



JULIA DE SOUZA QUEIROZ

ATIVIDADE MODULADORA DA ALGA *CHLORELLA VULGARIS* SOBRE
ALTERAÇÕES NEUROENDÓCRINAS E HEMATOPOÉTICAS CAUSADAS
PELO ESTRESSE

Campinas
2012



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

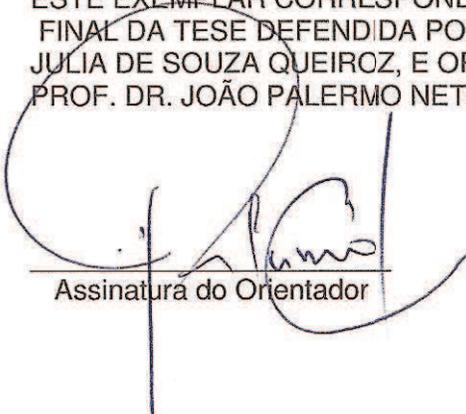
Julia de Souza Queiroz

**Atividade moduladora da alga *Chlorella vulgaris* sobre alterações
neuroendócrinas e hematopoéticas causadas pelo estresse**

ORIENTAÇÃO: Prof. Dr. João Palermo Neto
CO-ORIENTAÇÃO: Prof. Dr. Antonio Armario Garcia

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP para obtenção de
título de Doutora em Farmacologia.

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO
FINAL DA TESE DEFENDIDA POR
JULIA DE SOUZA QUEIROZ, E ORIENTADA PELO
PROF. DR. JOÃO PALERMO NETO.



Assinatura do Orientador

CAMPINAS
2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

Q32a	<p>Queiroz, Julia de Souza, 1982- Atividade moduladora da alga <i>Chlorella vulgaris</i> sobre alterações neuroendócrinas e hematopoéticas causadas pelo estresse / Julia de Souza Queiroz. -- Campinas, SP : [s.n.], 2012.</p> <p>Orientador : João Palermo Neto. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.</p> <p>1. Estresse psicológico. 2. Neuroendócrinologia . 3. Proto-oncogene . 4. Células-Tronco hematopoéticas. 5. Imunofenotipagem . I. Palermo Neto, João. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.</p>
------	--

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Modulating activity from *Chlorella vulgaris* on the neuroendocrinological and hematopoietic alterations caused by stress.

Palavras-chave em inglês:

Stress, Psychological

Neuroendocrinology

Proto-oncogen

Hematopoietic stem cells

Immunolabeling

Área de concentração: Farmacologia

Titulação: Doutora em Farmacologia

Banca examinadora:

João Palermo Neto [Orientador]

Marcos José Salvador

José Vassalo

Luciano Freitas Felcio

Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes

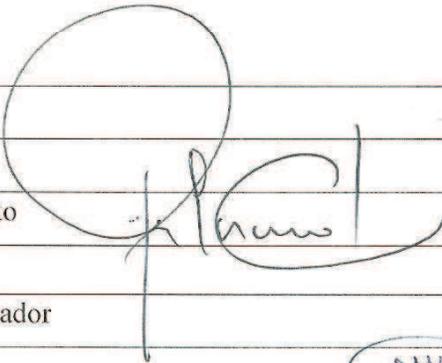
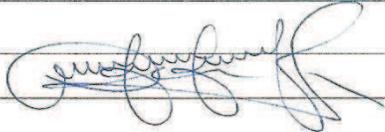
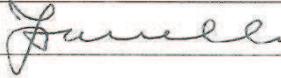
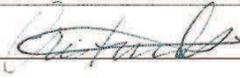
Data da defesa: 13-12-2012

Programa de Pós-Graduação: Farmacologia

Banca Examinadora de Tese de Doutorado

JULIA DE SOUZA QUEIROZ

Orientador: Prof. Dr. João Palermo Neto
Coorientador: Prof. Dr. Antonio Armario Garcia

Membros:	
Prof. Dr. João Palermo Neto	
Prof. Dr. Marcos Jose Salvador	
Prof. Dr. José Vassalo	
Prof. Dr. Luciano Freitas Felicio	
Profª. Dra. Cristina de Oliveira Massoco Salles Gomes	

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

Data: 13/12/2012

“Sempre que houver alternativas, tenha cuidado. Não opte pelo conveniente, pelo confortável, pelo respeitável, pelo socialmente aceitável, pelo honroso. Opte pelo que faz o seu coração vibrar, apesar de todas as consequências.”

OSHO

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. João Palermo Neto, por me aceitar como sua aluna novamente, por ter lido atentamente todos meus textos, por ter acreditado em meu trabalho, ter sido encorajador tantas vezes e colaborado com sua visão tão ampla e simplificada das coisas, sempre acrescentando em meus pontos de vista, me apoiar em minhas decisões. Bastava uma conversa com ele e aquilo que estava levando dias para ser compreendido, ficava tão claro.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Antonio Armario, pela minha oportunidade de estar em um laboratório europeu, e ainda melhor, em seu laboratório, onde aprendi muito, conheci pessoas que se tornaram muito queridas para mim, tive todo o apoio necessário e um ano incrível. Foi uma experiência muito enriquecedora. Fui muito bem orientada, aprendi muito, e me senti muito bem acolhida. Sem dúvidas, um orientador muito dedicado e atencioso.

À minha querida mãe, Profa. Dra. Mary L. de Souza Queiroz, por ter me dado a chance e o impulso inicial para começar o doutorado. Por ter me recebido em seu laboratório e me orientado por grande parte do tempo. Dedicou horas me ensinando a escrever de forma científica, discutindo meus resultados. Tenho muito orgulho de ser sua filha! Reconheço muita força e sabedoria em você.

À Profa. Dra. Claudia Bincoletto por me permitir fazer experimentos em seu laboratório, me ajudar muito com o artigo científico. Por ser uma pessoa tão humilde, receptiva e calorosa.

À Prof. Dra. Roser, pelo carinho, pelo apoio, por fazer do ambiente do laboratório da UAB um lugar tão familiar, incentivando a todos o tempo todo. Por ter me escutado em momentos difíceis e me dado todo o apoio, me fazendo sentir muito melhor depois que saia de sua sala.

Ao Bruno da pós-graduação de farmacologia da FCM-UNICAMP, pela prestatividade, eficiência, atenção e paciência sempre!

Ao Prof. Dr. Edson, por estar sempre disponível e disposto a ajudar com os problemas de forma sempre tão atenciosa.

Aos colegas do laboratório da UNICAMP (CFU), cada um com seu jeito diferente de ver as coisas que sempre complementavam minhas idéias. O tempo com vocês foi maravilhoso. Chegar ao laboratório era muito prazeroso e divertido. É muito bom sentir o apoio de vocês. Torço muito por todos. Ter tudo isso em um ambiente de trabalho, não tem preço:

Michele, Andrana e Ju Vecina, minhas queridas, pela amizade, apoio, conversas, explicações, ajudas com experimentos, por terem sido tão colaboradoras, sempre dispostas, por termos sido um time por tanto tempo, pelos nossos almoços juntas, pelo ambiente descontraído que conseguimos ter.

Sueli, pelo seu humor incrível, amizade, paciência, por saber dar puxões de orelha com muito jeitinho, pelas conversas, por mostrar o tempo todo que queria o melhor de todas nós e do laboratório como um todo.

Cris Okuda, por ser tão inteligente e compartilhar conosco de uma forma muito humilde!! Pela amizade e apoio.

Marcos, pelas ajudas com os experimentos.

Aos colegas do laboratório de Barcelona (UAB). Como foi maravilhoso o tempo com todos vocês. Um laboratório com jeito de casa, todo mundo querendo o bem do outro, ajudando, compartilhando com os estresses, apoiando... fui ficando, de 6 meses consegui fazer um ano e voltei com o coração apertado. Em especial à(o):

Almudena, por ajudar com tudo o que eu precisei, sempre com uma paciência enorme, sempre tão disponível, mesmo estando ocupada. Pela sua amizade, por tornar muitos dos dias difíceis mais tranquilos. Obrigada por sua leveza, querida amiga!

Natxo, por ter me ensinado muito, me acompanhou com tudo, sempre tão engajado com meu trabalho, sempre disposto a ajudar, até mesmo com os experimentos longos e cansativos. Ensinou-me muitas das técnicas que aprendi por lá. Por sua grande amizade, pelas muitas conversas que tivemos e pelo tempo que passamos juntos.

Xavi, por me ajudar sempre com minhas dúvidas, com muita paciência e também por sua amizade. Por ter sido a pessoa que me apoiou desde o dia em que cheguei, com o planejamento dos experimentos e com minha adaptação.

Ancor, companheiro de sala, que ficava no computador ao lado do meu. Foi muito bom tê-lo por perto, pelas muitas risadas, conversas e por tirar dúvidas com relação aos gráficos e a estatística.

À Núria, pela ajuda com os experimentos, por tirar tantas dúvidas, ajudar com o gravador de imagens e emprestar o carrinho de supermercado.

À Cristina Rabassa, por ser uma pessoa tão boa de se ter por perto, por seu sorriso, sua leveza, e por ser tão disponível.

Ao Humberto Gagliano, por me ensinar a técnica de Radioimunoensaio e ser sempre tão amigo, querido, e dar abraços deliciosos.

Ao Javier Carrasco, por me ensinar a técnica de hibridização in situ.

À Mar, por me ajudar e mostrar como cortar o cérebro.

Ao David, pela ajuda com contas, fotos, microscópio, experimento e tudo o mais que eu precisei.

À Pilar, pelo carinho, a alegria e por manter o laboratório em ordem, preparar todos os reagentes necessários aos experimentos. Pelas conversas e tempo juntas.

À Gemma, pelo seu bom humor, risadas e amizade.

Às minhas grandes amigas Neus e Mariana e suas famílias. Amigas para uma vida, com certeza. Foi maravilhoso ter conhecido vocês. Obrigada por me colocarem dentro de suas famílias e me proporcionarem momentos incríveis de viagens, jantares, almoços, muitas conversas, cumplicidade, carinho. Minha família catalana!!

Às queridas companheiras de apartamento Jimena e Miao, maravilhosas amigas e companhias para tudo. Fizeram meu segundo semestre em Barcelona, quando me mudei com elas, muito mais divertido!

Ao Dr. Christiano Barbosa, por colaborar com a parte de Imunofenotipagem e por corrigir o trabalho com tanta atenção.

À Gláucie Alves, por, em um momento “perdido” ter me oferecido ajuda para o que eu precisasse, e ter ajudado em um experimento.

Ao Rodrigo, por ser sempre tão atencioso e querido, me ajudando com tudo o que eu precisei.

À Cláudia do biotério, por ter me ajudado com pedido de animais.

Ao Prof. Jorge, por ter estado disponível para tirar minhas dúvidas de estatística.

Ao Wanderlei, por ser tão disposto, ter me ajudado com o que precisei e ter me explicado sobre estatística.

À todos outros colegas do laboratório de Neuroimunomodulação, Natô, Viviane, Andrea, Milena, pelo apoio e suporte.

Ao meu pai, por ter sido meu pai, me ensinado a ser forte e determinada, por, no final de sua vida, ter me dado a oportunidade de me aproximar tanto e de poder ter visto em seus olhos o sofrimento de uma alma que cresce, de um amor que transborda em lágrimas, e o mais lindo, de uma dor que se transforma em amor.

À minha querida tia Suzana, pelo carinho e apoio sempre, por acreditar em mim, pelas conversas que sempre me fizeram tão bem, por me deixar morar em seu apartamento mais uma vez! Sempre que a procurei fui recebida com muito carinho e abertura. Por ser sempre disposta a me apoiar naquilo que ela sabia que fazia sentindo para mim e não naquilo que, ao seu ver, seria o mais adequado. Isso me deu forças nos momentos que mais precisei acreditar em mim mesma.

Aos queridos D. Xika e Sr. Oswaldo por terem feito parte da minha vida de forma tão próxima por tanto tempo, me enchendo de carinho, apoio, por me terem como uma filha. Pelos abraços tão genuínos e por terem me dado forças sempre que precisei. Reconheço neles muita bondade e muito amor incondicional.

Aos meus queridos amigos de fora do mundo acadêmico, Cíntia Oliveira, Karin Kieling, Gustavo Scaranelo, Caio Barini, Luciene Diostine, Luis Missura, Josie Custódio,

Tamyres Pimentel, Fernanda Milani, Roberta Ruela, por fazerem meu mundo muito mais colorido, cheio de amor, risadas, compartilharmos alegrias, dores.

Às minhas primas Lú e Ma, ao meu irmão Dani e a minha tia Sílvia pelo carinho, amizade. Adoro tê-los como minha família.

À FAPESP (temático nº 09/51886-3) e ao CNPq (bolsa de doutorado do departamento de Farmacologia) pelo apoio financeiro imprescindível para a realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS.....	xxiii
LISTA DE FIGURAS.....	xxix
RESUMO.....	xxxI
ABSTRACT.....	xxxiii
1. INTRODUÇÃO	35
1.1 Conceito e resposta neuroimunoendócrina geral ao estresse.....	35
1.2 O eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA).....	39
1.2.1 O núcleo Paraventricular do Hipotálamo (PVN).....	41
1.2.2 Projeções diretas ao PVN.....	42
1.2.3 Projeções indiretas ao PVN.....	45
1.2.4 Os hormônios do eixo HPA.....	47
1.2.4.1 Fatores liberadores de ACTH: CRF.....	47
1.2.4.2 Hormônios Periféricos: ACTH e Corticosterona.....	49
1.2.5 Dinâmica do eixo HPA em resposta ao estresse.....	52
1.3 Uso de c-fos como marcador da ativação neuronal.....	53
1.4 O sistema hematopoético.....	54
1.4.1 Células tronco hematopoéticas (HSCs).....	55
1.4.2 Células progenitoras hematopoéticas multipotentes.....	56
1.4.3 Células progenitoras hematopoéticas linhagem-específica.....	57
1.4.4 O conceito de cascata e diferenciação de progenitores.....	57
1.4.5 Citocinas reguladoras da hematopoese.....	58
1.4.6 Receptores de citocinas e diferenciação de progenitores.....	58
1.4.7 Mecanismo de regulação da resposta hematopoética.....	59
1.5 Chlorela Vulgaris (CV).....	64
2. JUSTIFICATIVA.....	69
3. OBJETIVOS.....	71
1.6 Gerais.....	71
1.7 Específicos.....	71

4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	73
4.1 Animais.....	73
4.2 Estresse.....	74
4.3 Chlorella Vulgaris (CV).....	75
4.4 Obtenção de amostras de sangue.....	75
4.5 Análises Bioquímicas.....	76
4.5.1 Radioimunoensaio de ACTH.....	76
4.5.2 Radioimunoensaio de corticosterona.....	76
4.6 Valoração enzimática da Glicose.....	72
4.7 Procedimentos Histológicos.....	72
4.7.1 Extração e processamento do cérebro.....	72
4.7.2 Obtenção da Ribosonda Radioactiva.....	78
4.7.3 Hibridização in situ.....	78
4.7.4 Emulsão (Autoradiografia).....	80
4.7.5 Análise de Imagens.....	80
4.8 Cultura de Longa Duração de Células Progenitoras Hematop. (LTBMC).....	84
4.8.1 Ensaios clonogênicos (CFU-GM) da LTBMC.....	85
4.8.2 Dosagem de citocinas na LTBMC.....	85
4.9 Avaliação da atividade estimuladora de colônias (CSA) no soro.....	85
4.10 Cultura Clonal de Precusores Hematopoéticos (CFU-GM).....	86
4.11 Imunofenotipagem de células hematop. da LTBMC e da Medula Óssea.....	86
4.12 Morte celular na medula óssea.....	87
4.13 Análise estatística.....	88
5. RESULTADOS.....	90
5.1 Níveis de ACTH.....	90
5.2 Níveis de corticosterona.....	91
5.3 Níveis de Glicose.....	93
5.4 Ativação neuronal	95
5.4.1 c-fos.....	95
5.4.2 hnCRF.....	106
5.5 Mielopoiese medular.....	107
5.6 Atividade estimuladora de colônia (CSA).....	109
5.7 Imunofenotipagem das células da medula óssea.....	110

5.7 Morte celular.....	114
5.9 Cultura Líquida de Longa Duração (LTBMC).....	115
5.9.1 Número total de CFU-GM na LTBMC.....	115
5.9.2 Imunofenotipagem de células da LTBMC.....	118
5.9.3 Produção de IL-1 α e IL-6 no sobrenadante de LTBMC.....	120
DISCUSSÃO.....	124
CONCLUSÕES.....	142
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	144
ANEXO.....	172

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH: Hormônio adrenocorticotrópico, do inglês, Adrenocorticotropic Hormone

AMPc: Adenosina Monofosfato cíclico

ARC: Núcleo Arqueado do Hipotálamo

AVP: Arginina-vasopressina

BLA: Amígdala, subdivisão basolateral

BST: Núcleo do Leito da Estria Terminal

CeA: Amígdala, subdivisão central

CFU-GM: Unidades formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos, do inglês, Colony Forming Unit - Granulocytes and Macrophages

CFU-S: Unidade formadora de colônias do baço, do inglês, Colony Forming Unit - Spleen

CRF: Fator liberador de corticotrofina, do inglês, Corticotrophin Releasing Factor

CRFR1: Receptor para CRF do tipo 1, do inglês, Corticotrophin Releasing Factor Receptor 1

CRFR2: Receptor para CRF do tipo 2, do inglês, Corticotrophin Releasing Factor Receptor 2

CSA: Atividade estimuladora de colônias, do inglês, Colony Stimulating Activity

CV: *Chlorella vulgaris*

DEPC: Dietilpirocarbonato

DM: Núcleo Dorsomedial do Hipotálamo

DR: Núcleo da Rafe dorsal, do inglês Dorsal Raphe

DRD: Rafe dorsal, dorsal

DRV: Rafe dorsal, ventral

DTT: Ditiotreitól

EM: Eminência Média, do inglês Median Eminence

G-CSF: Fator Estimulador de Colônias para Granulócitos

GM-CSF: Fator Estimulador de Colônias para Granulócitos e Macrófagos

GR: Receptor de Glicocorticóides

HF: Formação hipocampal

hnCRF: RNA heteronuclear de CRF

hnRNA: RNA heteronuclear

HP: Progenitores Hematopoéticos, do inglês, Hematopoietic Progenitors
HPA: Eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenais
HSC: Células Tronco Hematopoéticas, do inglês, Hematopoietic Stem Cells
IEG: Gene de expressão precoce, do inglês, Immediate Early Gene
IF: Córtex Infralímbico
IL: Interleucina
IFN- γ : Interferon gamma
LTBMC: Cultura Líquida de Longa Duração de Células da Medula Óssea, do inglês, Long Term Bone Marrow Culture
LC: Locus Coeruleus
LH: Hipotálamo Lateral, do inglês, Lateral Hypothalamus
LM: Listeria Monocytogenes
LS: Septum Lateral, do inglês, Lateral Septum
M-CSF: Fator Estimulador de Colônias para Macrófagos, do inglês, Colony Stimulating Factor for Macrophages
MeA: Amígdala, subdivisão medial, do inglês, Medial Amígdala
MePO: Núcleo Preóptico Medial do Hipotálamo
MC2-R: Receptor de Melanocortinas tipo 2
MnR: Rafe medial, do inglês, Medial Raphe
mPVN: Núcleo Paraventricular do Hipotálamo, região Magnocelular, do inglês, Magnocelular Paraventricular Nucleus
mpPVN: Núcleo Paraventricular do Hipotálamo, Medial Parvocelular, do inglês, Medial Parvocelular Paraventricular Nucleus
mpdPVN: Núcleo Paraventricular do Hipotálamo, Medial Parvocelular Dorsal, do inglês, Dorsal Medial Parvocelular Paraventricular Nucleus
mPFC: Córtex pré-frontal, subregião medial, do inglês, Medial Pre-Frontal Cortex
MR: Receptor para Mineralocorticóides, do inglês, Mineralocorticoid receptor
NA: Noradrenalina
NK: Células Natural Killer
NTS: Núcleo do Trato Solitário
OVL: Órgão Vascular da Lâmina Terminal

OX: Oxitocina

PAG:Substância Cinzenta Pariaquedutal

PE: Ficoeritrina

PFC: Córtex Pré-Frontal, do inglês, Pre-Frontal Cortex

PKA: Proteína Quinase

PO: Área Pré-Óptica Medial do Hipotálamo

POMC: Pró-opiomelanocortina

PrL: Córtex Pré-Límbico, do inglês, Pre-Limbic Cortex

PVN: Núcleo Paraventricular do Hipotálamo, do inglês, Paraventricular Nucleus from Hypothalamus

PVT: Núcleo Paraventricular do Tálamo

RIA: Radioimunoensaio, do inglês, Radioimmunoassay

SBF: Soro Fetal Bovino

SFO: Órgão subfornical, do inglês, Subfornical Organ

SNAS: Sistema Nervoso Autônomo Simpático

SNC: Sistema Nervoso Central

TEA: Trietanolamina

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral alpha, do inglês, Tumor Necrosis Factor

UAB: Universidade Autônoma de Barcelona

UCN: Urocortinas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	O Eixo HPA.....	40
Figura 2	O Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (PVN).....	41
Figura 3	Projeções diretas ao PVN.....	44
Figura 4	Projeções indiretas ao PVN.....	47
Figura 5	O Sistema Hematopoético.....	63
Figura 6	Localização estereotóxica de áreas do SNC.....	81
Figura 7	Imagens representativas da expressão de c-fos no Córtex pré-frontal medial (mPFC).....	97
Figura 8	Imagens representativas da expressão de c-fos no Septum Lateral ventral (LSv).....	99
Figura 9	Imagens representativas da expressão de c-fos no Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (PVN).....	101
Figura 10	Imagens representativas da expressão de c-fos no Dorsal da Raphe (DR).....	103
Figura 11	Imagens representativas da expressão de c-fos no Locus coeruleus (LC).....	105
Figura 12	Imagens representativas da expressão de hnCRF no Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (PVN).....	107
Figura 13	Resumo da discussão.....	141

RESUMO

A exposição do organismo a estressores psicossociais e ambientais altera de forma significativa o funcionamento do sistema imune. Os efeitos do estresse sobre a resposta imune têm sido atribuídos, principalmente, à ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) com conseqüente aumento nos níveis de ACTH e glicocorticóides e à ativação do sistema nervoso autônomo simpático (SNAS), com liberação de catecolaminas. Nos últimos anos, a alga *Chlorella vulgaris* (CV) tem despertado o interesse da comunidade científica pelos seus efeitos moduladores sobre as defesas do hospedeiro imunossuprimido. Em estudos anteriores mostramos que o restabelecimento da geração de granulócitos-macrófagos nos órgãos hematopoéticos e a ativação das funções efetoras de fagócitos e linfócitos são cruciais na expressão da atividade imunomoduladora da alga. No entanto, nada se sabe sobre os efeitos da CV no sistema nervoso central em situações de estresse. Sendo assim, neste trabalho realizamos estudos pioneiros com relação ao efeito do tratamento com a alga sobre: 1) a ativação neuronal (c-fos) no córtex pré-frontal, septum lateral, núcleo da Rafe e locus coeruleus; 2) a ativação do eixo HPA através da expressão do gen de hnCRF na região parvocelular do núcleo paraventricular do hipotálamo, mpdPVN, liberação de ACTH e de corticosterona e, 3) avaliação indireta da atividade do SNAS através dos níveis de glicose no plasma de animais estressados. Considerando-se a medula óssea ser o sítio de origem das células pluripotenciais das quais se originam as células do sistema hematopoético, e que este sistema é totalmente vulnerável ao controle neuroendócrino, avaliamos os efeitos do tratamento com CV sobre a hematopoese de animais estressados através do 4) crescimento e diferenciação de precursores para granulócitos e macrófagos (CFU-GM); 5) presença de fatores estimuladores da formação de colônias do soro (colony stimulating activity - CSA); 6) quantificação de populações de células maduras e imaturas e 7) morte celular na população de células tronco. A regulação da produção de células hematopoéticas pelas células do estroma da medula óssea em camundongos estressados foi avaliada pela técnica de cultura líquida de longa duração de células da medula óssea (LTBMC), que consiste em um modelo *ex vivo* para o estudo das interações entre as células progenitoras hematopoéticas e as células do estroma. Nela avaliamos 8) o CFU-GM, níveis de IL-1 α / IL-6 e quantificamos uma população madura e uma imatura. Nossos resultados mostraram que a aplicação do estressor produziu um aumento na expressão de c-fos em todas as áreas cerebrais avaliadas, assim como na expressão do gen de hnCRF na região mpdPVN. Os níveis de ACTH e corticosterona também estavam aumentados após o estresse, assim como os níveis de glicose. Na medula óssea observamos que a aplicação do estressor reduziu o número de CFU-GM, e aumentou os níveis de CSA no plasma. Houve um aumento na morte celular e redução no número de precursores hematopoéticos e de células maduras. Na LTBMC, um prejuízo na atividade funcional do estroma medular foi observado através: da redução do CFU-GM, dos níveis de IL-1 α / IL-6 e do número de células imaturas e maduras. O aumento na expressão de c-fos após o estresse foi prevenida pelo tratamento com CV em todas as áreas avaliadas, com exceção da região magnocelular do PVN. O resultado mais acentuado do tratamento com CV foi observado na redução da expressão de c-fos no núcleo da Rafe e do gen para hnCRF no mpdPVN, que se encontraram em níveis semelhantes aos observados no grupo controle após o estresse. Todas as alterações hematopoéticas causadas pelo estresse foram prevenidas pelo tratamento com CV. Tomados em seu conjunto, nossos resultados mostraram que o efeito protetor da hematopoese pode ser devido a uma prevenção na ativação neuronal de áreas cerebrais relacionadas à decodificação do estressor do tipo emocional, reduzindo a amplitude de ativação do eixo HPA e do SNAS.

