dos opióides através do antagonista naltrexona ou da indução da tolerância cruzada pela morfina também reverteu o quadro mielossupressor demonstrando desta forma que o efeito imunossupressor do estresse é decorrente do aumento na liberação de β endorfinas hipotalâmicas-hipofisárias.

VIII. APÊNDICE

Tabela 1- Número de colônias obtidas em cultura de 7 dias, em presença de meio condicionado de células esplênicas (SCM), com a concentração de 1 x 10^4 células por ml de cultura.

DILUIÇÃO DO MEIO CONDICIONADO

1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
9	4	3	2	2
14	8	5	-	-
20	16	5	4	-

Tabela 2 - Número de colônias obtidas em cultura de 7 dias, em presença de meio condicionado de células esplênicas (SCM), com a concentracão de 1 x 10^5 células por ml de cultura.

DILUIÇÃO DO MEIO CONDICIONADO

1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
210	176	132	54	27	10	3
243	171	89	59	22	9	4
221	195	88	52	16	16	-
236	200	122	46	17	5	-
224	217	116	68	26	10	-
-	168	106	50	11	5	-

Tabela 3- Número de células formadoras de colônias (CFU-C/fêmur x 10^4) em ratos confinados (CF), submetidos 60 choques aleatórios administrados de forma escapável (CHE) ou inescapável (CHI) e controle (não confinados e não submetidos a choques), 24 horas após o tratamento.

Animal	Controle	CF	CHE	CHI
1	3,2	1,2	0,2	0,8
2	3,7	2,7	3,2	2,3
3	3,5	1,9	1,3	0,8
4	4,4	2,2	5,9	0,7
5	6,2	2,8	3,3	5,5
6	5,6	3,4	4,3	2,3
Média	**4,4**	**2,3**	**3,0**	**2,0**
Desvio Padrão	**1,2**	**0,7**	**2,0**	**1,8**

Tabela 3a - Dados estatísticos dos testes de Mann-Whitney.

	U	p
Controle/CF	35	0,004
Controle/CHE	26,5	0,17
Controle/CHI	32	0,02
CF/CHE	23	0,48
CF/CHI	24	0,39
CHI/CHE	24	0,39

Tabela 4 - Número de células formadoras de colônias (CFU-C/fêmur x 10^4),em ratos apenas confinados (CF), submetidos a 60 choques inescapáveis de 8 segundos cada (CHI), e controle, não confinados e não submetidos a choques, (C), 24, 72 e 120 h após tratamento.

	24 horas			72 horas			120 horas		
Animal	**C**	**CF**	**CHI**	**C**	**CF**	**CHI**	**C**	**CF**	**CHI**
1	6,0	1,3	1,3	6,0	7,7	0,1	2,1	2,1	4,7
2	7,0	4,1	1,7	4,1	1,3	0,3	8,1	4,7	3,5
3	1,1	0,9	0,01	2,4	0,9	1,4	3,6	3,4	0,5
4	1,6	1,6	0,07	5,3	2,9	1,8	1,6	1,5	5,6
5	6,3	0,7	2,1	2,2	3,3	1,2	-	-	-
6	2,5	0,6	1,1	3,6	1,7	0,4	-	-	-
Média	**4,0**	**1,5**	**1,0**	**3,9**	**2,9**	**0,8**	**3,8**	**2,9**	**3,5**
Desvio Padrão	**2,6**	**1,3**	**0,8**	**1,5**	**2,4**	**0,6**	**2,9**	**1,4**	**2,2**

Tabela 4a - Dados estatísticos dos testes de Mann-Whitney.

	24 horas	72 horas	120 horas
C/CF	U 30,5 p 0,04	U 10 p 0,24	U 9,5 p 0,63
C/CHI	U 30,5 p 0,04	U 0 p 0,002	U 8 p 1,00
CF/CHI	U 19,5 p 0,70	U 6 p 0,064	U 10,5 p 0,46

Tabela 5 - Número de células formadoras de colônias (CFU-C/fêmur x 10^4) em ratos apenas confinados (CF), submetidos a 60 choques inescapáveis de 8 segundos cada (CHI) e controle (não confinados e não submetidos a choques) após tratamento ou não com a droga dexametasona.

	Controle		CF		CHI	
Animal	**NÃO TRATADO**	**TRATADO**	**NÃO TRATADO**	**TRATADO**	**NÃO TRATADO**	**TRATADO**
1	6,2	3,1	1,3	4,5	1,3	5,5
2	4,8	3,1	4,1	5,8	1,7	7,8
3	4,8	4,4	0,9	4,2	0,01	4,5
4	6,7	4,7	1,6	6,4	0,07	7,3
5	5,1	4,7	0,7	5,4	2,1	5,6
6	5,2	7,5	0,6	7,5	1,1	9,3
Média	**5,4**	**4,5**	**1,5**	**5,6**	**1,0**	**6,6**
Desvio Padrão	**0,7**	**1,6**	**1,3**	**1,2**	**0,8**	**1,7**

Tabela 5a - Dados estatísticos dos testes de Mann-Whitney.

	Controle	CF	CHI
	não tratado/ tratado	não tratado/ tratado	não tratado/ tratado
U	30	36	36
p	0,06	0,002	0,002

Tabela 6 - Número de células formadoras de colônias (CFU-C/fêmur x 10^4) em ratos apenas confinados (CF), submetidos a 60 choques de 8 segundos cada (CHI) e controle (não confinados e não submetidos a choques) após tratamento ou não com a droga metirapone.

	Controle		CF		CHI	
Animal	**NÃO TRATADO**	**TRATADO**	**NÃO TRATADO**	**TRATADO**	**NÃO TRATADO**	**TRATADO**
1	3,0	0,3	1,3	0,0	1,3	0,8
2	2,7	0,8	4,1	2,8	1,7	0,8
3	6,3	2,6	0,9	3,5	0,01	5,0
4	7,6	2,1	1,6	7,0	0,07	3,0
5	6,4	5,0	0,7	4,9	2,1	4,1
6	1,3	0,9	0,6	1,4	1,1	2,7
7	2,4	0,1	-	-	-	1,2
8	3,5	0,9	-	-	-	1,6
Média	**4,1**	**1,5**	**1,5**	**3,2**	**1,0**	**2,4**
Desvio Padrão	**2,2**	**1,6**	**1,3**	**2,4**	**0,8**	**1,5**

Tabela 6a - Dados estatísticos dos testes de Mann-Whitney.

	Controle	CF	CHI
	não tratado/ tratado	não tratado/ tratado	não tratado/ tratado
U	56	26	35
p	0,01	0,24	0,18

Tabela 7 - Número de células formadoras de colônias (CFU-C/fêmur x 10^4) em ratos apenas confinados (CF), submetidos a 60 choques inescapáveis de 8 segundos cada (CHI) e controle (não confinados e não submetidos a choques) após tratamento ou não com a droga naltrexona.

	Controle		CF		CHI	
Animal	**NÃO TRATADO**	**TRATADO**	**NÃO TRATADO**	**TRATADO**	**NÃO TRATADO**	**TRATADO**
1	5,4	7,2	1,3	3,2	1,3	5,9
2	6,1	5,4	4,1	4,2	1,7	5,5
3	4,8	6,9	0,9	8,0	0,01	10,8
4	6,6	10,8	1,6	8,1	0,07	7,5
5	8,7	2,7	0,7	5,3	2,1	4,5
6	7,0	9,7	0,6	6,3	1,1	13,1
Média	**6,4**	**7,1**	**1,5**	**5,8**	**1,0**	**7,8**
Desvio Padrão	**1,3**	**2,9**	**1,3**	**1,9**	**0,8**	**3,3**

Tabela 7a - Dados estatísticos dos testes de Mann-Whitney.

	Controle	CF	CHI
	não tratado/ tratado	não tratado/ tratado	não tratado/ tratado
U	22,5	35	36
p	0,44	0,004	0,002

Tabela 8 - Número de células formadoras de colônias (CFU-C/fêmur x 10^4) em ratos apenas confinados (CF), submetidos a 60 choques inescapáveis de 8 segundos cada (CHI) e controle (não confinados e não submetidos a choques) após tratamento ou não com a droga morfina.

	Controle		CF		CHI	
Animal	**NÃO TRATADO**	**TRATADO**	**NÃO TRATADO**	**TRATADO**	**NÃO TRATADO**	**TRATADO**
1	5,0	14,3	1,3	7,4	1,3	6,1
2	8,3	6,1	1,6	5,6	1,7	9,9
3	5,9	4,5	0,7	6,9	0,07	11,9
4	7,5	7,0	0,6	6,3	1,1	10,6
Média	**6,6**	**7,9**	**1,0**	**6,5**	**1,0**	**9,6**
Desvio Padrão	**1,4**	**4,3**	**0,4**	**0,7**	**0,6**	**2,4**

Tabela 8a - Dados estatísticos dos testes de Mann-Whitney.

	Controle	CF	CHI
	não tratado/ tratado	não tratado/ tratado	não tratado/ tratado
U	8	16	16
p	1,00	0,02	0,02

IX. SUMMARY

In this work we have investigated the growth and differentiation of bone marrow stem cells after stress induced by the learned helplessness model.

Female Wistar rats weighing 180 ± 20 g were divided into four groups: **Control Group**; **Confined Group** (CF); **Stressed Group** (CHE) - received 60 escapable shocks of 1 mA with random interval between 5 to 25 seconds determinated by the escape of the animal; and **Helpless Group** (CHI) - received inescapable shocks in the same intensity and frequency given to the CHE group.