ABSTRACT

The exposition of the organism to psychosocial and environmental stressful stimuli alters the functioning of the immune system in a significant way. The effects of stress on the immune response are mainly attributed to the activation of the hypothalamic-pituitary axis (HPA) with consequent increment on ACTH and glucocorticoids levels and, to the activation of the autonomic nervous system, with the incremented levels of catecholamines. In the last years, increasing interest about the algae *Chlorella vulgaris* (CV) has been demonstrated by the scientific community, due to its modulatory effects on the defenses of the immunosuppressed host. In previous studies we demonstrated that the reestablishment of the generation of granulocytes and macrophages in bone marrow and, the activation of effector functions of phagocytes and lymphocytes, are crucial features about the immunomodulatory activity from the algae. However, nothing is known about the activity of CV in the central nervous system. Thus, pioneer investigation was made in this work about the effect of treatment with the CV on: 1) neuronal activation (c-fos) in pre-frontal cortex, lateral septum, Rafe nucleus and locus coeruleus; 2) activation of the HPA axis by analysis of expression of the gene to hnCRF in the parvocellular region from the paraventricular nucleus of the hypothalamus –mpdPVN and the release of ACTH and corticosterone) and, 3) glucose levels, as an indirect indicator of autonomic nervous system activity. Considering that the bone marrow is the site of origin from pluripotent cells from which all cells from the hematopoietic system are originated, and also that this system is vulnerable to the neuroendocrine control, we evaluated the effects of the treatment with CV on the hematopoiesis of stressed animals through 4) growing and differentiation of precursors to granulocytes and macrophages (CFU-GM); 5) colony stimulating activity from the serum (CSA); 6) quantification of population of mature and immature populations and 7) cell death. The interaction between stromal cells and hematopoietic progenitors in stressed mice was evaluated by the technique of long term bone marrow culture (LTBMC). In the culture we evaluated 8) the CFU-GM, levels of IL-1 α / IL-6 and quantification of mature and immature population. The application of the stressor produced an increase in the expression of c-fos in all brain areas evaluated and in the expression of the gene to hnCRF in mpdPVN. Increased levels of ACTH, corticosterone and glucose found in stressed animals corroborate these findings. Reduced numbers of CFU-GM in the bone marrow and increase in plasma CSA, increased cell death in stem cell population (LSK) and decreased numbers of hematopoietic precursors and of mature cells was also observed in stressed group. In LTBMC we observed impairment on the functional activity from medular stroma, which was observed by reduction of: CFU-GM, IL-1 α / IL-6 levels and number of immature and mature cells. Treatment with CV partially prevented increase in c-fos activation caused by stress in the brain except in the magnocellular region from PVN. The more accentuated result from treatment with CV of stressed animals was observed in the expression of c-fos in the Raphe nucleus and in the expression of the gene to hnCRF in mpdPVN, where levels were similar to that observed in control group. All hematopoietic alterations observed after stress were prevented by the treatment with CV. Taken together, our results demonstrate that the protective effect of the treatment with CV on hematopoiesis of stressed animals may be due to a prevention of the neuronal activation in areas related to the decodification of the emotional stressful stimuli, reducing the amplitude of HPA axis and autonomic nervous system activity.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Conceito e resposta neuroimunoendócrina geral ao estresse

Hoje em dia está bem estabelecido que a exposição ao estresse causa importantes alterações fisiológicas e psicológicas. Estresse, termo de amplo uso diário, tem sido considerado uma das mais importantes enfermidades de nosso tempo, provavelmente devido ao ritmo e ao estilo de vida imposto pelo ser humano. A crescente investigação na área do estresse deve-se ao fato de ser a exposição a estressores capaz de influir no aparecimento e desenvolvimento de diversas doenças (Chrousos e Gold, 1992). Este fato provocou um aumento exponencial de informações disponíveis sobre as interações entre áreas do sistema nervoso central (SNC) que controlam a resposta ao estresse, assim como os efeitos deste sobre o sistema imune.

No início do século XX, o fisiologista Walter Cannon se apoiou no conceito de “Milieu interieur” proposto por Claude Bernard para afirmar que os organismos mantêm um equilíbrio fisiológico interno (homeostase) apesar das perturbações causadas por mudanças no ambiente externo (Goldstein e McEwen, 2002). Cannon destacou como elemento chave para a manutenção da homeostase o sistema nervoso autônomo simpático (SNAS), após observar que este sistema reagia frente a diferentes situações de emergência, como dor, hemorragia ou frio. Ele também introduziu o conceito de luta ou fuga ou reação de alarme a reações dos animais frente a situações ameaçadoras. Cannon nunca definiu o termo estresse diretamente, mas o utilizava em seus textos para referir-se a agentes adversos do ambiente que traziam perigo ao equilíbrio homeostático dos organismos e que geravam, respostas compensatórias. Cabe destacar de seus trabalhos que, entre a gama de situações adversas, não apenas estímulos físicos, como o calor e a hipotensão, eram incluídos, mas também, e de forma prioritária, os estímulos psicológicos, aspecto fundamental da atual definição de estresse (Pacak e Palkovits, 2001).

Dentro de uma perspectiva histórica, temos que reconhecer nos trabalhos do endocrinólogo Hans Selye, a verdadeira origem do que conhecemos hoje sobre o estresse. A partir do ano de 1936, foi Selye quem desenvolveu e popularizou o conceito de estresse como “a resposta específica do organismo frente a qualquer demanda”. Observou que a exposição a distintas situações adversas de carácter físico dava lugar, em animais, a uma

resposta fisiológica estereotipada comum, caracterizada por perda de peso, hipertrofia das adrenais, formação de úlceras gastrointestinal e redução do timo e dos nódulos linfáticos. Este quadro, que aparecia independente do tipo do agente utilizado, foi definido como “síndrome geral de adaptação”, que compreendia três etapas (Goldstein e Kopin, 2007): (1) a “reação de alarme”, caracterizada por uma descarga imediata de adrenalina pelo SNAS, semelhante à resposta de luta e fuga proposta por Cannon; (2) a “etapa de adaptação” ou de resistência, durante a qual ocorreriam importantes mudanças nos sistemas fisiológicos e (3) a “etapa de esgotamento”, que apareceria quando o estressor persistisse ultrapassando os mecanismos adaptativos e provocando a morte do organismo.

Nos primeiros trabalhos de Seyle existia uma certa confusão se o termo “estresse” era designado ao estímulo que causava as mudanças fisiológicas ou à resposta do organismo ao estímulo. Por isso, ele se viu obrigado, anos mais tarde, a diferenciar o termo estressor, referido ao agente estressante que dá lugar à perturbação, e estresse, como sendo a resposta inespecífica do organismo frente ao desequilíbrio. Atualmente, a terminologia mais adequada distingue entre estímulo estressante (estressor) e estresse (estado do organismo) e resposta ao estresse (Armário, 2006b). Posteriormente, Seyle demonstrou que as mudanças fisiológicas mais relevantes estavam associadas à liberação de glicocorticoides pelo córtex das adrenais, que não apenas contribuía para a resistência do organismo frente a situações adversas, como também poderia ser responsável pelas doenças desenvolvidas a partir deste desequilíbrio. Desta maneira, enquanto Cannon deu especial ênfase à ativação do SNAS para a manutenção da homeostase, Seyle enfatizou o papel do eixo hipotálamo-pituitária-adrenais (HPA) como o principal sistema efetor da resposta do organismo frente a agentes nocivos e perigosos, contruindo-se assim, entre ambos os autores, as bases do que hoje entendemos como resposta ao estresse.

Resumidamente, a exposição a situações de estresse em vertebrados implica na ativação de dois grandes sistemas fisiológicos: (i) o sistema nervoso autônomo, especialmente o ramo simpático, com a conseqüente liberação de adrenalina e noradrenalina (NA), na circulação; e (ii) o eixo HPA, responsável pela liberação de glicocorticoides na corrente sanguínea. Ambos os sistemas possuem um papel crucial na resposta ao estresse, dando lugar a mudanças tanto fisiológicas como cognitivo/comportamentais indispensáveis para a sobrevivência do indivíduo. No geral, o organismo se prepara para uma situação de alarme e necessitará mobilizar energia de forma rápida para favorecer os comportamentos ativos. A liberação de catecolaminas proporciona um aumento imediato da frequência cardíaca e da pressão arterial, junto com

um aumento da glicemia e da lipólise. Os glicocorticóides vão potencializar o catabolismo inibindo assim, processos fundamentalmente anabólicos como o crescimento e a reprodução.

O estresse pode afetar o sistema imune através da inervação de órgãos linfóides primários e secundários, liberando neuropeptídeos e neurotransmissores (Felten et al., 1984; Tabarowski et al., 1996; Stevens-Felten e Bellinger, 1997; Miyan et al., 1998), e através da presença de receptores específicos para muitos fatores neuroendócrinos em células imunocompetentes (Weigent e Blalock, 1987 e 1997, Blalock, 1994a; Kelley et al., 1994; Turnbull e Rivier, 1999) e a modulação direta ou indireta da atividade dessas células por esses fatores, incluindo-se aqui o ACTH, hormônios esteróides, adrenalina, noradrenalina, serotonina, dopamina, opióides endógenos, entre outros, que constituem vias importantes através das quais o sistema neuroendócrino influencia as respostas imunes (Besedovsky et al., 1985; Blalock, 1994b; Weigent e Blalock, 1995, Jorgensen et al., 2002). Neste sentido, estudos mostram que o estresse afeta a distribuição e a migração de leucócitos, a produção de citocinas, a relação entre células TCD4/TCD8, além de inibir a produção de anticorpos, a atividade de macrófagos e de células “natural killer” (NK) e a resposta de linfócitos a mitógenos (Dhabhar et al., 1995; Dobbs et al., 1996; Bauer et al., 2000, Palermo-Neto et al., 2001, 2003; Fonseca et al., 2002; Costa-Pinto and Palermo Neto, 2010; Quintero-Filho et al., 2012).

Um estressor “real” representa uma autêntica ameaça à homeostase que é reconhecida através de vias sensoriais somáticas, viscerais ou circuventriculares. Estes estressores são conhecidos como do tipo físico (também denominado sistêmico) e incluem modificações no tono cardiovascular, hipoxia e hipoglicemia, assim como sinais químicos e humorais indicadores de infecção ou inflamação. No entanto, o eixo HPA também pode se ativar frente a estímulos que não causem uma alteração homeostática direta. Estes são denominados estressores do tipo emocional (também denominados antecipatórios) e, como exemplo, temos os do tipo social (competição por hierarquia social, isolamento ou privação materna) e o medo a uma situação desconhecida ou a um perigo eminente (presença de predador). A resposta é gerada no SNC e representa um esforço do organismo em desenvolver uma resposta antecipatória a uma possível alteração homeostática. Estas respostas “antecipatórias” são geradas tanto pela predisposição inata de cada espécie (reconhecimento de um predador, ou do perigo associado a alturas ou espaços abertos)

como por um condicionamento clássico (mediante aprendizagens baseados na associação entre estímulos).

A teoria do estresse emocional foi desenvolvida no final dos anos 60 por Richard Lazarus. Ele determinou que as situações apenas se tornariam estressores quando fossem percebidas como ameaçadoras, perigosas e incontroláveis. Segundo Lazarus, os indivíduos não poderiam reagir de forma efetiva sem realizar previamente uma avaliação cognitiva, que poderia ser consistente ou não (Lazarus, 1993). Neste contexto, o modo pelo qual se avalia e se enfrenta um estressor modifica as suas consequências, não existindo, portanto, uma resposta estereotipada para todos os indivíduos (Korte, 2005).

A ativação do eixo HPA em resposta a estressores sistêmicos é o resultado de uma conexão direta com o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN). Ao contrário, a ativação do PVN em resposta a estressores emocionais segue um caminho que pode envolver muitas estruturas encefálicas superiores, como o córtex pré-frontal (PFC), a formação hipocampal (HF), o septum lateral (LS), diferentes sub-regiões da amígdala, o núcleo estriado e um conjunto de núcleos hipotalâmicos que se projetam diretamente ao PVN. A maioria dos estressores utilizados em laboratórios possuem, de alguma forma, ambos componentes emocional e sistêmico. Por exemplo, a natação forçada envolve exercício físico e, quando realizado a uma temperatura menor que 36º graus pode gerar hipotermia (Porsolt et al. 1979; Dal-Zotto et al. 2000). Já o estresse por restrição em tubos cilíndricos de plástico não envolve o componente sistêmico, sendo considerado apenas emocional (revisão em Armario, 2006b).

Uma resposta adequada e coordenada dos diferentes sistemas envolvidos na resposta de estresse é crucial para a sobrevivência do organismo e do seu funcionamento normal. Quando estas respostas são exageradas, inapropriadas ou duradouras, a resposta ao estresse parece estar ligada a uma série de alterações fisiológicas e psicológicas, influenciando a homeostase através de alterações no equilíbrio de vários hormônios (Kusnekov et al., 1992; Stratakis e Chrousos, 1995; Dhabhar et al., 1996; McEwen et al., 1997; Elenkov et al., 1999), gerando enfermidades como hipertensão arterial e problemas cardiovasculares (Bohus e Koolhaas, 1993; Steptoe, 1993), infertilidade (Moberg, 1985), neurodegeneração (Sapolsky, 1992), alterações do comportamento alimentar (Brambilla, 2001), transtornos do estado de humor e ansiedade (Halbreich, 1987), transtornos psicóticos, como a esquizofrenia (ver revisão em Walker et al., 2008) e propensão ao consumo de drogas (Piazza e Le Moal, 1997), assim como um impacto significativo na

resposta imune em geral (Stratakis e Chrousos, 1995; Berczi, 1998; Khansari et al., 1990; Sternberg, 1997).

1.2- O eixo Hipotálamo-Pituitária-Adrenal (HPA)

O eixo HPA desempenha um papel central nas alterações fisiopatológicas e psicopatológicas resultantes da exposição a estressores e, por esta razão, é um dos sistemas melhor caracterizados desde o ponto de vista nervoso e endócrino (Armario, 2006b). O eixo HPA, como outros sistemas neuroendócrinos, tem vários níveis anatômicos e pressupõem a liberação de vários hormônios (Fig. 1).

Como já mencionado anteriormente, os estímulos emocionais se processam em estruturas encefálicas superiores e acabam ativando, de forma polisináptica, neurônios parvocelulares do PVN, através de estruturas límbicas superiores como o PFC, a amígdala, o septum ou o estriado ventral. Os estímulos sistêmicos ativam principalmente a subregião magnocelular do PVN mediante vias mais diretas desde o tronco encefálico ou áreas circumventriculares (Herman e Cullinan, 1997). A informação relacionada a estressores converge no PVN, que envia seus axônios à zona externa da eminência média (EM), liberando por excitação fatores hipotalâmicos ao sistema porta-hipofisário, regulando o eixo HPA. O fator liberador de corticotrofina (CRF), junto com outros fatores hipotalâmicos como a vasopresina (arginina-vasopresina, AVP, na maioria dos mamíferos), alcança a adenohipófise onde estimula a síntese e a liberação de ACTH na circulação. Este, por sua vez, atua sobre o córtex da adrenal estimulando a síntese e secreção de glicocorticóides (principalmente cortisol em humanos e corticosterona em roedores). Finalmente, os glicocorticóides exercem diversos efeitos no organismo, contribuindo em grande medida a muitas das consequências negativas de um estresse crônico (infertilidade, imunossupressão, doenças). Por outro lado, os glicocorticóides são capazes de regular a atividade do eixo HPA mediante retroinibição exercida principalmente a nível hipocampal, hipotalâmico e hipofisário (Armario, 2006b).

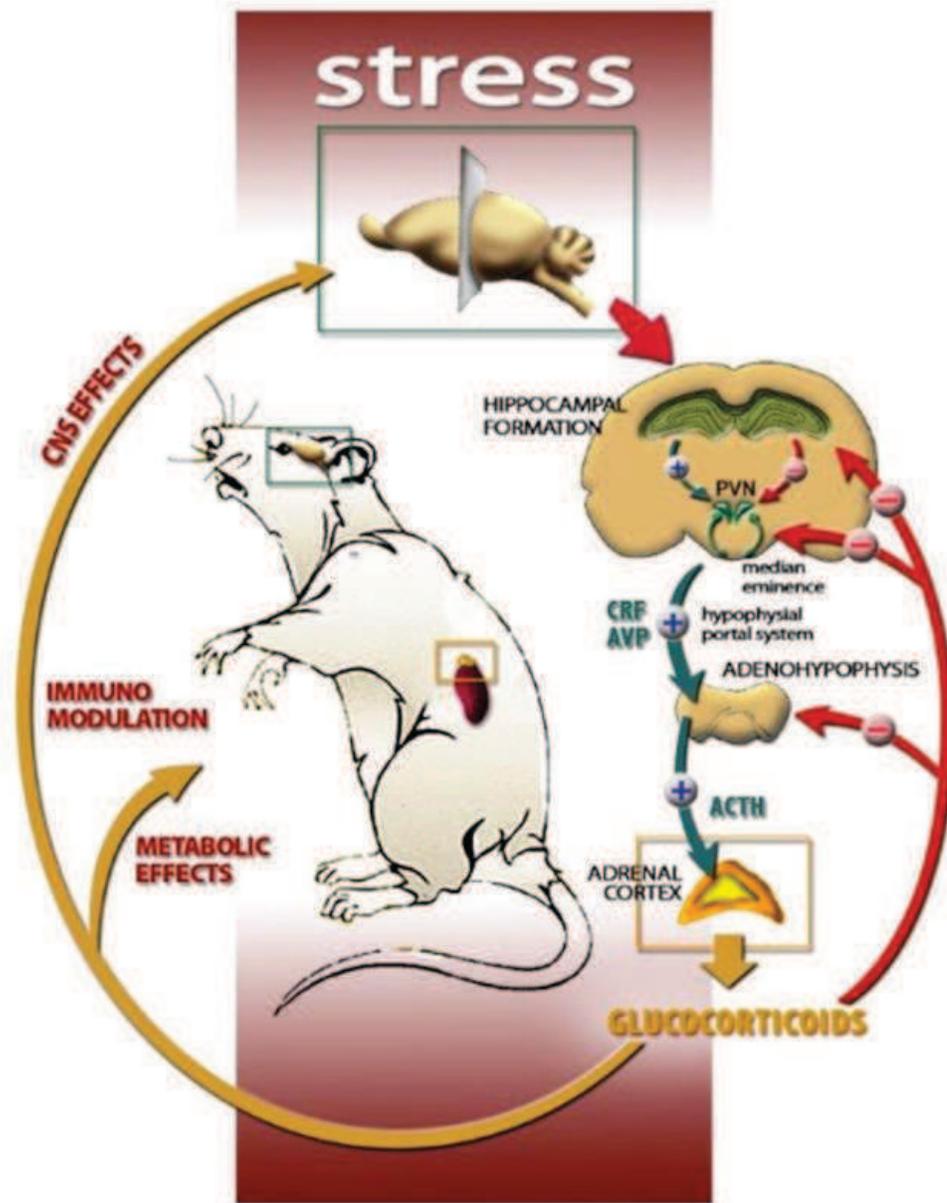


Figura 1: Esquema geral do funcionamento do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal. Abreviaturas: SNC: sistema nervoso central; PVN: núcleo paraventricular do hipotálamo; CRF: fator liberador de corticotropina; AVP: arginina-vasopresina; ACTH: hormônio adrenocorticotrópico (Adaptado da Tese: Marquez et al., 2006).

1.2.1- O Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (PVN)

O PVN se divide em diferentes subnúcleos (Fig. 2), mas em função do tamanho dos neurônios predominantes, se distinguem em duas grandes regiões já mencionadas: a região magnocelular (mPVN) e a região parvocelular (mpPVN). A região magnocelular está formada por neurônios de grande tamanho que enviam seus axônios à neurohipófise e sintetizam principalmente AVP e oxitocina (OX). A região parvocelular está populada por neurônios pequenos e se divide em 5 zonas: (i) periventricular; (ii) parvocelular anterior; (iii) parvocelular medial (subdividida em parte dorsal e ventral); (iv) parvocelular dorsal (dorsal cap); e (v) submagnocelular. Os neurônios localizados nas divisões periventricular e medial dorsal projetam-se em direção à EM, que se conecta com a adenohipófise via sistema porta-hipofisário. A região parvocelular medial dorsal (mpdPVN) é de grande interesse já que contém a maioria dos neurônios que sintetizam CRF. Estes neurônios de CRF frequentemente se colocalizam com outros neuropeptídeos, dentre eles se destaca a AVP (Armstrong, 1995; Engelmann et al., 2004), que exerce um efeito sinérgico positivo com o CRF na liberação do ACTH. A região periventricular contém neurônios que sintetizam somatostatina (um hormônio inibidor do hormônio de crescimento) e dopamina. A região medial dorsal contém neurônios que sintetizam o hormônio liberador de tirotrópina. As regiões dorsal cap e submagnocelular do mpPVN contém neurônios que se projetam em direção ao tronco encefálico e à medula espinhal através dos núcleos pré-ganglionares, estando implicadas na regulação do SNA (Armstrong, 1995).

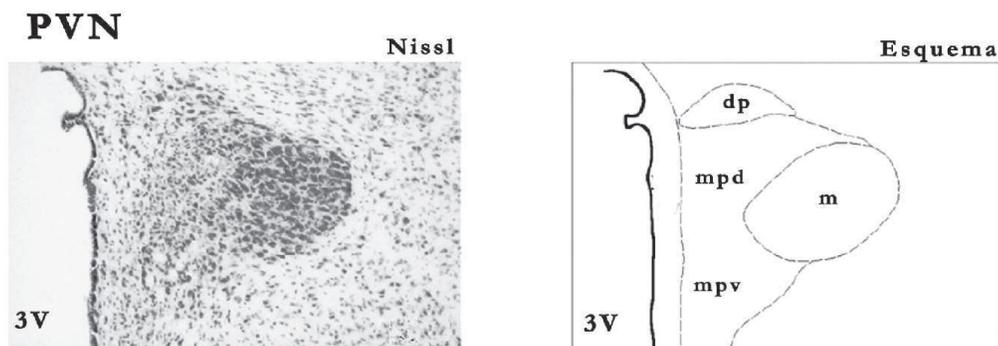


Figura 2: Organização do PVN. 3V: terceiro ventrículo. Esquerda: coloração de Nissl. Direita: representação das seguintes subdivisões: m: região magnocelular; dp: região parvocelular dorsal; mpd: subdivisão parvocelular medial dorsal; e mpv: subdivisão parvocelular medial ventral. Modificado de Viau e Sawchenko (2002).

1.2.2 Projeções diretas ao PVN

Os sistemas catecolaminérgicos do tronco cerebral têm um papel predominante na ativação do eixo HPA por estímulos sistêmicos. O PVN recebe aferências de noradrenalina e de adrenalina da região A2/C3 do núcleo do trato solitário (NTS), que inervam o mpPVN (Figura 3). Em troca, os neurônios magnocelulares e parvocelulares pré-autonômicos do PVN são inervados pelos grupos A1/C1 do bulbo ventrolateral (Cunningham et al., 1990). A natureza excitatória dessas projeções são confirmadas por estudos que demonstram uma redução da resposta do eixo HPA frente a estímulos do tipo sistêmico após lesões de projeções bulbares que se direcionam em sentido ao PVN e, também por lesões seletivas de vias catecolaminérgicas através de 6-hidroxidopamina (Gaillet et al., 1991; Li et al., 1996; Ritter et al., 2003). Por exemplo, lesões seletivas de neurônios noradrenérgicos e adrenérgicos que inervam o PVN através da micro-injeção de saporina conjugada com anticorpo monoclonal contra a dopamina β -hidroxilase (uma enzima presente somente em neurônios catecolaminérgicos), diminuem a liberação de corticosterona após privação de glicose, um modelo de estímulo estressante do tipo sistêmico (Ritter et al., 2003). Também frente à privação de glicose, esta lesão diminui a indução do mRNA de c-fos no PVN, assim como o mRNA de CRF hetero-nuclear (hnCRF), um fragmento intrônico de mensageiro de CRF que é induzido rapidamente e tem uma vida média muito curta (o hnRNA é uma ferramenta muito útil para detectar a expressão do gen de CRF induzida por diferentes estímulos, pois o mensageiro maduro se encontra em grandes quantidades em condições basais). Ao contrário, a lesão não afeta a expressão basal do mRNA de CRF nem a liberação de corticosterona durante o ciclo circadiano ou em resposta a um estímulo estressante do tipo predominantemente emocional, como a natação forçada. O NTS é um lugar crítico de integração do estresse sistêmico, tendo sido observado ativação de c-fos após exposição à dor visceral, inflamação ou infecção, hipovolemia, hipoxia e hipotensão (revisão em Herman et al., 2003). O NTS também é ativado por outros estímulos de natureza mista, como a restrição de movimentos, a natação forçada ou a imobilização (Cullinan et al., 1995; revisão em Sawchenko et al., 2000), o que sugere que ele também participa da integração de estímulos emocionais, mesmo tendo um papel secundário no que se refere à ativação do eixo HPA. Por outro lado, existe um escasso número de projeções serotoninérgicas diretas ao PVN, em sua maioria procedentes do Rafe dorsal (DR) e medial (MnR) (Sawchenko et al., 1983). O PVN também recebe informação de outras áreas mesencefálicas não-serotoninérgicas, como o núcleo parabraquial e a

substância cinzenta periaquedutal (PAG), ambas associadas a funções autonômicas (Saper, 1995). A informação sobre o equilíbrio hídrico e iônico chega diretamente ao PVN através do sistema formado pelo órgão subfornical (SFO), o núcleo preóptico medial (MePO) e o órgão vascular lâmina terminal (OVLT) (Johnson et al., 1996; McKinley et al., 1999). Estas regiões estão implicadas no controle cardiovascular e na homeostase dos fluidos corporais e inervam tanto neurônios magnocelulares como parvocelulares, controlando a secreção de hormônios como o AVP.

A maioria das projeções telencefálicas diretas ao PVN procedem do núcleo do leito da estria terminal (BST), que contém principalmente neurônios GABAérgicos (Cullinan et al., 1993), que são, portanto, inibitórios. No entanto, os efeitos do BST sobre a atividade do eixo HPA parecem depender da área cerebral estimulada (Herman et al., 1994; Choi et al., 2007). A presença de neurônios de CRF em algumas subdivisões do BST (Champagne et al., 1998; Dabrowska et al., 2011) poderiam ter um papel relevante na regulação do eixo HPA.

Numerosas regiões hipotalâmicas, como o núcleo dorsomedial do hipotálamo (DM) e a área pre-óptica medial (PO) projetam-se ao PVN (Fig. 3), sendo a maioria destas projeções do tipo GABAérgico (Roland e Sawchenko, 1993), ainda que estes núcleos disponham também de populações glutamatérgicas (Ziegler et al., 2002). Desta forma, podem estar implicadas tanto na ativação quanto na inibição de neurônios parvocelulares do PVN, dependendo do estímulo e do tipo neuronal ativado. A PO pode atuar como intermediária nos efeitos que os esteroides gonadais exercem sobre o eixo HPA (revisão em Herman et al., 2003). A informação referente ao balanço energético pode transmitir-se diretamente ao PVN através do núcleo arqueado do hipotálamo (Arc) e do hipotálamo lateral (LH) (Figura 3). Sabe-se serem os neurônios do Arc sensíveis aos níveis circulantes de glicose, leptina e insulina (revisão em Woods et al., 1998). Finalmente, o PVN também é inervado por neurônios GABAérgicos procedentes da região peri-PVN (Boudaba et al., 1996), de modo que sua ativação pode traduzir-se em inibição do eixo HPA e sua inibição, em ativação do eixo HPA (Cole e Sawchenko, 2002).

Mesmo que não se conheça a procedência exata do CRF que atua no PVN, é necessário destacar a presença de neurônios de CRF em múltiplas subdivisões do BST (Ju et al., 1989), que poderiam ter um papel nesta regulação. As projeções de CRF que inervam o PVN podem proceder também de outras áreas hipotalâmicas (perifornical, núcleo hipotalâmico dorsal e área hipotalâmica dorsal), DR e o Bar (Champagne et al., 1998), sem destacar conexões axo-dendríticas entre neurônios de CRF dentro do PVN

(revisão em Lipovits et al., 1985). Por fim, algumas regiões do tálamo também se projetam diretamente ao PVN, como as regiões subparafascicular e intralaminar posterior, que estão implicadas na ativação do eixo HPA por estressores auditivos (Wagner et al., 1995; Cheung et al., 1998). Ainda que existam alguns dados que sugerem que a dopamina ativa o eixo HPA (Borowsky e Kuhn, 1992; 1993; Fuertes et al., 2000), não se sabe ainda se ela atua de forma direta ou indireta através de ações em centros e vias superiores.

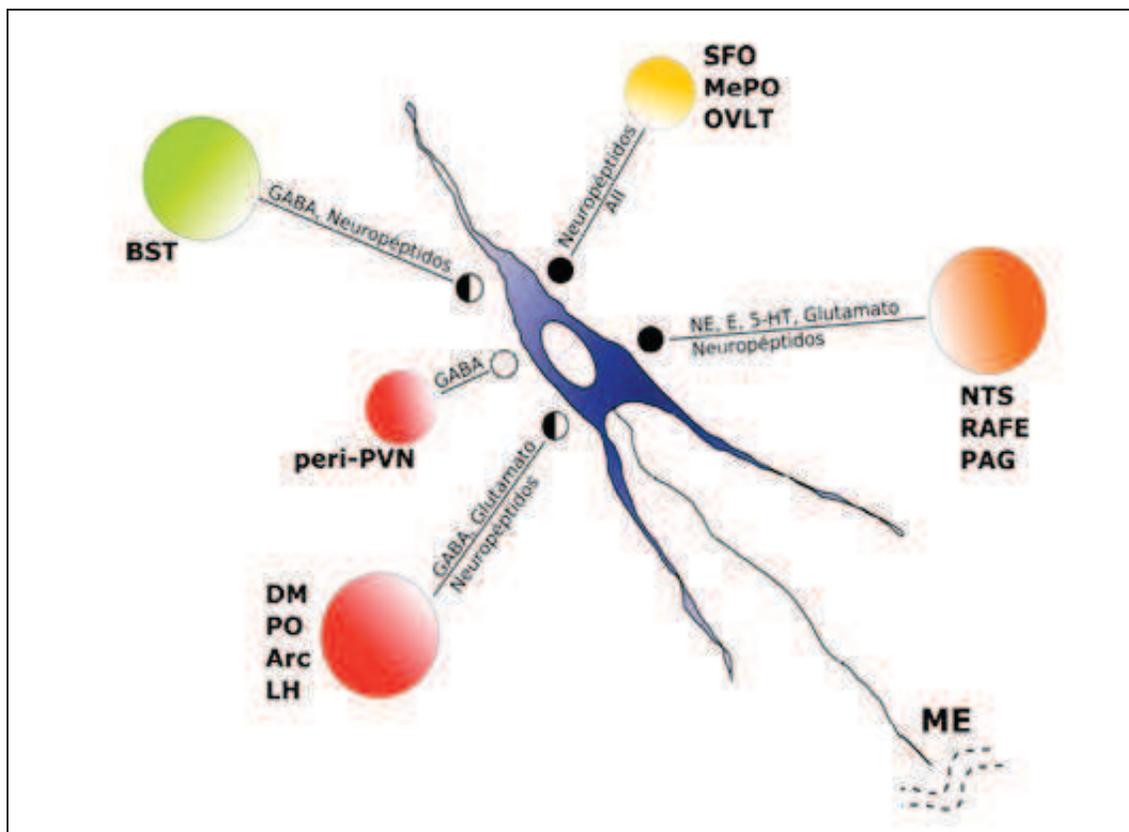


Figura 3: Principais projeções diretas aos neurônios parvocelulares do núcleo paraventricular do hipotálamo. Os circuitos negros indicam a natureza ativadora das projeções e os círculos brancos indicam a natureza inibidora das projeções. Abreviações: Arc: Núcleo arqueado do hipotálamo; BST: Núcleo do leito da estria terminal; DM: núcleo dorsomedial do hipotálamo; LH: Hipotálamo lateral; ME: Eminência média; MePO: Núcleo preóptico medial; NTS: Núcleo do trato solitário; OVLT: Orgão vascular da lámina terminal; PAG: Substância pariaquedutal cinzenta; peri-PVN: região peri-PVN; PO: Área preóptica medial; SFO: Orgão subfornical. (Adaptado de Herman et al., 2003).

1.2.3 Projeções indiretas ao PVN

Regiões com um papel crucial na resposta emocional, como PFC, HF, o septum, a amígdala e os núcleos da linha média do tálamo, são candidatos lógicos para modular o eixo HPA. No entanto, nenhuma destas estruturas projeta diretamente ao PVN e necessitam de neurônios intermediários para exercer sua influência sobre o eixo HPA (Fig. 4).

O córtex pré-frontal medial (mPFC) modula a atividade do eixo HPA em resposta a estressores do tipo emocional, como os ambientes novos, a exposição a um predador ou a interação social, com um papel basicamente inibidor (Diorio et al., 1993; Figueiredo et al., 2003; McDougall et al., 2004). Estudos mostram que lesões ou inativação do mPFC aumenta a produção de ACTH em resposta aos estressores emocionais, mas não ao éter (Diorio et al., 1993; Figueiredo et al., 2003; McDougall et al., 2004). Dados mais recentes sugerem que seria concretamente a região mais dorsal (prelímica - PrL) a que exerceria tal efeito inibidor tendo a mais ventral (infralímica - IF), um papel estimulador (Radley et al., 2006). A região PrL poderia inibir o PVN mediante projeções estimuladoras à parte dorso-medial fusiforme do núcleo do BST cujas projeções GABAérgicas inibiriam o PVN (Radley et al., 2009).

Os neurônios do septum lateral (LS) também são ativados por estressores emocionais, mostrando uma menor ativação por estímulos do tipo sistêmico (revisão em Herman et al., 2003). A maioria destes neurônios são GABAérgicas (Risold e Swanson, 1997a) e projetam-se à região peri-PVN, ao hipocampo anterior, ao MePO e ao LH (Risold e Swanson, 1997b) (Fig. 4). O LS exerceria uma influência inibitória sobre estas áreas e ocuparia uma posição privilegiada para regular tanto a ativação como a inibição do PVN. De fato, os dados experimentais indicam que a lesão eletrolítica do LS prolonga a resposta da corticosterona ao estresse por imobilização e aumenta a sensibilidade aos estímulos de intensidade moderada (revisão em Herman et al., 2003). Trabalho recente demonstrou, através de lesão no LS com ácido ibotênico, um incremento da resposta do eixo HPA à natação forçada junto a uma maior indução de c-fos no PVN (Singewald et al., 2011). Foi proposto recentemente que a ativação do LS em resposta ao estresse poderia ser mediada também por projeções serotoninérgicas provenientes do núcleo da rafe (Singewald et al., 2011) e, através delas, seria exercido um efeito predominantemente inibidor sobre o eixo HPA.

Diferente do que ocorre com o LS e com o PFC, a amígdala parece ativar o eixo HPA (revisão em Herman et al., 2005). Na regulação do eixo HPA poderiam participar distintos subnúcleos da amígdala: central (CeA), medial (MeA) e basolateral (BLA). Mesmo que todos estejam implicados na ativação do eixo HPA, parece que cada um deles responde de forma diferencial aos estressores. O CeA estaria relacionado a respostas do tipo sistémico (Herman e Cullinan, 1997; Sawchenko et al., 2000; Dayas et al., 2001) e apresentaria conexões com estruturas do tronco que se projectam diretamente ao PVN, como o NTS e o núcleo parabraquial (Alheid, 2003; McDonald, 2003) (Fig. 4). Também existem provas de sua conexão com o BST, onde mediante projeções do tipo GABAérgico, ativaria por desinibição o eixo HPA ao inibir os neurónios GABAérgicos do BST que se projetam ao PVN (Herman et al., 2003). Por outro lado, a MeA estaria implicada na integração dos estímulos do tipo emocional (Dayas et al., 1999; 2001; Dayas e Day, 2002; Masini et al., 2009; Solomon et al., 2010), com uma extensa rede de conexões com áreas de projeção direta ao PVN como o BST, MePO, PO, hipotálamo anterior e a zona peri-PVN (Alheid, 2003; McDonald, 2003) (Fig. 4). As projeções em direção a estas áreas são do tipo GABAérgico, de tal modo que a ativação da MeA daria lugar também a uma ativação do PVN por desinibição, como ocorre com a CeA, mesmo que por circuitos distintos.

Estudos recentes têm relacionado diversos núcleos do tálamo com a regulação do eixo HPA. Em varias regiões da linha média do tálamo se observa uma forte indução de c-fos em resposta a estímulos estressores do tipo emocional (Cullinan et al., 1995; Bubser e Deutch, 1999; Emmert e Herman, 1999). Dentre estas regiões cabe destacar o núcleo paraventricular do tálamo (PVT), que pode ter um papel importante na integração da resposta do eixo HPA a estímulos repetidos. A lesão da parte posterior deste núcleo atenua a supressão da resposta ao estresse induzida por uma injeção de dexametasona (glicocorticóide sintético com afinidade para os receptores de glicocorticoides GR) em animais estressados crónicamente (Jaferi et al., 2003), sugerindo que poderia participar da retroinibição induzida pelos glicocorticoides, especialmente após a exposição a estresse repetido. O PVT recebe numerosas projeções de áreas sensíveis ao estresse, como o subiculum ventral, o PFC, o BST, NTS, a Rafe, o núcleo parabraquial e o locus coeruleus (LC) e inerva regiões como o PFC, CeA e BLA, capazes de modular a atividade do eixo HPA (Herman et al., 2003).

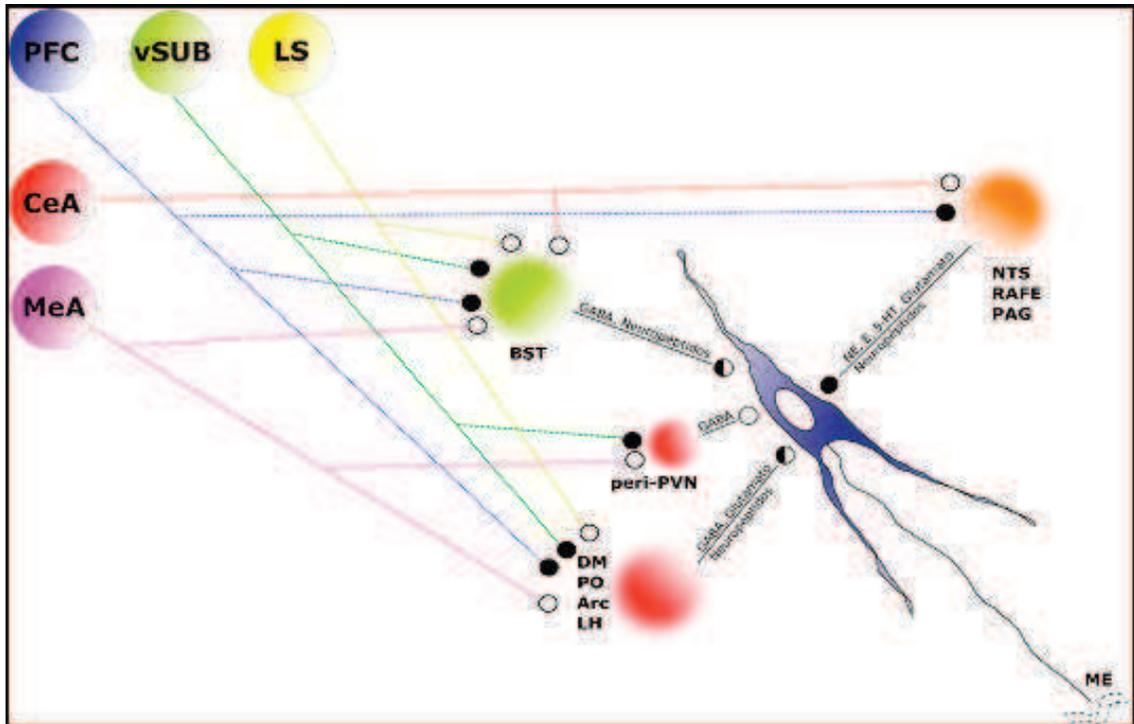


Figura 4: Principais projeções indiretas para os neurônios parvocelulares do núcleo paraventricular do hipotálamo. Os círculos pretos indicam a natureza ativadora das projeções, os círculos brancos indicam a natureza inibidora das projeções. Abreviaturas: Arc: Núcleo arqueado do hipotálamo; BST: Núcleo do leito da estria terminal; CeA: Amígdala, subdivisão central; DM: núcleo dorsomedial do hipotálamo; LH: Hipotálamo lateral; LS: Septum lateral; ME: Eminência média; MeA: Amígdala, subdivisão medial; MePO: Núcleo preóptico medial; NTS: Núcleo do trato solitário; OVLT: Órgão vasculoso da lâmina terminal; PAG: Substância gris periaquedutal; peri-PVN: região peri-PVN; PFC: córtex prefrontal; PO: Área preóptica medial do hipotálamo; SFO: Órgão subfornical; vSUB: subiculum ventral (Adaptado de Herman et al., 2003).

1.2.4 Os hormônios do eixo HPA

1.2.4.1 Fatores Liberadores de ACTH: CRF

Considera-se que a liberação de ACTH em resposta ao estresse é dependente da ação coordenada de um coquetel de fatores distintos cuja composição particular varia em função do estressor (Plotsky, 1991; Romero e Sapolsky, 1996). Entre estes fatores se

destacam a OX, a angiotensina II e as catecolaminas. No entanto, as principais moléculas implicadas na regulação da liberação de ACTH são o CRF e a AVP.