Twenty-four hours later, the bone marrow was collected and the colony forming cells (CFU-C) studied by the technique for the clonal culture of hematopoietic cells in semi-solid medium.

In the animals of the groups CHI and CF, CFU-C numbers were reversibly reduced.

We have also studied the role of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the above response using in the groups CHI, CF and Control, the drugs metyrapone which inhibits the synthesis of corticosteroids (0 or 47 mg/Kg/day) or dexamethasone (0 or 1 mg/Kg). The involvement of opioid receptors was investigated using naltrexone (0 or 8 mg/Kg) or induced cross-tolerance to morphine (0 or 12 mg/Kg/day).

The administration of metyrapone reduced the number of CFU-C in the control group, whereas in the CHI and CF group we observed the same pattern of mielossupression observed previously. On the other hand, the administration of dexamethasone protected against the mielossupression induced by the stress. Similarly, the same protection was observed after blockade of opioid receptors with the antagonist naltrexone and after the interruption of the chronic morphine administration.

We therefore conclude that the protection against mielossuppression induced by stress depends on the integrity of the hypothalamic pituitary axis. On the other hand, the endorphins lead to mielossuppression which is reverted

by the use of antagonists or by the reduced liberation of pituitary hypothalamic factors, induced by high levels of corticosteroids.

X. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AUDHYA, T.; NABRISKI, D.; SAPERSTEIN, A.; RANSON, J.; HOLLANDER, C.S. - Corticotropin-releasing factor suppresses interleukin-2 induced lymphocyte proliferation and increases cAMP production in human splenocytes. **Clin. Res., 39:**461A, 1991. (Abstract)

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

BLECHA, F.; BARNY, R.A.; KELLEY, K.W. - Stress-induced alterations in delayed-type hypertensitivity to SRBC and contact sensitivity to DNFB in mice. **Proc. Soc. Exp. Bio. Med., 169:** 239-246, 1982.

BONAMIM, L.V. - O estresse e as doenças. **Ciência Hoje, 17:**25-30, 1994.

BRADLEY, T.R. & METCALF, D. - The growth of mouse bone marrow cells in vitro. **Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 44:**287-300, 1966.

CANNON, W.B. - The emergency function of the adrenal medulla in pain and the major emotions. **Am. J. Physiol. 33:**356-372, 1914.

CHANG, S.S. & RASMUSSEN, A.J. - Stress-induced suppression of interferon production in vírus infected mice. **Nature, 205:**623-625, 1985.

COE, C.L.; ROSEMBERG, L.T.; LEVINE, S. - Immunological consequences of psychological disturbance and maternal loss in infancy. In: ROVEE-COLLIER, C. & LIPSITT, L.P., Eds. **Advances in infancy research.**, Ablex, Norwood, 1988. p.98-129.

CROISET, G.; HEIJNEN, G.J.; VELDHUIS, H.D.; WIED, D.; BALLIEUX, R.E. - Modulation of the immune response by emotional stress. **Life Sci., 40:**775-782, 1987.

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

DOUGHERTY, P.M.; HARPER, C.; DAFNY, N. - The effect of alpha-interferon, cyclosporine A, and radiation-induced immune suppression on morphine-induced hypothermia and tolerance. **Life Sci., 39:**2191-2197, 1986.

FARIA, M.S. & TEIXEIRA, N.A. - Reversal of learned helplessness by chronic lithium treatment at a prophilactic level. **Brazilian J. Med. Biol. Res., 26:**1201-1212, 1993.

GROSS, W.B. - Effect of social stress on occurrence of marek's disease in chickens. **Amer. J. Vet. Res., 33:**2275-2279, 1972.

HALL, N.R. & GOLDSTEIN, A.L. - Neurotransmitters and the immune system. In: ADER, R. & GOOD, R.A., Eds. **Psychoneuroimmunology**. New York. Academic Press, 1981. p.521-543.

HERMINI, A.H.; TEIXEIRA, N.A.; MENDES, V.E.; PEREIRA, D.G. - Development of a software to control depression experiments through "The learned helplessness model". In WORLD CONGRESS ON MEDICAL PHYSICS AND BIOMEDICAL ENGINEERING. Rio de Janeiro, 1994. **Abstracts.** Bristol, Physics in Medicine and Biology, 1994. 39a, part 1. (Abstract, 430)

HOLMS, T.H. & RAHE, R.H. - The social readjustment rating scale. **J. Psychosom. Res. 11:** 213-218, 1967.

JACKSON, K.L.;LOON, D.J.; MAIER, S.F. - Long-term analgesia effects of inescapable shock and learned helplessness.**Science, 206:**91-94, 1979.