O CRF é um peptídeo de 41 aminoácidos sintetizado principalmente na região medial dorsal do PVN em resposta a uma variedade de estressores, sendo o principal fator estimulador da síntese e liberação de ACTH na adenohipófise. As ações do CRF estão mediadas por dois tipos de receptores transmembrana acoplados à proteína G: os CRFR1 e CRFR2 (com dois subtipos: CRFR1 α e CRFR2 β) diferencialmente distribuídos no SNC. Ambos tipos de receptores estão acoplados à adenilato-ciclase, provocando um aumento da adenosina monofosfato cíclico (AMPc) intracelular e, a consequente ativação da proteína quinase dependente de AMPc (PKA). Entre a família de peptídeos que se unem aos receptores de CRF se incluem as urocortinas (UCN) I, II e III. O CRF apresenta maior afinidade pelos receptores CRFR1, que possuem uma ampla distribuição no SNC. A união do CRF com seus receptores CRFR1 na adenohipófise conduz, mediante a subsequente cascata de fosforilação de proteínas, à transcrição do gene da proopiomelanocortina (POMC, peptídeo precursor do ACTH) e à liberação do ACTH na circulação. Enquanto que os receptores CRFR1 estão relacionados com a fase aguda da resposta ao estresse, com um papel ativador, os receptores CRFR2 parecem implicados na redução do eixo HPA durante a fase de recuperação pós-estresse (Korosi e Baram, 2008). Os receptores CRFR1 estão relacionados aos processos de atenção, aprendizagem, memória e processamentos das emoções, enquanto que os CRFR2 se relacionam com funções básicas, como a ingestão de alimentos, reprodução e comportamento defensivo (revisão em Smagin e Dunn, 2000). As ações do CRF, portanto, não se restringem à sua ação hipofisária, já que participam de uma série de outras funções no organismo, tanto autonômicas como comportamentais.

O sistema CRFérgico se estende para além dos neurônios parvocelulares do PVN. Foi observado na presença de neurônios reativos para o CRF em distintas áreas do SNC além do mpPVN, como no córtex, a HF, o BST, a CeA e o núcleo de Barrington (Fellman et al., 1982; Merchenthaler et al., 1982; Olschowka et al., 1982; Swanson et al., 1983; Sakanaka et al., 1987; Valentino et al., 1992).

1.2.4.2 Hormônios Periféricos: ACTH e Corticosterona

Como já foi dito, o CRF estimula a síntese e liberação de ACTH, um peptídeo de 30 aminoácidos derivado de outro maior, a POMC. Uma vez na circulação, o ACTH atua sobre as células da zona fasciculada do córtex da adrenal, estimulando a síntese e a secreção de glicocorticoides. Esta ação se torna efetiva através de receptores de membrana MC2-R (receptor de melanocortinas tipo 2) (Adan e Gispen, 2000). A união do ACTH com seu receptor produz, via adenilato ciclase, um aumento da concentração intracelular de AMPc e a consequente ativação da PKA. De forma aguda, esta via conduz à síntese e liberação de glicocorticoides, mediante a ativação de enzimas que participam do transporte do colesterol mitocondrial e da esteroidogênese. Por outro lado, o ACTH, via PKA, exerce um efeito trófico na glândula adrenal, dando lugar a modificadores transcricionais nas células das adrenais que conduzem a mudanças mais complexas e duradouras (Sewer e Waterman, 2003).

A ativação do eixo HPA resulta em uma liberação rápida de ACTH, alcançando o máximo de liberação aos 10 min (Armario, 2000). Mesmo que o ACTH seja o principal fator regulador da secreção de glicocorticóides, está bem estabelecido que existem outros mecanismos com papel modulador neste processo, dentre os quais vale destacar a inervação nervosa da adrenal através do simpático (Vinson et al., 1994).

Os corticóides são hormônios esteroidais produzidos no córtex da glândula adrenal. Existem dois tipos muito bem definidos, os glicocorticoides e os mineralocorticoides. Em mamíferos existem dois tipos de glicocorticoides: o cortisol, presente na maioria dos mamíferos (incluindo-se aqui os humanos) e a corticosterona, presente em ratos e outros roedores (ainda que também se encontre em humanos em menor proporção que o cortisol). As funções de ambos os compostos são essencialmente similares. Os glicocorticoides recebem seu nome devido a uma de suas principais funções metabólicas: seu papel favorecedor na formação de glicose a partir de aminoácidos (gliconeogênese). No entanto, estão também bastante implicados na regulação da função imune (Sapolsky et al., 2000). Por outro lado, os mineralocorticoides, como a aldosterona, promovem a reabsorção de sódio nas células do epitélio tubular dos rins, glândulas salivares e intestino. Tradicionalmente, a síntese de glicocorticoides e de mineralocorticoides foi associada unicamente à glândula adrenal. Estudos mais recentes indicam a existência de uma síntese de glicocorticoides em outros órgãos, como os linfóides primários, a pele e o intestino, e de mineralocorticoides no cérebro e no coração (revisão em Taves et al., 2011).

Considerando-se que estes locais de síntese são alvos de exposição a antígenos, os glicocorticoides poderiam atuar de forma local amortecendo a resposta linfocitária e inflamatória e minimizando o dano tecidual (ver revisão em Sapolsky et al., 2000; Dhabhar, 2009).

Como foi dito anteriormente, os glicocorticoides exercem muitas funções no organismo e estão implicados na maioria das consequências negativas associadas ao estresse. No entanto, níveis apropriados de glicocorticoides são importantes para a manutenção da homeostase. As funções exercidas pelos glicocorticoides podem ser divididas em duas categorias principais: as moduladoras e as reparatórias (Sapolsky et al., 2000). As ações moduladoras são aquelas que alteram a resposta do organismo frente a um entressor e podem ser divididas em 3 categorias: permissivas, supressoras e estimuladoras. Pelas ações permissivas se compreende aquelas que facilitam a ação de outros sistemas que participam na fase inicial de resposta ao estresse. Essas ações requerem níveis mínimos de glicocorticoides prévios à situação e preparam mecanismos de defesa do organismo para enfrentar o estresse. Nesta categoria se inclui o efeito facilitador da resposta cardiovascular, que é determinada, sobretudo por outros fatores (ex: ativação simpática). As ações supressoras são uma consequência da liberação de glicocorticoides durante o estresse, tendo início após 1h ou mais da aplicação da situação estressante; têm o objetivo de prevenir as consequências negativas de uma resposta excessiva. Mediante estas ações, os glicocorticoides inibem o sistema imune, a resposta inflamatória e a atividade do próprio eixo HPA através de mecanismos de retroinibição. As ações estimuladoras, que também se iniciam 1h ou mais após a indução do estresse, têm como função potencializar os efeitos de outros hormônios liberados durante o estresse (ex: potenciação da lipólise e gliconeogênese).

Os efeitos dos glicocorticóides podem ser genômicos ou não-genômicos. Considera-se que os efeitos rápidos dos glicocorticoides são incompatíveis com o tempo requerido para que ocorra a transcrição gênica (revisão em Haller et al., 2008). Estes mecanismos não-genômicos seriam mediados, provavelmente, por receptores de membrana ainda não caracterizados (revisão em Makara e Haller, 2001; Haller et al., 2008). Os efeitos não genômicos dos glicocorticoides parecem ser relevantes para as respostas rápidas do SNC mediadas por diferentes áreas como o hipotálamo, a amígdala, o hipocampo e o PFC (ver revisão em Groeneweg et al., 2011). Por exemplo, efeitos mediados pelos receptores GR de membrana estão associados com o aprendizado e a memória, uma vez que a

administração de corticosterona diretamente no córtex insular facilitou a memória em um teste de reconhecimento de objetos (Rooszendaal et al., 2010).

São conhecidos dois receptores intracelulares implicados nas mudanças gênicas mediadas por glicocorticoides. Os do tipo I (ou mineralocorticoides – MR), que tem alta afinidade pela corticosterona, e os do tipo II (ou glicocorticoides, GR) que têm maior afinidade pelo cortisol ou por glicocorticoides sintéticos, como a dexametasona (Reul e de Kloet, 1985). Ambos os tipos apresentam um domínio de união a esteroides e outro de união ao DNA e se encontram associados a outras proteínas. Os receptores MR e GR se diferenciam não apenas por sua afinidade a alguns ligantes, mas também por sua distribuição periférica e central (ver revisão em de Kloet et al., 1990). Enquanto que os MR estão localizados em zonas muito específicas do SNC e especialmente no hipocampo, os GR, por sua vez, têm uma distribuição mais ampla, que incluem zonas mais importantes em relação à retroalimentação do eixo HPA: o PVN, a adenohipófise e outras regiões extrahipotálamicas, como mPFC e a HF (ver revisão em Armario, 2006b).

Um fato importante observado em roedores é o de que os MR estão praticamente saturados pelos níveis basais de corticosterona da fase diurna, quando estão menos ativos, enquanto que os GR vão sendo ocupados progressivamente pela corticosterona, fato característico da fase ativa dos animais (período noturno) ou das situações de estresse (de Kloet et al., 1998). Por este motivo, se considera que os MR exercem uma inibição tônica do eixo HPA enquanto que os GR seriam mais importantes em relação ao bloqueio da resposta do eixo HPA em situações de estresse.

Como já comentado, uma das funções mais relevantes dos glicocorticoides em seu papel regulador do eixo HPA é o mecanismo de retroinibição. Em função de sua velocidade de ação e do tipo de receptor envolvido, estes mecanismos se classificam em 3 tipos: os rápidos, os intermediários e os lentos (Keller-Wood e Dallman, 1984). A retroinibição rápida ocorre de forma imediata, atuando apenas quando o nível de glicocorticoides no plasma está se elevando. A velocidade deste mecanismo envolveria receptores distintos aos genômicos (ainda não foram caracterizados), ainda que os endocanabinóides parecem ter um papel importante como supressores dos sinais glutamatérgicos estimuladores que alcançam o mpPVN (Di et al., 2003; Evanson et al., 2010). Tanto os mecanismos intermediários como os lentos envolvem processos de transcrição mediados pelo MR e GR. Os intermédios aparecem por volta de 30-60 min depois do declínio da resposta ao estresse, enquanto que os lentos necessitam de 60 min para manifestarem-se. No entanto,

os efeitos destes últimos podem durar muitas horas e incluem o bloqueio da transcrição dos genes de CRF, AVP e POMC.

1.2.5 Dinâmica do eixo HPA em resposta ao estresse

A exposição a estressores causa uma rápida liberação de ACTH que é observada claramente a partir dos 5 min após o início da exposição. Se a exposição ao estressor continua, o máximo de liberação é observado aos 15 minutos e se mantém durante 30-60 minutos (García et al., 2000). A partir deste momento, observa-se uma diminuição progressiva nos níveis de ACTH (Rivier e Vale, 1987; García et al., 2000) que pode acabar em patamares próximos ao basal apesar da persistência do estímulo (10-24h) (Kant et al., 1987; Hauger et al., 1988; Armario et al., 1990a).

Esta diminuição progressiva foi descrita inclusive durante exposições a estressores de intensidade elevada. Por tanto, a avaliação dos níveis plasmáticos de ACTH após a primeira hora de exposição ao estresse, não seria apropriada para avaliar a sua intensidade, já que poderia dar lugar a interpretações equivocadas. A razão pela qual se produz esta diminuição progressiva não está totalmente clara, mas parece ser devida, em parte, à retroinibição exercida pelos glicocorticoides e também à incapacidade de células corticotróficas de manter uma elevada liberação de ACTH durante horas (Rivier e Vale, 1987; Martí et al., 1999).

A dinâmica de liberação dos níveis de corticosterona plasmática é muito diferente da de ACTH. Em primeiro lugar, ainda que a exposição ao estressor seja breve (poucos minutos), o momento apropriado para a determinação da liberação de corticosterona será aos 15-20 min do início da exposição, devido ao tempo requerido pelo córtex da adrenal para alcançar o máximo de síntese de glicocorticoides. No entanto, se a exposição continua por 15 min ou mais, o máximo de corticosterona se alcança por volta dos 30-60 min após o início da exposição a estímulos de intensidade relativamente elevada (Levin et al., 1989; Dhabhar et al., 1997; Dal-Zotto et al., 2004). Em segundo lugar, a capacidade da adrenal de liberar glicocorticoides se satura com níveis relativamente baixos de ACTH (Keller-Wood et al., 1983). Em terceiro lugar, o declínio progressivo que se observa nos níveis de ACTH quando a exposição ao estresse se mantém, não se reflete nos níveis de corticosterona, como já foi comentado anteriormente. Por isso, observaram-se frequentemente níveis elevados de corticosterona apesar de níveis de ACTH quase basais (Armario et al., 2012)

1.3- Uso de c-fos como Marcador da Ativação Neuronal

Atualmente está bem estabelecido que o processamento da informação referente a um estímulo particular é iniciado por vias específicas do SNC. Uma das técnicas que nos permite analisar quais os neurônios estão sendo ativados é a valoração da indução de genes de expressão precoce mediante técnicas como imunohistoquímica ou hibridização *in situ*. A estimulação dos neurônios pode iniciar dois mecanismos diferentes através dos quais a informação se processa e se transmite: a atividade eletrofisiológica e a cascata de segundos mensageiros. Mediante os potenciais de ação, a informação sobre determinado estímulo é transmitida e processada, enquanto que os mensageiros intracelulares produzem fatores de transcrição que iniciam e/ou reprimem a transcrição de outros genes, alterando-se a resposta de neurônios a estímulos posteriores. Dentre os muitos genes que se expressam nos neurônios, existe um grupo denominado “gene de expressão precoce” (IEG’s) devido à sua rápida indução. Um dos IEGs melhor caracterizado no SNC é o proto-oncogene c-fos (Sheng e Greenberg, 1990), que devido as suas características, resulta em uma ferramenta muito valiosa para o estudo da ativação do SNC frente a diferentes estímulos. O gene de c-fos tem um promotor completo e sensível à ação de diferentes cascatas de segundos mensageiros que terminam convergindo e regulando a sua expressão (Ginty et al., 1994). Muitos fatores podem induzir a expressão de c-fos através de diferentes mensageiros intracelulares, incluindo-se fatores neurotróficos, neurotransmissores, despolarização e incrementos de Ca²⁺ intracelulares (revisão em Herrera e Robertson, 1996; Herdegen e Leah, 1998). Uma vez formada, a proteína c-fos dimeriza com proteínas da família c-jun, formando o complexo de transcrição AP-1 (proteína ativadora 1), o qual participa da regulação e da expressão de numerosos genes que possuem um sítio de união AP-1 em seu promotor (revisão em Herdegen e Leah, 1998). A atividade de c-fos é regulada mediante a degradação de seu mRNA, cuja vida média se situa entre os 10-15 min (Shyu et al., 1989; Zangenehpour e Chaudhuri, 2002) e seu pico máximo de expressão aparece por volta dos 30 min desde o início do estímulo agudo (Cullinan et al., 1995; Armario, 2006a). A vida média da proteína é muito curta, situando-se entre os 90 e 120 min, com seu desaparecimento gradual do núcleo neuronal entre as 4 e 6 horas após uma estimulação (revisão em Jariel-Encontre et al., 1997; Kovács, 1998). A expressão de c-fos é considerada uma boa ferramenta de cartografia anatômica funcional para identificar células e circuitos ativados em resposta a diferentes tipos de estímulos (revisão em Hoffman e Lyo, 2002). A expressão de c-fos apresenta duas

características importantes para este propósito: sua fraca expressão em condições basais e sua rápida indução por uma grande variedade de estímulos (revisão em Armario, 2006a). No entanto, c-fos não pode ser considerado um marcador universal da ativação neuronal e não se deve comparar sua expressão com o aumento da atividade eletrofisiológica do neurônio. Embora ambos os fenômenos possam ser unidos, também podem dissociar-se, de forma tal que pode aparecer despolarização sem expressão de c-fos (Luckman et al., 1994). Além disso, a despolarização *per se* não pode induzir a expressão de c-fos e necessita da participação das cascatas de segundos mensageiros (Robertson et al., 1995). São as modificações nas vias de sinalização intracelular que induzem a expressão de c-fos e não a despolarização *per se*. Existem também padrões de ativação neuronal tônica que não parecem estar acompanhados da indução de c-fos. Por outro lado, o fato de que um neurônio se ative e expresse c-fos não indica necessariamente que o neurônio tenha um papel relevante no processamento do estímulo, pois ele pode ativar-se por mecanismos gerais de excitação.

1.4 O sistema hematopoético

O sistema hematopoético é caracterizado pela contínua produção de células que circulam através dos vasos sanguíneos e linfáticos, sendo fundamental na manutenção do organismo desde a vida fetal até a senescência. Esta produção é dependente da proliferação e diferenciação das células progenitoras nos tecidos hematopoéticos. Nestes, as diversas linhagens de células são produzidas e cada uma delas tem sua própria dinâmica. Diante de estímulos apropriados, como nas infecções ou hemorragias, são induzidas alterações na produção celular para atender à demanda específica ou global imposta ao organismo. Quando estes estímulos cessam, observa-se um efeito corretivo, e as diversas populações celulares retornam às proporções que são estabelecidas pela homeostase (Lee et al., 1993).

Na vida embrionária e fetal a hematopoese ocorre em diferentes sítios do organismo. Na vida adulta, a principal fonte de células progenitoras é a medula óssea; nesse ambiente ocorre a maior parte da produção, que pode ser controlada em seus vários níveis. As etapas que abrangem a proliferação de uma célula progenitora até a diferenciação em uma célula madura, são dependentes de controles intrínsecos e extrínsecos ao ambiente medular. As células do estroma, a matrix extracelular, as citocinas e até mesmo as células

produzidas, desempenham importante papel na seqüência de eventos que se definem desde a produção até a saída das células deste ambiente.

Células tronco-hematopoéticas (HSC) são células raras que têm a capacidade de originar toda linhagem de células sanguíneas. São definidas operacionalmente como células capazes de reconstituir completamente a medula óssea após ablação. Da mesma forma, elas possuem capacidade de renovação ilimitada para dar origem a outras células progenitoras (Domen e Weissman, 1999). São denominadas células LSK por serem negativas para o marcador de linhagem Lin⁻ e positivas para Sca-1 e c-kit (Spangrude et al., 1988). C-kit, um receptor para células tronco, possui um padrão de expressão mais amplo que Sca-1, marcando também progenitores hematopoéticos (HP, Ckit⁺Sca1⁻) (Lyman e Jacobsen, 1998). Estas células têm a capacidade de auto-renovação limitada e potencial de diferenciação restrito a duas ou mais linhagens. Marcadores de superfície específicos, como o Gr1⁺ e Mac1⁺ (Lin⁺) caracterizam uma linhagem de células mieloides comprometidas (Larsson e Karlsson, 2005).

1.4.1 Células tronco-hematopoéticas (HSC)

Tem sido atribuído a essas células a capacidade de manutenção da hematopoese durante toda a vida. Essa propriedade é dependente da ilimitada auto-renovação e, ao mesmo tempo, da capacidade de reconstituição dos demais progenitores.

As HSC são raramente encontradas na circulação sanguínea. Na medula óssea, onde se localizam com maior freqüência, apresentam-se numa proporção de 1 para cada 10.000 células, e têm uma taxa de proliferação muito baixa, conforme observações da biologia dessas células em animais irradiados ou tratados com agentes quimioterápicos (Boggs et al., 1982; Visser e vanBekkun, 1990; Bradford et al., 1997). O isolamento desta população envolve o uso de métodos de seleção que eliminam as células diferenciadas e os demais progenitores. Como já comentado, as HSC estão presentes entre as células que expressam os marcadores de superfície celular: Sca-1 e Thy-1.1 ou o receptor c-Kit e não expressam alguns antígenos encontrados em células diferenciadas (CD4, CD8, CD3, CD5, B-220, Mac-1 ou Gr-1), por isso são consideradas Lin (Orlic et al., 1993; Yamamoto et al., 1996)

Os ensaios *in vivo* que buscam evidenciar as HSC, utilizam a transferência de células progenitoras para animais previamente irradiados ou geneticamente modificados. A presença das HSC entre as células é confirmada pela manutenção da hematopoese por

um período maior que seis meses nos animais recipientes. A transfusão de somente 30 células Sca1⁺Thy1.1^{low}Lin⁻ em camundongos irradiados permite a reconstituição de todas as linhagens do sistema hematopoético. Eficiência de reconstituição comparável com esta foi também obtida com transfusão de células com alta expressão para o receptor c-Kit e negativa para os marcadores de células diferenciadas (Orlic et al., 1993).

Os modelos *in vitro* utilizados para revelar as HSC geralmente representam uma evidência indireta destes progenitores. Estes modelos envolvem um sistema de cultura de longa duração de células da medula óssea e são utilizados para estabelecer a frequência de HSC em uma suspensão de células obtidas de tecidos hematopoéticos (Dexter et al., 1977; Sutherland et al., 1989; Ploemacher et al., 1989; Lemieux et al., 1995). Nestes sistemas, as HSC formam colônias na superfície de células aderentes de medula óssea após quatro a cinco semanas de cultura. A frequência do aparecimento destas colônias correlaciona-se com as células da medula que têm capacidade de reconstituição da hematopoese completa, quando transfundidas em animais irradiados (Ploemacher, 1991).

1.4.2 Células progenitoras hematopoéticas multipotentes

As células progenitoras multipotentes, ou progenitores hematopoéticos, HP, são provenientes da diferenciação das HSC. As tentativas de isolamento das HSC produziram parte dos métodos que hoje são utilizados para evidenciar estes progenitores.

Inicialmente o ensaio considerado para evidenciar as HSC era a determinação de células formadoras de colônias no baço de camundongos (Colony forming Units – Spleen, CFU-S) (Till e McCulloch, 1961). Este método consiste na transferência de células do tecido hematopoético para animais previamente irradiados. As células progenitoras que colonizam o baço do animal inoculado formam colônias, que são quantificadas no 12^o dia após a inoculação. Durante muitos anos este ensaio foi utilizado para o estudo de HSC.

Os ensaios clonogênicos *in vitro* que permitem o isolamento de progenitores, os quais formam colônias de células mielóides e eritróides (colony forming units-mix – CFU-mix) (Johnson e Metcalf, 1977) ou constituídas por granulócitos, eritrócitos, megacariócitos e macrófagos (Colony forming units – Granulocyte, Eritrocyte, Magacariocyte and Macrophage – CFU-GEMM), as colônias constituídas por células blásticas (Colony Forming Units – blast –CFU-blast) (Nakahata e Ogawa, 1982), ou as colônias de progenitores com alta taxa de proliferação (High Proliferative Potential – Colony Forming Units – HPP-CFC) (McNiece et al., 1986) revelam vários níveis de restrição para a produção de linhagens.

Ensaios de subclonagens destes progenitores mostram que eles possuem limitada capacidade de auto-renovação (Moore, 1991).

1.4.3 Células progenitoras hematopoéticas linhagem-específicas

A produção de células sanguíneas maduras e linhagem-específicas, mostra a ocorrência de um fenômeno altamente regulado, abrangendo sucessivos estágios da diferenciação, durante a proliferação das células progenitoras multipotentes que termina com a produção de progenitores restritos para cada linhagem. Vêm sendo utilizados no estudo desses progenitores os estágios clonogênicos realizados pela imobilização dos progenitores em gel de ágar ou multicelulose e por diluição limitante em cultura líquida (Bradley e Metcalf, 1966; Gallini et al., 1989, Souza-Queiroz et al., 2004 e 2008, Queiroz et al., 2008, Ramos et al., 2010). Nestes sistemas, as células progenitoras isoladas proliferam e se diferenciam na presença de fatores de crescimento hematopoéticos, formando colônias constituídas por células de uma única linhagem. O número de células que cada progenitor produz é relativo ao grau de diferenciação em que se encontra entre os demais. Assim, quanto mais diferenciada for a célula progenitora, menor será o número de células totais produzidas. Cada célula progenitora pode gerar clones de até 10^5 células restritas à linhagem, que se diferenciam em células especializadas (Metcalf, 1989).

As células blásticas encontradas na medula óssea representam estágios finais da diferenciação dos progenitores linhagem-específicos. A partir de um número reduzido de divisões elas dão origem às células maduras (Willians et al., 1991).

1.4.4 O conceito da cascata de diferenciação dos progenitores

A grande heterogeneidade morfológica e funcional das células sanguíneas e a existência de uma população homogênea de progenitores responsáveis pela origem de todo o sistema, demonstram que se estabelece do início ao fim desse processo uma complexa rede de eventos.

O programa de diferenciação das células progenitoras é determinado intrinsecamente. No entanto, uma variedade de estímulos externos pode influenciar a definição e a diferenciação das linhagens. Esses estímulos geram sinais para a expressão de fatores de transcrição, os quais ativam conjuntos de genes que são responsáveis pela escolha de

linhagens, por diversos fenótipos da maturação, ou para a progressão do ciclo celular (Shivdasani e Orkin, 1996)

Os fatores externos e intrínsecos, que dirigem a diferenciação, permitem que se estabeleçam várias alternativas no sistema a fim de atender à demanda específica ou global das células produzidas. Esta plasticidade sustenta a hematopoese durante toda a vida.

1.4.5 Citocinas reguladoras da hematopoese

A hematopoese está sob a influência de grande variedade de citocinas, as quais são produzidas ao nível medular ou em tecidos periféricos. A produção destas citocinas pode ser aumentada por reações imunológicas, hemorrágicas e até mesmo por produtos de agentes infecciosos (Nicola, 1989; Cheers et al., 1988; Shieh, et al., 1994).

Os fatores estimuladores de colônias (Colony Stimulating Factors – CSF) são os mais estudados no sistema hematopoético. Eles foram inicialmente encontrados em meio de cultura condicionado, sendo obtidos pelo cultivo de linfócitos ativados, linhagens celulares e tecidos. São assim denominados por sua ação sobre as células progenitoras que, imobilizadas em sistemas de cultivo, geram colônias. Estes fatores foram isolados e seus genes clonados. A partir destes avanços suas atividades biológicas vêm sendo estudadas *in vitro* e *in vivo*. Eles representam um grupo de glicoproteínas que regulam a produção e, também, a atividade funcional de células maduras (Nicola, 1989).

Os efeitos estimulantes ou inibidores sobre a hematopoese são induzidos pela ação direta ou indireta de citocinas sobre as HP. Esta regulação pode ocorrer ao nível de expressão gênica de receptores membranares, das enzimas de degradação, dos elementos da matrix extracelular, das moléculas de adesão e, de outros níveis de controle da hematopoese.

1.4.6 Receptores de citocinas e diferenciação de progenitores

As respostas celulares induzidas por citocinas são dependentes da disponibilidade de seus respectivos receptores na superfície celular. A associação de uma citocina com o seu receptor específico no meio extracelular aumenta a complexidade da regulação que essas citocinas apresentam no organismo (Gordon, 1991).

Têm sido identificados receptores específicos de alta afinidade para os fatores hematopoéticos em linhagens celulares, tecidos normais e células leucêmicas da linhagem mielóide. Os receptores do fator estimulador de colônias de macrófagos (Macrophage – Colony Stimulating Factor, M-CSF), são essencialmente restritos a células da linhagem monocítico/macrofágica, possivelmente com poucos receptores em alguns neutrófilos, centenas de receptores em monócitos e seus precursores e milhares de receptores em macrófagos ativados (Nicola, 1989). Similarmente, os receptores para o fator estimulador de colônias de granulócitos (Granulocyte – Colony Stimulating Factor, G-CSF) são predominantes nas células da linhagem dos granulócitos neutrófilos, com pequeno número de receptores em monócito/macrófagos e, de acordo com o estágio de diferenciação dos neutrófilos, podem atingir a cifra de centenas por células (Nicola et al., 1985, Nicola e Metcalf, 1986). Por outro lado, os receptores para o fator estimulador de colônias de granulócitos/macrófagos (Macrophage and Granulocyte – Colony Stimulating Factor, GM-CSF) e IL-3 são mais uniformemente distribuídos em neutrófilos e monócitos ou macrófagos e geralmente diminuem para centenas ou valores menores por célula ao se tornarem maduras (Nicola e Metcalf, 1986; Nicola, 1987).

A estrutura dos receptores para as citocinas embasa a redundância funcional entre elas. Os receptores de alta afinidade são constituídos de subunidades múltiplas. Um grupo de citocinas, que apresentam funções similares em determinada célula alvo, compartilha um componente comum, essencial na transdução de sinais. Inclui-se neste contexto a resposta induzida por IL-3, GM-CSF e IL-5; outro grupo de citocinas que compartilham o mesmo receptor é constituído por IL-6 (Interleucina-6), LIF (Leukemia Inhibitor Factor – Fator Inibidor de Leucemia) e IL-11 (Interleucina-11); e possivelmente a IL-13 (Interleucina-13) e a IL-4 (Interleucina-4) também partilham receptores (Lopez et al., 1992; Miyajima et al., 1993).

A ocupação de um grupo de receptores por um fator correspondente pode influenciar o comportamento dos receptores para outros fatores na mesma célula, isto é, o receptor a um determinado fator pode ser modulado por outros fatores (Horiguchi, et al., 1987; Walker et al., 1985; Jacobsen et al., 1991).

1.4.7 Mecanismos de regulação da resposta hematopoética

Estudos clínicos e experimentais demonstram que a exposição a várias formas de estresse altera a atividade de diferentes populações celulares comprometidas com a

resposta imune (Chrousos, 2000). Todas as células do sangue derivam das células progenitoras hematopoéticas da medula óssea, as quais se proliferam e se diferenciam em resposta a fatores neuroendócrinos locais e distantes. Desta forma, qualquer estímulo adverso capaz de influenciar o desenvolvimento destas células pode resultar em alterações na função imune. A importância das citocinas como mediadores de numerosos processos fisiológicos e patológicos e a demonstração das relevantes interações homeostáticas entre o cérebro e o sistema imuno-hematopoiético têm estimulado estudos para identificar as implicações funcionais da modulação dos efeitos desses mediadores em eventos de imunossupressão induzida por estresse (Marx et al., 1998; Miyan et al., 1998; Elenkov et al., 1999).

Diferentes mecanismos atuam na regulação da hematopoese (Metcalf, 1981; Dorshkind, 1990; Gol'dberg et al., 1990; McEwen, 1997; Elenkov et al., 1999; Maestroni, 2000). Um deles refere-se aos fatores do próprio microambiente da medula óssea, o qual é composto de células de músculo liso, células endoteliais, fibroblastos, macrófagos, adipócitos e condrócitos/osteoblastos, as quais constituem o estroma medular. Estas células estromais estão em íntima associação com as HSC e proporcionam um ambiente especializado para o crescimento e diferenciação das mesmas. Em condições de homeostasia, a grande maioria destas células tronco permanece quiescente no estroma, o que reflete a ausência de sinais estimuladores ou o envolvimento de sinais supressores. Estes sinais reguladores, que agem direta ou indiretamente sobre estas células precursoras, trabalham em conjunto, visando regular tanto a hematopoese de repouso, quanto a rápida e reversível adaptação da hematopoese frente a diferentes tipos de estresse. Neste contexto, citocinas supressoras podem atuar diretamente sobre as células hematopoéticas impedindo a mudança do estado quiescente (fase G0/G1 do ciclo celular) para a fase de proliferação através da supressão de receptores específicos de citocinas estimuladoras. Em contraste, citocinas estimuladoras agem levando as células progenitoras para a fase ativa do ciclo celular (Min Li et al., 1999).

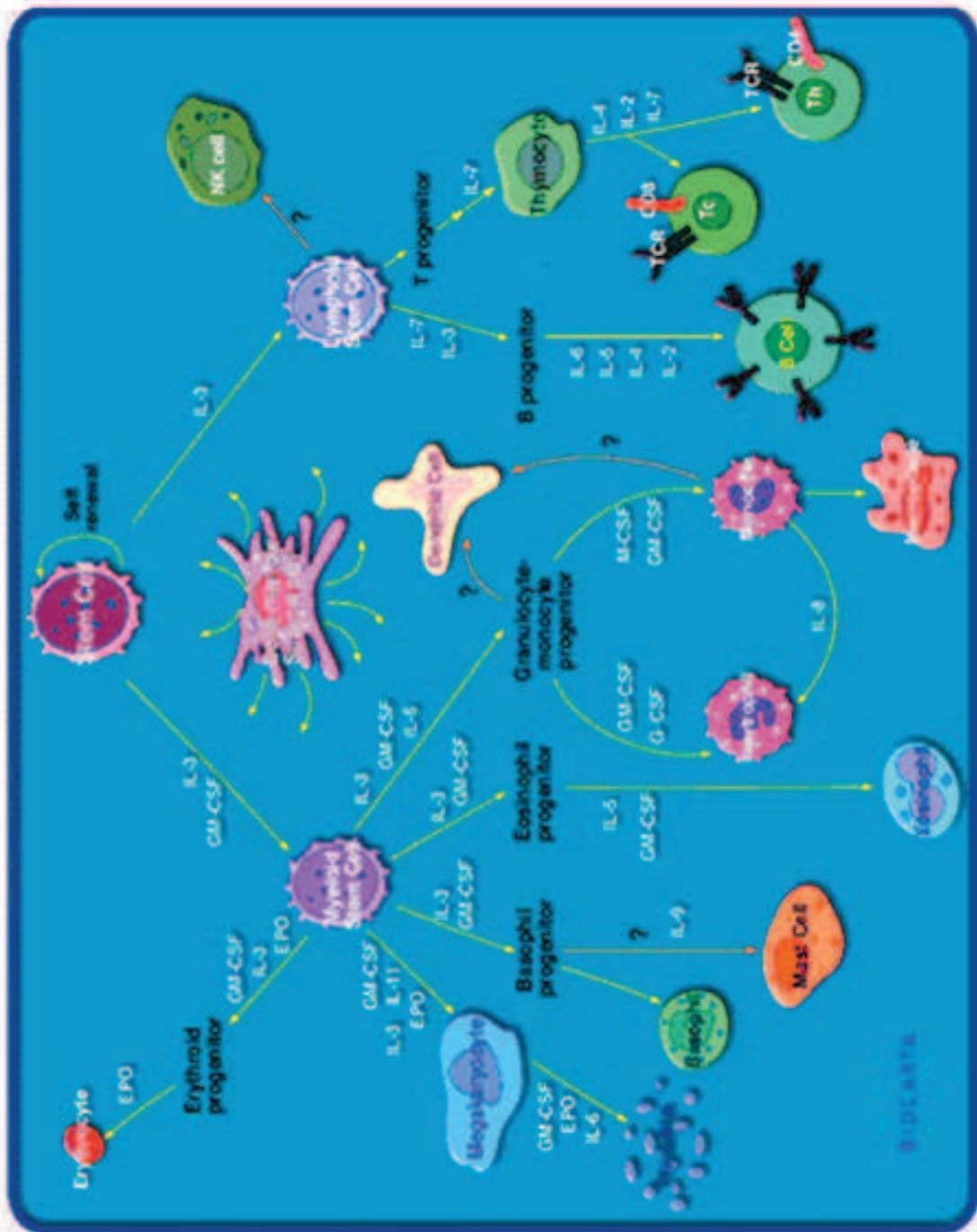
As citocinas hematopoéticas [fatores estimuladores do crescimento de colônias (CSFs)] agem na medula óssea como fatores de crescimento e na periferia influenciam a atividade funcional das células maduras. As citocinas inflamatórias desempenham papel importante na patofisiologia de vários estados inflamatórios e outras doenças severas como choque séptico e caquechias. Além disso, confirmando a característica pleiotrópica das citocinas (capacidade de uma determinada citocina de elicitar diferentes respostas biológicas em diferentes tipos de células), aquelas com atividade predominantemente

hematopoética também podem apresentar propriedades inflamatórias e, de forma inversa, citocinas inflamatórias também podem influenciar (direta ou indiretamente) as células hematopoéticas. Neste sentido, podem ser detectadas nas células do estroma a interleucina (IL)-1 e a IL-6, além dos fatores de crescimento para granulócito (G-CSF), macrófago (M-CSF) e granulócito-macrófago (GM-CSF). A IL-1 e a IL-6 sozinhas têm pouco ou nenhum efeito sobre as células precursoras da medula óssea, mas em sinergismo com outros CSFs, são responsáveis por um amplo espectro de atividades biológicas, tais como aumento na taxa de proliferação e no número de progenitores comprometidos com diferentes linhagens, estímulo da liberação de citocinas por várias outras células, entre outras.

Outro mecanismo envolvido na regulação do sistema hematopoético está relacionado à regulação neural direta e baseia-se na presença de vias diretas de interação entre fibras neurais, órgãos linfóides e células hematopoéticas do estroma medular (Yamazaki e Allen, 1990; Friedman e Irwin, 1997). Sabe-se que uma grande variedade de estressores pode comprometer o papel fisiológico do sistema neural em regular a produção das células sanguíneas e a mobilização seletiva de células da medula óssea para a circulação (McEwen, 1997; Elenkov et al., 1999; Maestroni, 2000; Downing e Miyan, 2000). De particular importância para o escopo deste projeto são os estudos que demonstram serem estas fibras neurais que chegam ao estroma da medula óssea uma fonte de catecolaminas e outros neuropeptídeos capazes de modular a atividade hematopoética *in vivo* e *in vitro* (Miyan et al., 1998; Broome e Miyan, 2000). Dentro deste contexto, Maestroni e Conti (1994) mostraram que o bloqueio da transmissão adrenérgica resulta em aumento no número de unidades formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos. Estas observações são consistentes com a hipótese de que as fibras nervosas liberam neurotransmissores e neuropeptídeos na medula óssea, promovendo a liberação de citocinas pelas células do estroma. Desta forma, a liberação de neurotransmissores pode alterar a proliferação e/ou a velocidade de maturação das células progenitoras através da modulação da liberação de fatores humorais de crescimento hematopoéticos. Nesse sentido, estudos anteriores (Gol'dberg et al., 1988; Stratakis e Chrousos, 1995; Malacrida et al., 1997 a e b; Mizobe et al, 1997; Souza Queiroz et al., 2004; Dugan et al., 2007; Queiroz et al, 2008) mostraram alterações hematopoéticas em diferentes modelos experimentais de estresse, as quais foram mediadas pelo sistema neuroendócrino. Nestes estudos, foi observada uma redução na capacidade de crescimento clonal de granulócitos e macrófagos (precursores comprometidos com a série granulocítica-macrofágica – CFU-

GM) usando-se o modelo de desamparo aprendido (Malacrida et. al, 1996), de contenção e frio (Souza-Queiroz et al, 2004) e o de estresse emocional ou sistêmico (Souza Queiroz et al., 2008).

Informações acuradas sobre os mecanismos que afetam a hematopoese *in vivo* podem ser obtidas com o emprego da cultura líquida de longa duração de células da medula óssea (LTBMC), que consiste em um modelo *ex vivo* para o estudo das interações entre as células progenitoras hematopoéticas e as células do estroma medular (Dexter et al., 1977, Daniel et al., 1989, Queiroz et al., 2008). A importância deste tipo de cultura é que o balanço entre auto-renovação e diferenciação de células progenitoras hematopoéticas é mantido por várias semanas na ausência de fatores de crescimento exógenos, sendo, portanto, totalmente dependente da síntese e liberação de fatores de crescimento hematopoéticos endógenos. Nesta cultura, assim como ocorre *in vivo*, o contato físico entre as células do estroma e as células hematopoéticas produz o estímulo necessário para a sobrevivência, o crescimento, a diferenciação e a auto-renovação. O estímulo para o crescimento e diferenciação das células hematopoéticas está localizado primariamente na superfície da membrana das células estromais através de moléculas associadas à membrana celular que se ligam a fatores de crescimento, como o GM-CSF, e os apresentam para as células hematopoéticas na forma biologicamente ativa. Este processo é totalmente dependente da formação de uma camada de células estromais aderentes, que ocorre pela combinação de vários fatores que incluem moléculas de adesão celular, comunicação intercelular, síntese, secreção e apresentação pelas células do estroma de concentrações apropriadas de fatores de crescimento estimuladores e inibitórios, além da síntese de moléculas da matriz extracelular.



1.5. *Chlorella vulgaris*

A *Chlorella vulgaris* (*C. vulgaris*, descrita por M.W. Beijernick, 1890, CV) é uma alga verde unicelular microscópica de água doce da família Oocystaceae, com capacidade de se auto-reproduzir, e é reconhecida principalmente pela sua rica composição de nutrientes essenciais para a manutenção da auto defesa natural do organismo. Em sua composição básica apresenta 44% de proteínas, 40% de carboidratos e 16% de aminoácidos (Tanaka et al., 1986). Quanto às vitaminas, a *Chlorella* contém grande quantidade de beta caroteno, vitaminas C, E, K, B₁, B₂, B₆, B₁₂, niacina, ácido pantotênico, ácido fólico, biotina, colina, inositol, ácido para- minobenzóico (PABA). Na sua composição mineral encontramos quantidades consideráveis de cálcio, magnésio, zinco, cobre, manganês, ferro, enxofre, iodo, fósforo, potássio, cobalto, selênio, entre outros (Baianova e Trubachev, 1981).

Esta alga possui elevado conteúdo de clorofila, além de beta caroteno, vitaminas, proteínas, minerais, enzimas, entre outros (Hasegawa et al., 2000, Vijayavel et al., 2007; Rodriguez-Garcia e Guil-Guerrero, 2008). A CV é reconhecida pela sua atividade adaptógena ou modificadora da resposta biológica. Neste sentido, resultados mostraram que, no hospedeiro normal, não exposto a condições de estresse emocional ou físico, a administração da CV não altera o estado basal de importantes indicadores da atividade fisiológica. No entanto, em presença de condições adversas, o hospedeiro que vem recebendo *Chlorella* como complemento alimentar é capaz de reagir mais prontamente e com maior vigor na indução de mecanismos essenciais de defesa imune (Dantas e Queiroz, 1999; Justo et al., 2001; Queiroz et al., 2002; Souza-Queiroz et al., 2004 e 2008; Queiroz et al., 2008; Ramos et al., 2010).

Trabalhos na literatura demonstram a capacidade que tem alga de aumentar as defesas do hospedeiro a infecções e tumores em animais normais e imunossuprimidos (Tanaka et al., 1984, 1986 e 1998; Hasegawa et al., 1994, 1995; Konishi et al., 1985). Um resultado interessante desses estudos foi que mostramos ser o tratamento com CV capaz de aumentar não apenas a quantidade, mas também a atividade de fagócitos, principalmente neutrófilos, em camundongos neutropênicos pela exposição a quimioterápicos (Tanaka et al., 1998; Konishi et al., 1985, 1990, 1996).

Em experimentos anteriores, foram empregados modelos experimentais *in vivo* para estudar os efeitos da CV, nos quais a hematopoese tem um papel fundamental na evolução da doença, para investigar os efeitos da alga sobre os mecanismos reguladores dos

sistemas imunohematopoético, visando aumentar ou restabelecer as defesas do próprio hospedeiro capazes de inibir processos malignos e infecciosos (Dantas e Queiroz, 1999, Dantas et al., 1999; Justo et al., 2001; Souza-Queiroz et al., 2004 e 2008; Queiroz et al., 2002, 2003 e 2008; Ramos et al., 2010).

Resultados demonstram um importante efeito da alga na restauração da mielossupressão, representada pela redução no número de precursores hematopoéticos para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) na medula óssea, a qual é produzida pela evolução das doenças em estudo. Estes resultados são importantes, uma vez que a inibição de progenitores hematopoéticos na medula óssea representa um efeito agudo decorrente do rápido crescimento de certos tumores e da evolução de quadros infecciosos. Uma observação importante nestes estudos é a de que a reversão pela alga da mielossupressão induzida pelo agente agressor é acompanhada de aumento no tempo ou na taxa de sobrevivência. Nesse sentido, no modelo de infecção por *Listeria monocytogenes* (LM), observamos que, em comparação com a morte de 100% dos animais no grupo controle, uma sobrevivência de até 50% dos animais infectados e tratados com a alga (Dantas & Queiroz, 1999). Em modelo tumoral de alta agressividade (tumor de Ehrlich), a eficácia da *Chlorella* foi representada pelo aumento de 60% na duração da sobrevivência de animais portadores do tumor e tratados com a alga (Justo et al., 2001, Ramos et al., 2010).

Em estudos adicionais foi demonstrada a capacidade que tem a CV de aumentar os níveis de interferon-gama (INF- γ) e IL-2 em camundongos infectados com LM (Queiroz et al., 2002). Experimentos com camundongos C57BL/6 *knockout* para o gene de INF- γ confirmaram estes resultados ao demonstrar a importância desta interleucina na proteção dos animais contra a infecção com LM. Enquanto 100% dos animais controles, íntegros para o gene de INF- γ sobreviveram à infecção, animais *knockout* foram rapidamente eliminados. Da mesma forma, observamos uma completa ausência de proteção nos animais C57BL/6 *knockout* para INF- γ tratados com *Chlorella* e infectados com *L. monocytogenes*, corroborando dados da literatura sobre a importância desta citocina na proteção conferida pela alga (Queiroz et al., 2003).

A atividade de células natural killer (NK), potentes indutores da produção de INF- γ , também está aumentada em presença da CV (Dantas et al., 1999). Nesse sentido, Hasegawa et al. (1997, 2000), observaram os efeitos da administração de CV em aumentar a expressão gênica de citocinas ativas no sistema hematopoético, como a interleucina-12

(IL-12), interleucina-1 α (IL-1 α), interferon- γ , fator estimulador do crescimento de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α).

Estes resultados indicam que a administração oral de *Chlorella* ativa a resposta imune inata do hospedeiro, estimulando preferencialmente os linfócitos Th1, através do aumento na produção de IL-2 e INF- γ . Os interferons consistem numa grande família de proteínas endógenas secretoras, que não apenas partilham atividade antiviral, mas também têm a capacidade de modular a resposta imune, principalmente através da estimulação de macrófagos e mobilização de células NK, além de inibir a proliferação e promover a diferenciação de células no organismo.