JAIN, R.; ZWICKLER, D.; HOLLANDER, C.S.; BRAND, H.; SAPERSTEIN, A.; HUTCHINSON, B.; BROWN, C.; AUDHYA, T. - Corticotropin-releasing factor modulates the immune response to stress in the rat. **Endocrinology, 128:**1329-1336, 1991.

JENSEN, M.M. - Transitory impairment of interferon production in stressed mice. **J. Infect. Disc., 118:**230-234, 1968.

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

LAUDENSLAGER, M.L.; RYAN, S.M.; DRUGAN, R.C.; HYSAN, R.L.; MAIER, S.F. - Coping and immunossuppression: inescapable but not escapable shock suppresses lymphocyte proliferation. **Science, 221:**568-570, 1983.

LEVINE, S.: Supression of experimental allergic encephalomyelitis by stress. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 96:**183-189, 1957.

LYSLE, D.T.; LYTE, M.; FOWLER, H.; ROBIN, B.S. - Shock -induced modulation of lymphocyte reactivity: suppression, habituation, and recovery. **Life Sci., 41:**1805-1814, 1987.

MAC LENNAN, A.J.; DRUGAN, R.C.; HYSON, R.L.; MAIER, S.F. - Dissociation of long-term analgesia and the Shuttle box escape deficit caused by inescapable shock. **J. Comp. Physiol. Psychol., 96:**904-912, 1982.

MAIER, S.F.; DAVIES, S.; GRAU, J.W.; JACKSON, R.L.; MORRISON, D.; MOYE, T.; MADDEN, J.; BARCHAS, J.D. - Opiate antagonists and the long-term analgesia reaction induced by inescapable shock. **J. Comp. Physiol. Psychol., 94:**1172-1184, 1980.

MAIER, S.F. - Stressor controllability and stress-induced analgesia. **Ann. N.Y. Acad. Sci., 467:**55-73, 1986.

MEISHERI, K.D. & ISOM, G.E. - Influence of immune stimulation and supression on morphine physical dependence and tolerance. **Res. Commun. Chem. Path. Pharmacol., 19:**85-99, 1978.

MIGUEL, A.S.; TEIXEIRA, N.A.; TAMASHIRO, W.; FLORES, C.A. - The inhibition of leukocyte migration in a rat model of depression and its reversal by treatment with lithium chloride (LiCl) In: IX REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DA SOCIEDADE DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 9, Caxambú, 1994. **Proceedings.** Campinas, Tecpress,1994. p.XLI.

MINEKA, S. & HANDERSEN, R.W. - Controlability and predictability in acquired motivation. **Ann. Rev. Psychol., 36:**495-529, 1985.

NOGAMI, H. & TACHIBANA, T. - Dexamethasone induces advanced growth hormone expression in the fetal rat pituitary gland in vivo. **Endocrinology, 132:**517-523, 1993.

PERITT, D.J.; JERRELLS, T.J.; HOLADAY, J.W.; BRYANT, H.U. - Suppression of interleukin-2 production with chronic morphine treatment. **Faseb J. 2:**A485. (Abstract)

QUEIROZ, M.L.S. - Effects of deltramethrin on the growth and differentiation of bone marrow hematopoietic stem cell. **Brazilian J. Med. Biol. Res., 26:**525-535, 1993.

RILEY, V. - Psychoneuroendocrine influences on immunocompetence and neoplasia. **Science, 212:**1100-1109, 1981.

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

SANDI, C.; BORRELL, J.; GUAZA, C. - Behavioral, Neuroendocrine, and Immunological outcomes of escapable or inescapable shocks. **Physiol. Behav., 51:**651-656, 1992.

SAPERSTEIN, A.; BRAND, H.; AUDHYA, T.; NABRISKI, D.; HUTCHINSON, B.; ROSENZWEIG, S.; HOLANDER, C.S. - Interleukin 1β mediates stress-induced immunosuppression via corticotropin-releasing factor. **Endocrinology, 130:**152-158, 1992.

SAPOLSKY, R.M. & DONNELLY, T.M.: Vulnerability to stress-induced tumor growth increased with age in rats: role of glucocorticoids. **Endocrinology, 117:**662-666, 1985.

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

TEIXEIRA, N.A.; PEREIRA, D.G.; HERMINI, A.H. - Chronic but not acute Li^+ treatment prevents behavioral depression in rats. **Brazilian J. Med. Biol. Res., 28:**1003-1007, 1995a.

TEIXEIRA, N.A.; PEREIRA, D.G.; HERMINI, A.H. - Lithium treatment prolongs shock-induced hypoalgesia. **Brazilian J. Med. Biol. Res., 28:**791-799, 1995b.

VISINTAINER, M.A.; VOLPICELLI, J.R.; SELIGMAN, M.E.P. - Tumor rejection in rats after inescapable or escapable shock. **Science, 216:**437-439, 1982.