No hospedeiro exposto ao chumbo foram avaliados os efeitos do tratamento com CV sobre a interação entre as células do estroma da medula óssea e as células hematopoéticas. A resposta hematopoética foi avaliada pela capacidade das células estromais de induzirem *in vitro* o crescimento e diferenciação de células progenitoras comprometidas com a linhagem granulócito-macrófago (CFU-GM). Além disso, os níveis de IL-6, importante estimulador da resposta hematopoética, foram investigados. Experimentos anteriores mostraram que o tratamento de camundongos expostos ao chumbo com CV restaura tanto a reduzida capacidade das células estromais de produzir CFU-GM quanto os níveis reduzidos de IL-6, induzidos pelo metal (Queiroz et al., 2008). Neste sentido, podemos sugerir que a redução no conteúdo de metal nos tecidos do corpo em combinação sinérgica com a modulação de citocinas hematopoéticas produzidos pela CV pode inibir os efeitos imunossupressores do chumbo sobre a interação entre as células estromais e hematopoéticas na medula óssea e, desta forma, potenciar a vigilância imunológica

Relevante para o presente estudo são os trabalhos realizados com a CV na modulação da resposta ao estresse. Conforme mencionado anteriormente, o estresse pode ativar o eixo HPA para produção do ACTH e liberação de glicocorticóides. Nesse sentido, Hasegawa et al. (2000), mostraram que a CV pode prevenir os efeitos imunossupressores do estresse psicológico em camundongos através da inibição da produção de corticosteróides endógenos. O fato de esta alga estimular a produção de citocinas como IL-1 e TNF- α , as quais deprimem a síntese de glicocorticóides, dá suporte a estes achados (Hasegawa et al., 1997, 2000).

Em estudo clínico, a administração de chlorella a indivíduos expostos a fatores de alto risco para a produção de doenças relacionadas ao estilo de vida resultou em

modulação conspícua no perfil de expressão de genes relacionados a moléculas de transdução de sinal, enzimas metabólicas, receptores, transportadores e citocinas (Mizoguchi et al., 2008).

Avaliamos em nosso laboratório o crescimento e diferenciação de granulócitos e macrófagos na medula óssea (CFU-GM) de ratos pré-tratados com CV, infectados com a bactéria LM e expostos ao impacto de estressores físicos e psicogênicos (Souza Queiroz et al., 2008). Os resultados mostraram que o impacto do estresse manifestou-se através de um início precoce de um aumento na severidade e duração da mielossupressão produzida pela infecção. O tratamento com CV preveniu a mielossupressão causada pelo estresse/infecção ao aumentar o número de CFU-GM na medula óssea. A investigação da produção de fatores estimuladores de colônias mostrou significativos aumentos na atividade estimuladora do soro nos grupos de animais tratados com CV. O tratamento com a alga também restaurou os níveis reduzidos de IFN- γ e os níveis aumentados de IL-10, observados após exposição aos dois tipos de estressores. Além disso, foi observada a eficácia terapêutica da CV nestes estudos através da sobrevida de animais expostos a uma dose letal de LM, produzindo sobrevida de 50% no grupo infectado e 20% no grupo estressado/infectado. Estes resultados sugerem que o tratamento com CV constitui ferramenta eficaz na profilaxia da mielossupressão pós-estresse, inclusive do efeito nocivo do estresse na evolução de quadros infecciosos (Souza Queiroz et al., 2008).

2. JUSTIFICATIVA

O conhecimento dos mecanismos pelos quais o estresse influencia a resposta imune é importante para o desenvolvimento de intervenções comportamentais e farmacológicas que visem reduzir a incidência das disfunções orgânicas por ele causadas. Conforme mostrado em estudos anteriores, o efeito imunomodulador da CV tem um papel importante na atividade profilática de proteção do hospedeiro submetidos a estressores, porém a literatura sobre os efeitos da CV no SNC é bastante escassa. Com o presente estudo avaliamos, de forma mais acurada e abrangente, os mecanismos moduladores da CV, mensurando seu efeito sobre 1) a expressão de c-fos em áreas do SNC conhecidas por serem ativadas mediante ao estresse emocional, 2) a ativação do eixo HPA, através da mensuração da expressão de mRNA de hnCRF e da liberação de ACTH e corticosterona 3) a ativação do SNAS, através da mensuração de glicose e 4) a hematopoese, com o propósito de contribuir com estratégias efetivas de prevenção e novos regimes de tratamento visando a melhora da saúde humana.

3. OBJETIVOS

3.1. Gerais:

Avaliar os mecanismos de ação da CV sobre a ativação neuronal, o eixo HPA e a resposta hematopoética de animais estressados.

3.2. Específicos:

Avaliar os efeitos do tratamento oral com suspensão de CV em animais estressados sobre os seguintes parâmetros:

- 1) Ativação neuronal das seguintes áreas e subregiões: mPFC (Cg, PrL, IL), LSV, PVN (magnocelular e parvocelular medial dorsal), DR e LC.
- 2) Ativação do eixo HPA, através da quantificação da expressão do gen para hnCRF e níveis de ACTH e corticosterona;
- 3) Ativação do SNAS, através dos níveis de glicose no plasma.
- 4) Parâmetros hematopoéticos:
 - Crescimento e diferenciação de precursores para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) na medúla óssea;
 - Atividade estimuladora de colônias do soro (CSA) na medula óssea;
 - Quantificação de populações maduras e imatura, através da Imunofenotipagem de células da medula óssea;
 - Morte celular na população LSK na medula óssea;
 - Formação do estroma medular, utilizando a cultura líquida de longa duração (LTBMC). Avaliamos a interação entre as células estromais e hematopoéticas, através da:
 - Capacidade clonogênica (CFU-GM) das células não-aderentes presentes no sobrenadante das LTBMC;
 - Dosagem de IL-1 α e IL-6 no sobrenadante de LTBMC
 - Imunofenotipagem de células não-aderentes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais

Os experimentos foram realizados em diferentes laboratórios.

Para os parâmetros avaliados na UNICAMP e UNIFESP (experimentos referentes à hematopoese) utilizamos camundongos machos Balb/c, com idade entre 8 a 10 semanas, provenientes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas, em sala climatizada sob temperatura constante de $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$, com ciclo claro-escuro de 12 h. O regime alimentar foi o clássico, com ração comercial padrão e água fornecida *ad libitum*. Os animais foram aclimatados às condições do laboratório durante um período de 1 semana. Após este período, os animais foram habituados tanto à manipulação pelo experimentador (*handling*) que consiste em massagens nas costas e uma leve movimentação de levantar e abaixar os animais, como à gavagem com a cânula, com o objetivo de minimizar o possível impacto do estresse associado a estas manipulações. Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisas animais da UNICAMP (protocolo número 1997-1), tendo sido aprovado. Para os experimentos os animais foram divididos em grupos de 6 animais cada, sendo submetidos a um tratamento de acordo com o protocolo experimental a seguir:

- a) Animais tratados com o veículo na mesma razão dose-volume por peso corporal administrada aos animais tratados;
- b) Animais tratados com *Chlorella vulgaris* (CV);
- c) Animais submetidos ao estresse;
- d) Animais tratados com o CV e, em seguida, submetidos ao estresse.

Para os experimentos realizados na Universidade Autônoma de Barcelona (UAB – Barcelona, Espanha), que foram medidas da: expressão de c-fos e hnCRF, níveis de ACTH, corticosterona e glicose, utilizamos Ratos machos Spraghe-Dawley procedentes do Serviço de Biotério da UAB, cujas idades variavam de 50 e 60 dias no início do procedimento experimental. Desde a chegada dos animais ao biotério do laboratório até o final do procedimento experimental, os animais foram colocados em caixas opacas de 1000 cm³ de capacidade (57 x 27 x 14,5 cm, Panlab SLU) contendo maravalha absorvente (Ultrasorb, Panlab SLU). Os animais foram mantidos em condições laboratoriais de luz

(foto-período de 12 h), temperatura ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$) e umidade (40-60%). Durante toda a fase experimental, os animais receberam comida (Dieta A-04, Panlab SLU) e água *ad libitum*. Após a chegada dos animais ao Biotério do laboratório, eles foram habituados por uma semana às instalações, período em que não foi realizada nenhuma manipulação. Após este período, os animais foram habituados tanto à manipulação pelo experimentador (*handling*) que consistem em massagens nas costas, leve movimentação de levantar e abaixar os animais e massagem na cauda, como à gavagem com a cânula e incisão na cauda, com o objetivo de minimizar o possível impacto do estresse associado a estas manipulações. O trabalho foi avaliado pelo “Comité de Etica de Experimentación Animal y Humana de la UAB (CEEAH-UAB): 00790m e Núm. de orden del Departament de Medi Ambient i Habitatge de la Generalitat de Catalunya (DMAH): 4598”.

4.2. Estresse

O estresse por contenção é um modelo de estresse psicológico conhecido por induzir ansiedade (Chakraborti et al., 2007). Nos experimentos realizados na UNICAMP/UNIFESP, os camundongos foram colocados em tubos cilindricos de plástico com abertura para ventilação, tendo assim os seus movimentos restritos (Gamero et al., 1999). Foram mantidos por 3 horas/1 dia, com restrição à água ou ração.

Nos experimentos realizados com ratos na UAB, utilizamos o modelo de natação forçada, um teste que tem sido amplamente utilizado para a validação de fármacos antidepressivos (Porsolt, 1979; Armario et al., 1988; Cryan et al., 2005) e também para avaliar estratégias de enfrentamento ativo/passivo frente a situações estressantes (Armario et al., 1988; Martí e Armario, 1993). Neste teste, se força o animal à natação forçada, já que se impede o apoio das patas traseiras no chão do tanque. Utiliza-se um cilindro de plástico (plexiglás) transparente de 40 cm de altura e 20 cm de diâmetro apoiado sobre uma base de 25 x 25 cm, com água (36°C de temperatura) até um nível de 24 cm. Estes cilindros são colocados em um molde de madeira individualizador, de cor negra, para evitar que os animais se vejam e para facilitar a detecção dos movimentos dos animais para posterior análise. Uma vez finalizada a prova, os ratos são secos com toalhas de algodão e a água do tanque é trocada para um novo teste.

4.3. *Chlorella vulgaris*

A alga *Chlorella vulgaris* foi obtida da Chlorella Industry Co. Ltd. (Tokyo, Japão). Para o tratamento dos animais, a o pó da CV foi ressuspenso em água destilada a 40°C. Para os experimentos da UNICAMP/UNIFESP a CV foi administrada por via oral por 5 dias prévios ao estresse na dose previamente estabelecida de 50mg/Kg (Souza Queiroz et al., 2004).

Nos experimentos da UAB, primeiramente fizemos um estudo de diferentes doses e tempos de tratamento. Para as dosagens de ACTH, corticosterona e glicose, usamos as doses agudas de CV de 50 e 200 mg/Kg e repetidas de 200 mg/Kg (7 dias/1vez ao dia) diluída em água. Considerando-se os resultados que obtivemos neste experimento, selecionamos a dose aguda de 200 mg/kg para os parâmetros de ativação neuronal, que foi administrada 24 h antes da natação forçada.

4.4. *Obtenção de amostras de sangue*

Todas as amostras de sangue foram obtidas na UAB mediante o procedimento de incisão na cauda, uma técnica amplamente utilizada neste laboratório, que permite a obtenção de níveis hormonais próximos aos do basal se o animal estiver previamente habituado ao procedimento (Belda et al., 2004; Vahl et al., 2005). A incisão é pequena e tem uns 2 mm de profundidade, sendo feita na parte distal de uma das veias da cauda do animal. O sangue é extraído mediante uma massagem leve na cauda para conduzi-lo até o corte e evitar o retrocesso venoso. Este método permite extrair várias amostras de sangue em tempos espaçados com apenas uma incisão. Em cada caso, um volume superior a 300 µl foi coletado, durante um tempo máximo de 2 min, tendo sido colhido em capilares contendo EDTA (Sarstet Microvette CB300). Com a ajuda de três investigadores, foi extraído o sangue dos dois animais de cada caixa simultaneamente (dois investigadores realizavam a incisão na cauda e um terceiro, segurava os animais). O sangue permaneceu a 4°C até o momento de se obter o plasma por centrifugação (Heraeus Biofugue Primo Centrifuge, Thermo Scientific) a 4900 g durante 25 min a 4°C. Em seguida, as alíquotas de plasma foram congeladas a -20°C até o momento de sua análise. Conforme observado nos estudos da UAB, os níveis basais de ACTH são de aproximadamente 50 pg/ml e ao redor de 1 µg/dl para corticosterona. Em ratos, que são animais noturnos, os níveis de corticosterona passam de 1-2 µg/dl pela manhã, a 10-50 µg/dl no início da fase noturna. Este incremento é mais discreto nos níveis de ACTH, que tem o seu valor duplicado entre

as duas fases do dia (Armario, 2006b). Por esta razão, todos os procedimentos experimentais foram realizados no período da manhã (entre as 9 e 13 hrs aproximadamente). Os níveis de ACTH e corticosterona no plasma foram analisados pela técnica de radioimunoanálise (RIA), amplamente validadas no laboratório da UAB. Todas as amostras que seriam estatisticamente comparadas foram processadas na mesma análise para evitar a variabilidade inter-ensaio.

4.5 Análises Bioquímicos (UAB)

4.5.1 RIA de ACTH

Os níveis de ACTH no plasma foram analisados na UAB por RIA de duplo anticorpo, seguindo-se o protocolo descrito previamente por Engeland et al. (1989). Foi utilizado um tampão de fosfato disódico 50 mM, pH 7,2, contendo EDTA dissódico 25 mM, Tritón X-100 a 0,1% e albúmina bovina a 0,25%, dissolvidos em água MilliQ. Todo o procedimento de RIA foi realizado a 4°C para evitar a degradação do ACTH. ACTH1-39 de rato foi utilizado (Sigma) como standar, 3-[125I]iodotirosil23-ACTH1-39 (atividade específica de 2000 Ci/mmol, PerkinElmer) como traçador e um anticorpo anti-ACTH de rato (Ab rb 7) doado pelo Dr. W.C. Engeland (Department of Surgery, Univ. of Minnesota, USA). A fração livre foi separada por centrifugação (4700 rpm, 30 min a 4°C), após a precipitação com um segundo anticorpo (goat anti-rabbit IgG, Serotec) contendo soro normal de coelho (NSR) a 0,15% e polietilenglicol a 9%. A radioatividade dos pellets foi medida por um contador gamma (Wallac 1272, Clinigamma). Os cálculos para determinar a concentração de ACTH foram feitos mediante uma transformação log-logit. A sensibilidade da técnica foi de 12,3 pg/ml e os coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaio foram de 3,6% e 10,1%, respectivamente.

4.5.2- RIA de Corticosterona

A concentração de corticosterona no plasma foi determinada na UAB seguindo-se o protocolo de RIA de duplo anticorpo em equilíbrio, segundo o protocolo descrito por Zelena et al. (2003). Foi utilizado um tampão de fosfato sódico 0,2 M, pH 7,6 e ácido cítrico 0,01 M, dissolvidos em água MilliQ. As amostras foram incubadas em ácido cítrico 0,1M durante 2 h a uma temperatura ambiente para eliminar a globulina da união com a corticosterona

(CBG). Corticosterona sintética (Sigma) foi utilizada como padrão, ¹²⁵I-Corticosterona (atividade específica de 1500-2000 µCi/µg, ICN-Biolink 2000) usada como traçador e, também um anticorpo contra corticosterona de rato doado pelo Dr. G.B. Makara (Institute of Experimental Medicine, Budapest, Hungria). A fração livre foi separada por centrifugação (3200 g, 35 min a 4°C), com um segundo anticorpo (goat anti-rabbit IgG, Serotec) contendo polietilenglicol a 7,5%. A radioatividade dos pellets foi medida mediante um contador gamma (Wallac 1272, Clinigamma). Os cálculos para determinar a concentração de corticosterona foram feitos mediante uma transformação log-logit. A sensibilidade da técnica foi de 0,1 µg/dl e os coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaio foram de 7,7% e 11,5%, respectivamente.

4.6- Valoração Enzimática da Glicose

Os níveis plasmáticos de glicose foram medidos na UAB através do método colorimétrico de oxidação da glicosa, usando um kit comercial (Glucose RTU, Biomerieux). A sensibilidade da técnica foi de 22,5 mg/dl e os coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaio foram de 3 % e 3,2%, respectivamente.

4.7- Procedimentos histológicos (UAB)

4.7.1- Extração e Processamento do cérebro

Uma vez realizado o tratamento experimental, os animais foram anestesiados via inalatória em uma câmara saturada com Isoflurano (Laboratorios Esteve), fornecido por uma equipe de anestesia de gases (Cibertec) conectado a uma bomba de oxigênio medicinal (Air Liquide Medicinal). Sob anestesia profunda, os animais foram perfundidos transcardiacamente com solução salina estéril (0,9% NaCl a 4°C) durante 2 min e posteriormente com paraformaldeído (4% PFA a 4°C) em tampão borato (3,8% Tetraborato de sódio) durante 10 min. Uma vez terminada a perfusão, os cérebros foram extraídos e mantidos na solução de fixação (4% PFA em tampão borato) durante 24 h a 4°C. Depois deste período, a solução de fixação foi substituída por uma solução crioprotetora (0,2 M NaCl, 43 mM fosfato potássico (KPBS) e sacarosa a 30%, 4°C) até que o tecido ficasse totalmente submerso (2-3 dias). Finalmente, os cérebros foram colocados em isopentano e congelados em CO₂ sólido (-40°C) e guardados a -80°C. Um criostato

(Leica, CM3050 S) foi utilizado para a obtenção de várias séries de cortes do cérebro de 14 µm de grossura, representativos de todo o cérebro. Os cortes foram armazenados a -20°C em solução anti-congelante (30% etilenglicol, 20% glicerol em tampão fosfato 0,25 mM a pH7,3) até serem processados.

4.7.2- Obtenção da Ribosonda Radiativa

A ribosonda radioativa anti-sense para o RNA mensageiro (mRNA) de c-fos foi gerada mediante transcrição *in vitro* (SP6/T7 Transcription Kit, Roche) a partir de fragmentos de cDNA de rato (Dr. I. Verma, The Salk Institute, USA) subclonados em um plásmidio pBluescript SK-1 (Stratagene). A ribosonda radiativa anti-sense para o RNA heteronuclear (hnRNA) de CRF foi gerada igualmente desde o fragmento de DNA de rato (Dr. Lisa Bain, University of Michigan, USA) subclonado em um plásmidio PGEM-3 (Promega). Ambas ribosondas foram cedidas pelo Dr. Serge Rivest (Laval University of Quebec, Canada). Em cada transcrição foi utilizado 1 µg de plásmido digerido como DNA molde e 35S-UTP como nucleótido marcado radiativamente (atividade específica 250 Ci/mmol, PerkinElmer). Uma vez finalizada a transcrição e após a digestão com 20U de DNAsa (SP6/T7 Transcription Kit, Roche), foi acrescentado 40 µl de tampão STE (0,1 M NaCl; 10 mM Tris-Cl; 1mM EDTA, pH 8,0) e foi feita uma incubação a 65°C durante 5 min, antes de sua purificação para inativar enzimas. Em seguida foi feita a extração da sonda mediante colunas de filtragem em gel (mini Quick Spin RNA Columns, Roche). Após a incorporação da eficiência de marcação em cada caso (>50%), o eluido da coluna contendo a sonda radioativa foi conservado a -20°C até sua utilização nos respectivos ensaios de hibridização *in situ*.

4.7.3- Hibridização In Situ

Previamente ao ensaio, os cortes do cérebro foram lavados com KPBS para retirar a solução anti-congelante e foram montados sobre lâminas (Superfrost Plus Slides, Thermo Scientific). Posteriormente, os cortes foram secos durante 12 h e, em seguida, foram conservados a -20°C em caixas seladas e na presença de um agente secante (Silica Gel PS, Fluka), até o início do experimento.

O protocolo utilizado foi adaptado de Swanson e Simmons (1989). Todas as soluções foram pré-tratadas com dietilpirocarbonato (DEPC) e esterelizados por autoclave antes de

sua utilização. Os cortes foram fixados em um banho de PFA/bórax durante 30 min. Passado este tempo, foram realizados 4 lavados de 5 min em KPBS para eliminar o resto do fixador. Em seguida foi realizado uma digestão durante 15 min a 37°C com Proteínasa K (Roche) a uma concentração de 0,01 mg/ml em uma solução adequada (100mM Tris-HCl, pH 8,0; 50 mM EDTA, pH 8,0). A digestão foi interrompida por um lavado com água tratada com DEPC. Depois disso, as sessões foram colocadas em uma solução de trietanolamina (TEA 0,1 M, pH 8,0), e acetiladas durante 10 min em uma solução de anidrido acético a 0,25% em TEA 0,1 M, pH 8,0. Passado este tempo, foi feito um lavado de 5 min em uma solução salina contendo citrato de sódio (SSC 2x: 0,3M NaCl; 0,03 M citrato sódico tribásico). Por último, os cortes foram desidratados por banhos sucessivos com concentrações crescentes de etanol (50%, 75%, 95% e 2 x100%), deixando-os secar a temperatura ambiente. Uma vez secas, adicionamos sobre cada lâmina 100 µl de solução de hibridização (formamida 50%; 0,3 M NaCl; 10 mM Tris- HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA, pH 8,0; 1x solução Denhardt; sulfato de dextrano 10%; tRNA de levedura 500 g/l; DTT (ditiotreitól) 10 mM) contendo a sonda radioativa (106 dpm/100 µl). As lâminas foram cobertas posteriormente. Os cortes foram incubados durante 16-18 h a 60°C para permitir a hibridização. Posteriormente, as seções foram lavadas em 4 banhos sucessivos de SSC 4x, e submetidas a uma digestão com RNAsa A (Roche) a 0,02 mg/ml em uma solução adequada (NaCl 0,5 M; 10 mM Tris-HCl,pH 8,0; EDTA 1 mM pH 8,0 a 37°C). Após a digestão, foram realizados lavados sucessivos em concentrações decrescentes de SSC (2x e 0,5x); DTT 1mM, incluindo um lavado adstringente em SSC 0,1x na temperatura de 60°C e um enxague posterior em SSC 0,1x a temperatura ambiente antes da desidratação em banhos sucessivos em concentrações crescentes de etanol. Após deixar os cortes secarem a temperatura ambiente, eles foram expostos a um filme XAR-5 Kodak Biomax MR (Amersham) durante o tempo necessário para a detecção ótima do sinal radioativo. De acordo com a área analisada, este tempo esteve compreendido entre 24 a 48 h para o mRNA de c-fos e 14 dias para o hnRNA de CRF. Para comprovar que o tempo de exposição dos filmes foi o necessário para a sua análise densimétrica correta, quantificamos em cada caso fotografias de exposições de cortes que mostravam uma intensidade alta, média e baixa. As unidades arbitrárias obtidas foram interpoladas em gráficos de saturação feitas mediante uma microescala autorradiográfica de 14C que foi fotografada e quantificada nas mesmas condições, comprovando-se que os distintos valores foram situados na parte linear do gráfico, ideal para sua quantificação.

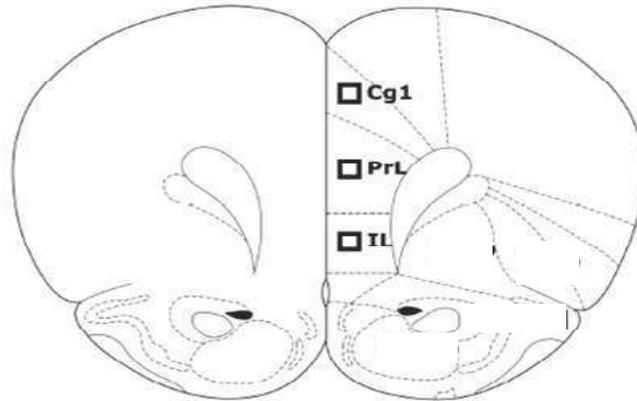
4.7.4 -Emulsão (Autoradiografia)

Foi utilizado um método autoradiográfico de emulsão quando uma máxima precisão da zona quantificada se fez necessária. As lâminas foram limpas, procedendo-se com o *defeating* com séries de etanoles e xilenos (5 min em etanol 95%, 3x5 min em etanol 100%, 10 min em xileno, 30 min em xileno e 3x5 min em etanol 100%) e foram submersos em NTB2 emulsão nuclear (Kodak) durante poucos segundos. Depois de serem expostos em absoluta escuridão (4 dias para mRNA de c-fos e 40 dias para hnRNA de CRF) foram revelados a 14°C em D19 *developer* (Kodak) durante 3,5 min, lavados em água durante 1 min e tratados com líquido fixador (Kodak) durante 6 min. As lâminas foram lavados por 45 min com água corrente e depois 2x5 min em água destilada. Em seguida, foram tingidos com tionina 0,25 % (Sigma) durante 60 segundos, desidratados seguindo uma série crescente de etanoles (50%, 70%, 95% e 100%) e lavados em xileno durante 2x3 min. Depois foram cobertos com DPX (Sigma).

4.7.5- Análise de Imagens

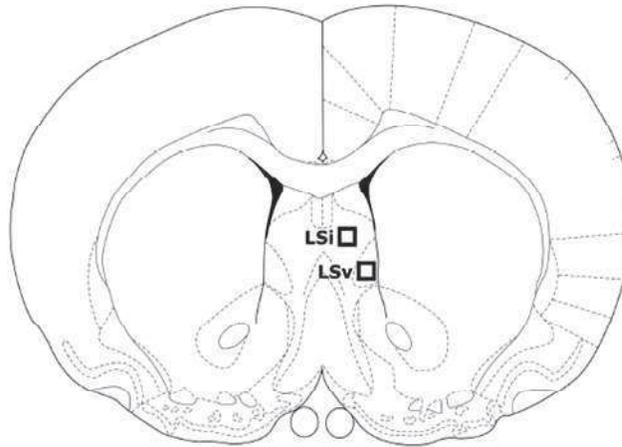
Fotos com as mesmas coordenadas foram tiradas das áreas cerebrais avaliadas no presente trabalho (ver Fig. 6). O atlas esterotático de Paxinos e Watson (2007) foi utilizado como referência. Foram tiradas de 4 a 8 fotos da mesma área por animal. As imagens foram feitas com uma câmara digital (NIKON, DMX 1200), acoplada a um microscópio (NIKON, Eclipse E400) com um aumento de 10x. Foram feitas análises densitométricas com microscopia de campo claro nos filmes autoradiográficas e com microscopia de campo escuro no tecido exposto à emulsão. Os níveis de c-fos e de RNA foram determinados de forma semi-quantitativa sobre as imagens capturadas usando o *programa Image* para medir a densidade óptica e o número de píxeles em uma área determinada. Os valores foram expressos em unidades arbitrárias (U.A., número de píxeles x densidade óptica). No momento da quantificação o sinal do fundo foi considerado como inespecificidade da técnica. Para isso quantificamos várias imagens do corpo caloso e este valor foi subtraído das áreas quantificadas. Todas as amostras que foram comparadas estatisticamente foram processadas na mesma análise para evitar a variabilidade inter-ensaio.

6A



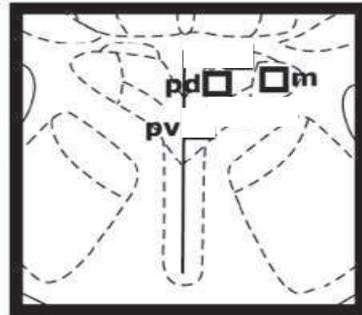
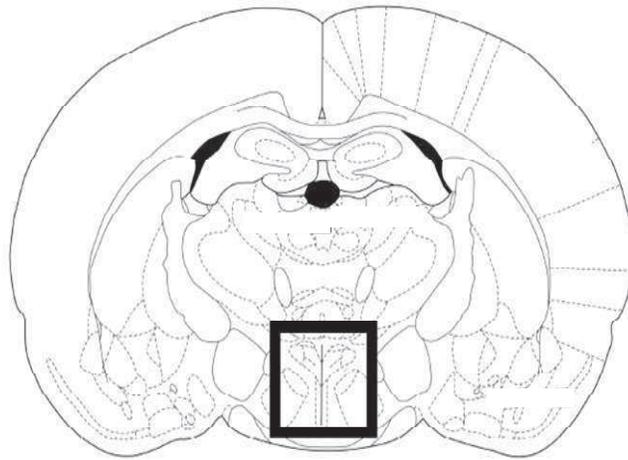
Bregma +3.2 mm

6B



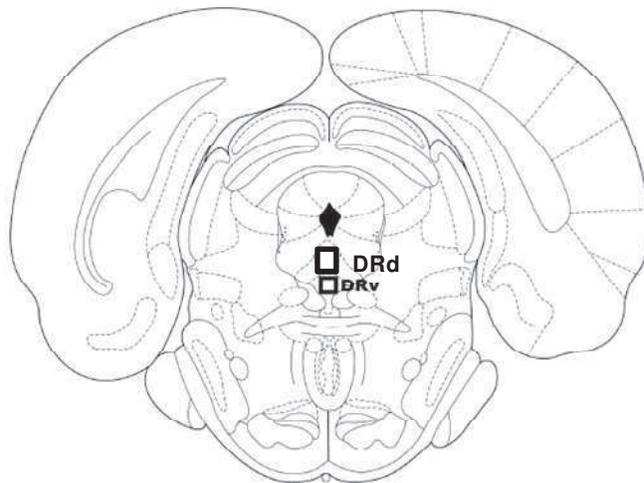
Bregma +0.70 mm

6C



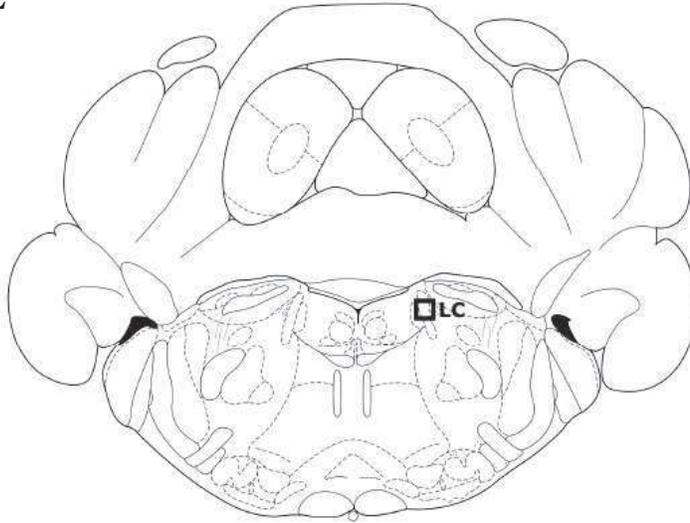
Bregma -1.88 mm

6D



Bregma -7.64 mm

6E



Bregma -9.68 mm

Figura 6: Esquemas representativos da localização estereotóxica das áreas do SNC analisadas. 6A: subregiões Cg, PrL e IF do córtex pré-frontal medial; 6B: septum lateral ventral, LSv; 6C: núcleo paraventricular do hipotálamo, PVN, subregiões magnocelular e parvocelular dorsal; 6D: subregiões ventral e dorsal, DRv e DRd, do Núcleo Dorsal da Raphe, e 6E: locus coeruleus, LC (adaptado de Paxinos e Watson, 2007).

4.8. Cultura de longa duração de células progenitoras hematopoéticas (LTBMC)

Os experimentos relacionados descritos nos itens 4.8, 4.8.1, 4.8.2, 4.9 e 4.10 foram realizados sob a supervisão da Profa. Dra. Mary L. S. Queiroz – FCM, UNICAMP)

Com objetivo de avaliar os efeitos da alga *Chlorella vulgaris* sobre o estroma medular e sobre a diferenciação de progenitores para granulócitos e macrófagos gerados em sistema de LTMBC, os dois fêmures dos animais submetidos aos referidos tratamentos (item 4.1) foram coletados assepticamente e as células coletadas foram transferidas com o auxílio de agulha e seringa para um tubo contendo 10 mL de meio de cultura RPMI suplementado com estreptomicina 100 mg/L, penicilina 100 mg/L, Hepes 25 mmol/L, L-glutamina 2 mmol/L, bicarbonato de sódio 25 mmol/L, hidrocortisona 1 µmol/L e 20% de soro eqüino (meio completo). A seguir, a viabilidade das células foi determinada em câmara hemocitométrica pelo método de exclusão do corante azul de Tripán 1% e o volume da suspensão total de células estromais foi ajustado com meio completo. Esta suspensão de células foi transferida para garrafas de cultura T25 (frascos de 25 cm²) que foram mantidas por 9 semanas a 37°C, na presença de 5% de CO₂ no ar para a formação da camada de células aderentes.

Semanalmente, 5 mL da suspensão de células de cada frasco de cultura foram transferidos para um tubo tipo Falcon (“pool” de todos os frascos de cada grupo), centrifugado, o pellet de células não-aderentes foi contado em câmara hematocimétrica e os sobrenadantes foram congelados a -20°C para posterior avaliação da capacidade clonogênica (item 4.8.1) e dosagem de citocinas (item 4.8.2). Cinco mL de meio de cultura completo (novo) foram adicionados às culturas.

Na quarta semana, após retirar os 5 mL do sobrenadante, as culturas foram repopuladas com 5 mL de meio completo contendo células da medula óssea e do estroma medular dos fêmures de animais da mesma idade e submetidos aos mesmos tratamentos. Os frascos foram, então, incubados nas mesmas condições. O “pool” da suspensão de células de cada grupo, coletado dos frascos foi centrifugado a 1000 g por 10 minutos e o botão de células ressuspenso em 1 mL de meio RPMI 1640 para avaliação da viabilidade das células pelo método de exclusão do corante azul de Tripán.

Da quinta (tempo necessário para a confluência das células do estroma) à nona semana, foi efetuada a troca do meio (5 garrafas por grupo), sendo o sobrenadante utilizado para a realização dos experimentos descritos nos itens 4.8.1, 4.8.2 e 4.11.

4.8.1 – Ensaios clonogênicos (CFU-GM) da LT BMC

A partir da quinta semana de LT BMC foram iniciados os ensaios para detecção de CFU-GM. O sobrenadante coletado das culturas foi centrifugado (10 min. a 500 g) e o “pellet” ressuspenso em 1 mL de meio α -MEM para a realização da contagem de células não-aderentes (viáveis) com azul de trypan (diluição 1:10) em câmara hemocitométrica. A seguir, o volume apropriado de células (1×10^5 células/mL) foi adicionado ao meio semi-sólido composto de 30% de meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - Difco) 2 x concentrado, 20% de soro fetal bovino e 50% de Bacto-ágar, Difco, (concentração final de 0,3%). As suspensões celulares foram distribuídas em volumes de 2,0 mL para cada placa de Petri (35mm), que já devem conter 100 μ L do fator recombinante para o crescimento de granulócitos e macrófagos (rGM-CSF, Sigma). O conteúdo foi distribuído por toda a superfície da placa. As placas foram incubadas por 7 dias a 37°C em presença de 5% de CO₂. Após este período foi contado o número de colônias em microscópio de dissecação com aumento de 40x.

4.8.2 Dosagem de citocinas na LT BMC

Para as dosagens de IL-1 α e IL-6 nas LT BMC, os sobrenadantes foram coletados semanalmente, centrifugados para remoção das células e congelados a -20°C, conforme descrito no item 4.8.

As concentrações de IL-1 α e IL-6 do sobrenadante das culturas de longa duração foram dosadas pelo método imunoenzimático ELISA (Enzyrna-Linked Immunosorbent Assay), utilizando-se anticorpos monoclonais específicos para cada citocina (Pharmingen™, San Diego, CA, USA).

A quantificação foi realizada em placa de microcultura para ELISA (“maxi scorp” 96 wells), seguindo a indicação do fabricante para a utilização de cada Kit. A leitura foi realizada em leitor de ELISA ($\lambda=450\text{nm}$) e os resultados expressos em pg/mL.

4.9 Avaliação da atividade estimuladora de colônias (CSA) na medula óssea

O sangue dos animais submetidos aos referidos tratamentos (rever item 4.1) foi coletado por punção cardíaca, sendo separado em “pools”, centrifugado para obtenção do

soro e armazenado a -20°C. A atividade dos fatores estimuladores de colônias no soro dos animais foi determinada pela capacidade de induzir o crescimento e diferenciação de precursores hematopoéticos de granulócitos e macrófagos de animais normais. A atividade estimuladora de colônias foi expressa em unidades por mL e determinada a partir de curva de titulação. De acordo com Van Den Engh e Bol (1975), a menor concentração capaz de estimular o crescimento de colônias é considerada como 1 unidade de CSF.

4.10 Cultura clonal de precursores hematopoéticos

Após eutanasiarmos o animal por deslocamento cervical, limpamos a pele com álcool iodado 70%. Após a exposição do fêmur, removemos a cartilagem sobre o orifício na extremidade distal e cortamos o osso na junção superior. A medula óssea foi transferida com auxílio de agulha e seringa para um tubo contendo meio RPMI-1640. As suspensões celulares foram mantidas no gelo. O número de células na suspensão foi contada em câmara hemocitométrica após diluição 1:10 das células em azul-tripán 0,2%. Preparamos o meio mais ágar que consiste de: 30% de meio DMEM 2X concentrado; 20% de soro bovino fetal e 50% de ágar. A seguir, adicionamos o volume apropriado de células da medula (1×10^5 células/ml) quando o meio mais ágar estava a 37°C. Ressuspendemos as células e distribuímos volumes de 2,0 ml em cada placa de Petri, as quais já continham 100 µL do soro dos animais tratados. Distribuímos o conteúdo por toda a superfície da placa de Petri e deixamos geleificar. Concomitantemente, foram incubadas células de animal normal com 100 µL de recombinante GM-CSF (0,5 ng/mL) (Sigma, Cód. G0282) para controle da reação. Incubamos por sete dias a 37°C em presença de 5% de CO₂ no ar e a seguir contamos o número de colônias em microscópio de dissecação com aumento de 40X.

4.11 Imunofenotipagem de células hematopoéticas da LTBM e da medula óssea por citometria de fluxo

Os experimentos descritos nos itens 4.11 e 4.12 foram realizados sob a supervisão da Profa. Dra. Cláudia Bincoletto (INFAR-EPM).

In vivo:

As células da medula óssea foram obtidas por “flushing” e homogeneizadas em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). Após este procedimento,

as células foram centrifugadas a 500 g, lavadas em PBS e fixadas por 15 min. em solução de paraformaldeído 2%. As células primitivas com o fenótipo Ckit⁺Sca1⁻ (HP) foram identificadas utilizando o coquetel de linhagens maduras (B220, CD3, Ter-119, CD11b, Gr-1-todos conjugados a ficoeritina, PE) e os anticorpos anti-Sca-1-Cy7/PE e anti-c-Kit-APC. As células mielóides maduras foram reconhecidas com os anticorpos anti-Gr-1-FITC e anti-CD11b-Cy7/PE, enquanto as células linfóides foram identificadas com os anticorpos anti-B220-PE e anti-CD3-APC. Após 30 min. de incubação as leituras foram realizadas no citômetro de fluxo FACsCalibur (Becton Dickinson, USA) e as análises no programa WinMDi 2.8.

LTBMC:

As células das LTBMC foram recolhidas em tubo de 15 mL, centrifugadas por 10 min. a 500 g, lavadas em PBS e fixadas por 15 min. em solução de paraformaldeído 2%. As células primitivas com o fenótipo Lin⁻Sca1⁻cKit⁺ (HP) foram identificadas utilizando o coquetel de linhagens maduras (B220, CD3, Ter-119, CD11b, Gr-1-todos conjugados a PE) e os anticorpos anti-Sca-1-Cy7/PE e anti-c-Kit-APC. As células mielóides maduras foram reconhecidas com os anticorpos anti-Gr-1-FITC e anti-CD11b-Cy7/PE. Após 30 min. de incubação as leituras foram realizadas no citômetro de fluxo FACsCalibur (Becton Dickinson, USA) e as análises no programa WinMDi 2.8.

4.12. Morte celular na medula óssea

Com auxílio de pinças e tesouras, os fêmures dos camundongos submetidos ao estresse foram retirados, todo tecido conjuntivo não-ósseo removido e a cavidade medular aberta, e, com auxílio de seringa, agulha e meio de cultura, retiramos a medula óssea (“flushing”). As células foram homogeneizadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB, recolhidas em tubos de 15 mL e centrifugadas por 10 min. a 500 g. Após este procedimento, incubamos as células com fluoróforo syto-green, o qual atravessa a membrana de células inviáveis e nos permite avaliar as células em necrose (Philippé *et al.*, 1997). Trabalhos na literatura descrevem o uso do fluoróforo SYTO para a detecção da morte celular (Frey, 1995; Poot, Gibson e Silver, 1997; Wlodkowik, Skommer e

Darzynkiewics, 2008). Em todas as amostras foram adicionadas o coquetel de linhagens maduras (B220, CD3, Ter-119, CD11b, Gr-1-todos conjugados a PE) e os anticorpos anti-Sca-1-Cy7/PE e anti-c-Kit-APC por 30 min. A porcentagem de morte celular foi verificada na população LSK. As leituras foram realizadas no citômetro de fluxo FACsCalibur (Becton Dickinson, USA) e as análises no programa WinMDi 2.8.

4.13. Análise estatística

Para os experimentos realizados na UAB (c-fos e hnCRF) realizamos o modelo linear generalizado (GzLM) com o programa SPSS (*Statistical Package for Social Sciences*) versão 16 e os fatores inter-sujeito foram estresse e tratamento. Este modelo foi selecionado pois é uma ferramenta estatística mais flexível que o ANOVA, uma vez que admite valores que foram perdidos, sem que seja necessário eliminar todos os dados do animal. Além disso, o GzLM não requer homogeneidade de variância. A determinação da significância dos efeitos estatísticos encontrados mediante este procedimento foi determinada pela prova de chi-quadrado (χ^2) de Wald usando o método de estimação da verosimilitude máxima.

Para os experimentos realizados na UNICAMP, na UNIFESP e para as análises de ACTH, corticosterona e glicose (UAB), a distribuição de todos os dados se ajustou à normalidade e se cumpriu a igualdade de variâncias, logo a análise paramétrica foi utilizada. Realizamos a análise de variância (ANOVA, one way). Considerando-se que não obtivemos efeito dos diferentes tratamentos com CV sobre os níveis basais de ACTH, corticosterona e glicose em nenhum dos tempos avaliados, analisamos somente a resposta do tratamento com CV sobre os animais estressados.

Nos casos em que houve diferença significativa, o teste de Tukey foi utilizado para testar as diferenças existentes entre todos os grupos e em todos os experimentos. Os resultados representam as médias e erros padrões dos diferentes grupos. Consideramos estatisticamente significantes os valores de $P < 0,05$.

5. Resultados

5.1 Níveis de ACTH

Os efeitos do tratamento agudo com 50 ou 200mg/kg ou crônico com 200mg/kg de CV nos níveis plasmáticos de ACTH foram medidos imediatamente após a aplicação do estressor (Graf. 1). Obsevamos que a aplicação do estressor produziu um aumento ($P < 0,001$ vs. C) nos níveis deste hormônio que foi prevenido pela dose aguda de 200mg/kg de CV ($P < 0,001$ vs. EST) ($F = 4,7$; $df = 5, 42$; $P < 0,001$).

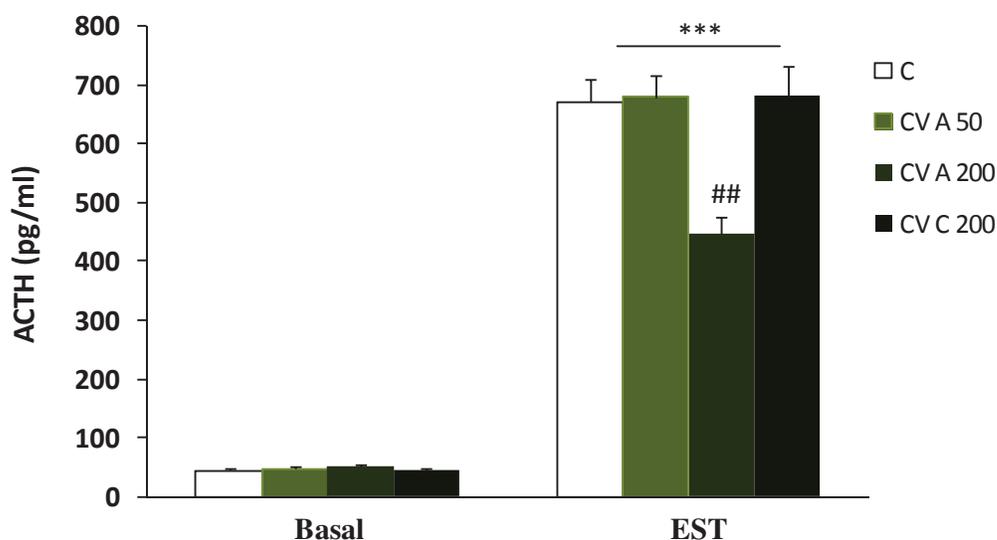


Gráfico 1: Níveis plasmáticos de ACTH de ratos submetidos ao estresse por natação forçada (EST) e pré-tratados via gavagem com diferentes doses de CV/1x ao dia. O estressor foi aplicado 24h após os tratamentos com CV e o sangue foi coletado imediatamente antes e após a aplicação do estressor. Animais controle receberam apenas o veículo. Os resultados representam a média \pm SE de 12 animais por grupo. ## $P < 0,01$ com relação ao C do grupo EST. *** $P < 0,001$ com relação aos grupos basais. ANOVA, Teste de Tukey. C: controle; CV A 50: pré-tratados com dose aguda de 50 mg/kg; CV A 200: pré-tratados com dose aguda de 200 mg/kg; CV C 200: pré-tratados por 7 dias com 200 mg/kg.

5.2 Níveis de corticosterona

Os efeitos do tratamento agudo com 50 ou 200mg/kg ou crônico com 200mg/kg de CV nos níveis plasmáticos de corticosterona foram avaliados 1h, 2h e 4h após o tratamento com CV (Graf. 2) e imediatamente antes e após a aplicação do estressor (Graf. 3). No Gráfico 2 observa-se que nenhuma das doses de CV alterou significativamente os níveis de corticosterona dos animais não-estressados em nenhum dos tempos avaliados (1h: $F=0,75$; $df=3, 28$. 2h: $F=0,56$; $df=3, 28$. 4h: $F=0,62$; $df: 3, 28$). No Gráfico 3 observa-se que o estresse produziu alterações significantes nos níveis de corticosterona ($P<0,001$ vs. C), porém, nenhuma das doses de CV usadas preveniu este efeito de forma significativa ($F=1,78$; $df= 5, 42$).

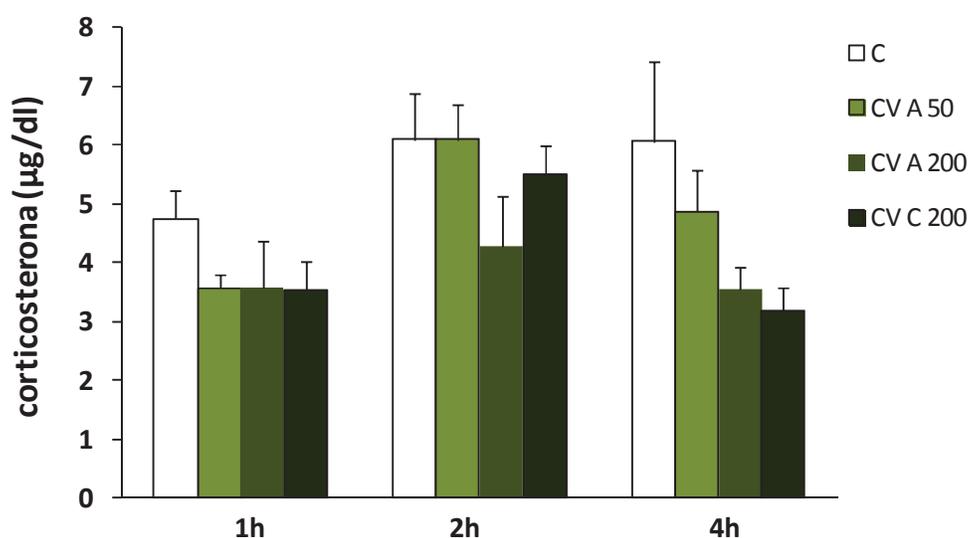


Gráfico 2: Níveis plasmáticos de corticosterona de ratos não-estressados pré-tratados via gavagem com diferentes doses de CV/1x ao dia. O sangue foi coletado 1h, 2h e 4h após tratamento. Animais controle receberam apenas o veículo. Resultados representam a média \pm SE de 12 animais por grupo. ANOVA, Teste de Tukey. C: controle; CV A 50: pré-tratados com dose aguda de 50mg/kg; CV A 200: pré-tratados com dose aguda de 200 mg/kg; CV C 200: pré-tratados por 7 dias com 200mg/kg.

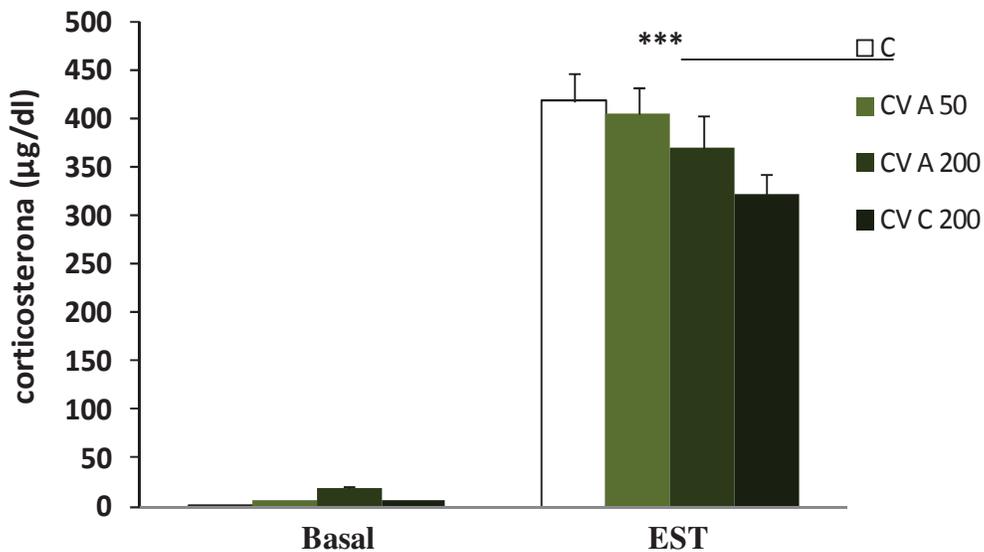


Gráfico 3: Níveis plasmáticos de corticosterona de ratos submetidos ao estresse por natação forçada (EST) e pré-tratados via gavagem com diferentes doses de CV/1x ao dia. O estressor foi aplicado 24h após os tratamentos com CV e o sangue foi coletado imediatamente antes e após a aplicação do estressor. Animais controle receberam apenas o veículo. Resultados representam a média \pm SE de 12 animais por grupo. *** $P < 0,001$ com relação aos grupos basais. ANOVA, Teste de Tukey. C: controle; CV A 50: pré-tratados com dose aguda de 50 mg/kg; CV A 200: pré-tratados com dose aguda de 200 mg/kg; CV C 200: pré-tratados por 7 dias com 200 mg/kg.

5.3 Níveis de Glicose

Os efeitos do tratamento agudo com 50 ou 200mg/kg ou crônico com 200mg/kg de CV sobre os níveis plasmáticos de glicose foram avaliados 1h, 2h e 4h após o tratamento com CV (Graf. 4) e imediatamente antes e após a aplicação do estressor (Graf. 5). No Gráfico 4 observa-se que nenhuma das doses de CV alterou significativamente os níveis de glicose dos animais não-estressados em nenhum dos tempos avaliados. No Gráfico 5 observa-se que a aplicação do estressor produziu um aumento nos níveis da glicose ($P < 0,001$ vs. C) e que os tratamentos agudo e crônico com 200 mg/kg de CV preveniu este aumento de forma parcial ($F = 12,6$; $df = 5,42$; $P < 0,001$ vs. EST).

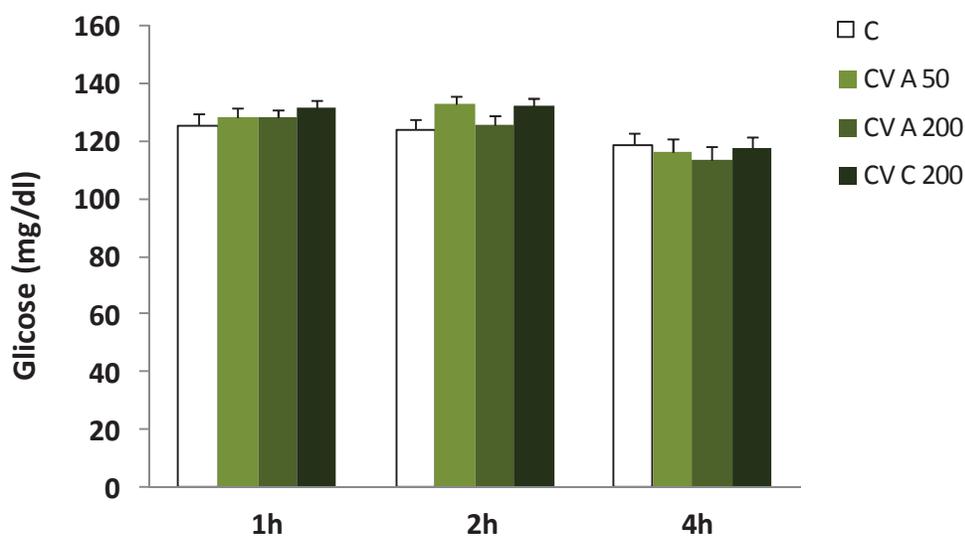


Gráfico 4: Níveis plasmáticos de glicose de ratos não-estressados e pré-tratados via gavagem com diferentes doses de CV/1x ao dia. O sangue foi coletado pela cauda 1h, 2h e 4h após tratamento. Animais controle receberam apenas o veículo. Resultados representam a média \pm SE de 12 animais por grupo. ANOVA, Teste de Tukey. C: controle; CV A 50: pré-tratados com dose aguda de 50 mg/kg; CV A 200: pré-tratados com dose aguda de 200 mg/kg; CV C 200: pré-tratados por 7 dias com 200 mg/kg.

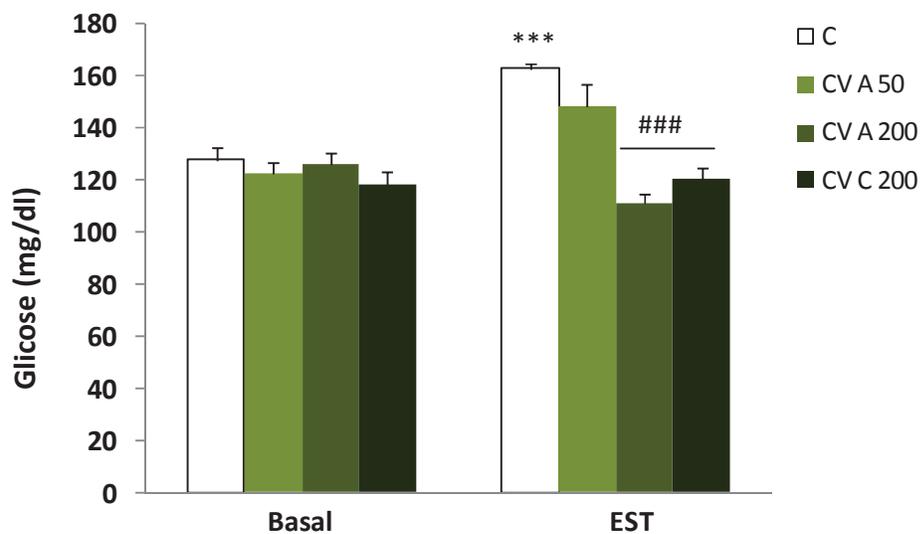


Gráfico 5: Níveis plasmáticos de glicose de ratos submetidos ao estresse por natação forçada (EST) e pré-tratados via gavagem com diferentes doses de CV/1x ao dia. O estressor foi aplicado 24h após os tratamentos com CV e o sangue foi coletado imediatamente antes e após a aplicação do estressor. Animais controle receberam apenas o veículo. Resultados representam a média \pm SE de 12 animais por grupo. ###P<0,01 com relação ao C do EST. ***P<0,001 com relação aos grupos basais. ANOVA, Teste de Tukey. C: controle; CV A 50: pré-tratados com dose aguda de 50 mg/kg; CV A 200: pré-tratados com dose aguda de 200 mg/kg; CV C 200: pré-tratados por 7 dias com 200 mg/kg.

5.4 Ativação neuronal

5.4.1 c-fos

A análise do efeito do tratamento com CV (com base nos resultados obtidos em ACTH, selecionamos a dose aguda de 200 mg/kg) sobre a expressão de c-fos em diferentes regiões cerebrais podem ser observados nos Gráficos 6-13.

No Gráfico 6 observa-se que os fatores inter-grupo (tratamento e estresse) produziram alterações significantes na expressão de c-fos em todas as subregiões do córtex pré-frontal medial (mPFC): Cingulado, Cg (Wald $X^2= 88,6$; $P<0,001$), Pré-límbica, PrL (Wald $X^2=65,4$; $P<0,001$) e Infralímbica, IF (Wald $X^2= 77,7$; $P<0,001$). A aplicação do estressor produziu um aumento na expressão de c-fos em todas as subregiões avaliadas ($P<0,001$ vs. C) e o pré-tratamento com CV preveniu este aumento de forma parcial ($P<0,001$ vs. EST). Interessante observar que o tratamento com CV dos animais não-estressados produziu um aumento na expressão de c-fos nas três subregiões de animais não-estressados, porém esse aumento só foi significativo na região IF ($P<0,05$ vs. C).

mPFC

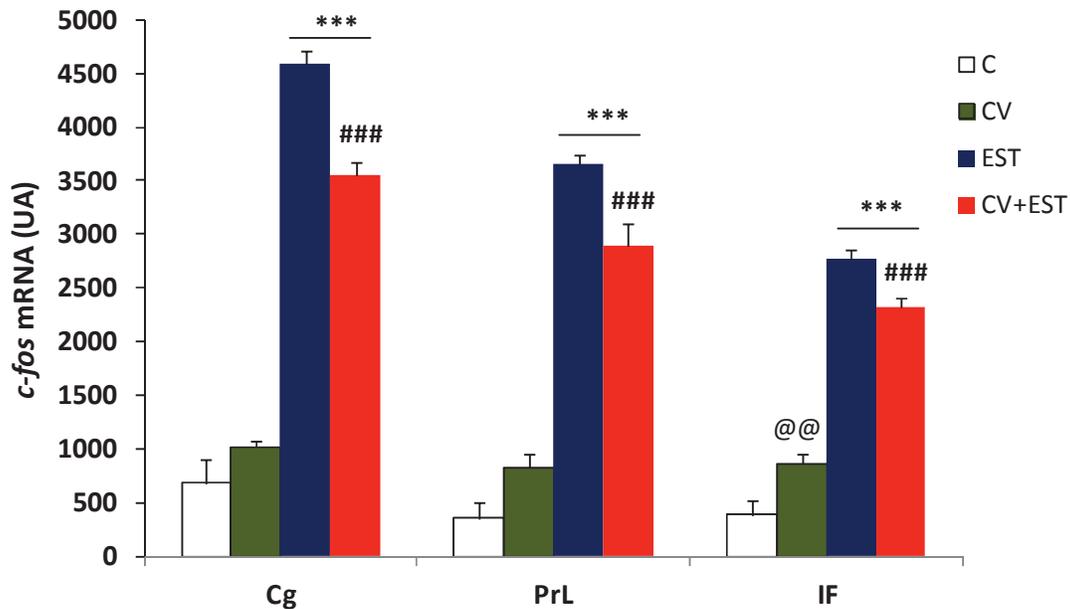


Gráfico 6: Quantificação dos níveis de mRNA de c-fos no córtex pré-frontal medial (Cg, PrL e IF) de ratos submetidos ao estresse por natação forçada (EST) e pré-tratados via gavagem com CV (dose aguda de 200 mg/kg/1x ao dia). O estresse foi aplicado 24h após o tratamento e os cérebros foram removidos imediatamente após a aplicação do estressor. Animais controle receberam apenas o veículo. Resultados representam a média \pm SE de unidades arbitrárias (UA) de 12 animais por grupo. *** $P < 0,001$ com relação a C e CV. ### $P < 0,001$ com relação a EST. @@ $P < 0,001$ com relação a C. GzLM, Teste de Tukey. C: controle; CV: pré-tratados com CV; EST: submetidos ao estresse; CV+EST: pré-tratados com CV e submetidos ao estresse.

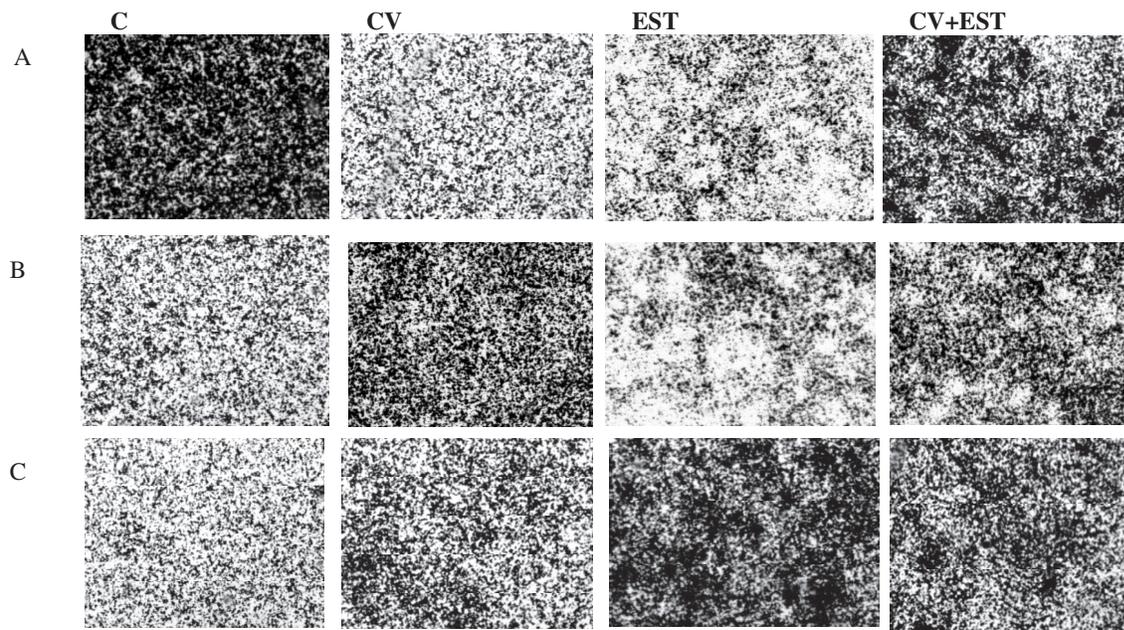


Figura 7: Imagens representativas da expressão de c-fos detectada por hibridização in situ radioativa das subregiões A: Cg; B: PrL e C: IL do mPFC de ratos tratados com CV (dose aguda de 200 mg/kg) e submetidos ao estresse por natação forçada. C: controle; CV: pré-tratados com CV; EST: submetidos ao estresse; CV+EST: pré-tratados com CV e submetidos ao estresse.

No Gráfico 7 observa-se que os fatores inter-grupo (tratamento e estresse) produziram alterações significativas na expressão de c-fos no septum lateral ventral (LSv) (Wald $X^2= 66,5$; $P<0,001$). O tratamento com CV dos animais não-estressados não alterou a expressão de c-fos nesta região. O estresse produziu um aumento neste parâmetro ($P<0,001$ vs. C) e o pré-tratamento com CV reduziu este aumento de forma parcial ($P<0,001$ vs. EST).

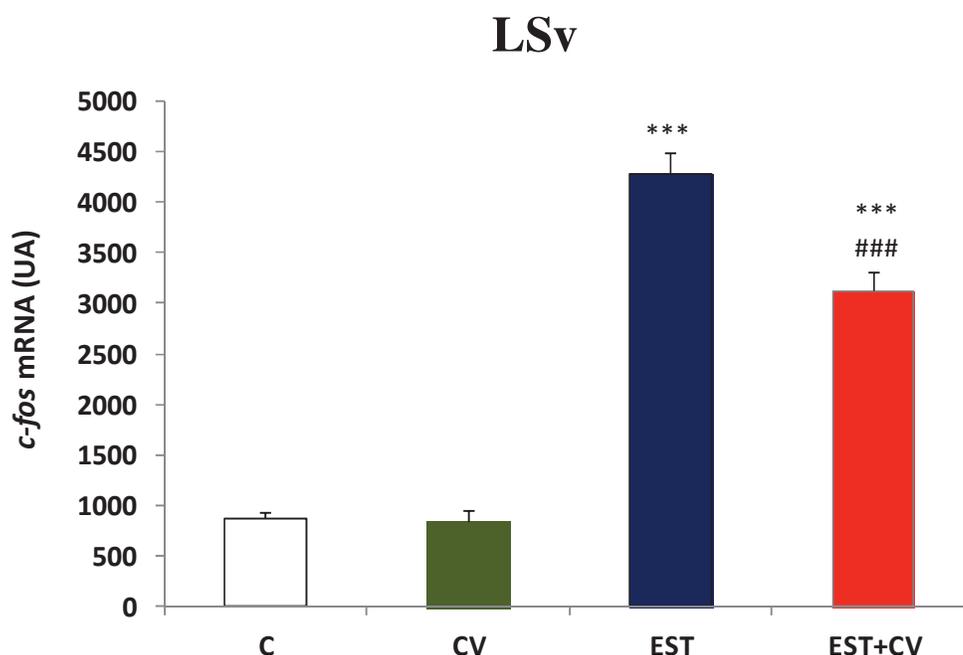


Gráfico 7: Quantificação dos níveis de mRNA de c-fos na região ventral do septum Lateral de ratos submetidos ao estresse por natação forçada (EST) e pré-tratados via gavagem com CV (dose aguda de 200 mg/kg/1x ao dia). O estresse foi aplicado 24h após o tratamento e os cérebros foram removidos imediatamente após a aplicação do estressor. Animais controle receberam apenas o veículo. Resultados representam a média \pm SE de unidades arbitrárias (UA) de 12 animais por grupo. *** $P<0,001$ com relação a C e CV. ### $P<0,001$ com relação a EST. GzLM, Teste de Tukey. C: controle; CV: pré-tratados com CV; EST: submetidos ao estresse; CV+EST: pré-tratados com CV e submetidos ao estresse.

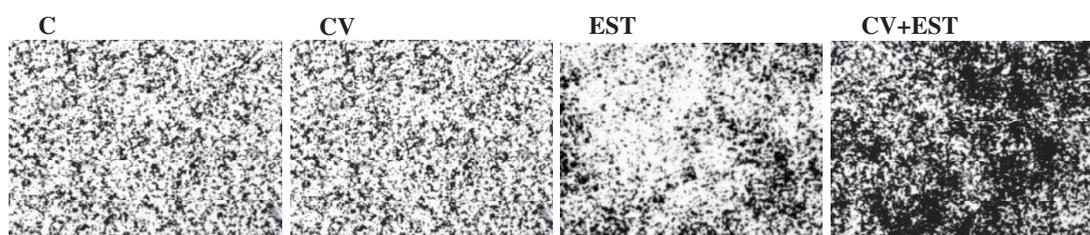


Figura 8: Imagens representativas da expressão de c-fos detectada por hibridização in situ radioativa no LSv de ratos tratados com CV (dose aguda de 200 mg/kg) e submetidos ao estresse por natação forçada. C: controle; CV: pré-tratados com CV; EST: submetidos ao estresse; CV+EST: pré-tratados com CV e submetidos ao estresse.

No Gráfico 8 observa-se que os fatores inter-grupo (tratamento e estresse) produziram alterações significantes na expressão de c-fos nas regiões magnocelular (mPVN) (Wald $X^2= 36,4$; $P<0,001$) e parvocelular medial dorsal (mpdPVN) (Wald $X^2= 65,5$; $P<0,001$) do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN). O tratamento com CV dos animais não-estressados não alterou a expressão de c-fos em nenhuma das subregiões avaliadas. O estresse aumentou este parâmetro em ambas as regiões, porém de forma mais intensa na região parvocelular ($P<0,001$ vs. C). O pré-tratamento com CV preveniu este aumento, de forma parcial, apenas na região parvocelular ($P<0,01$ vs. EST).

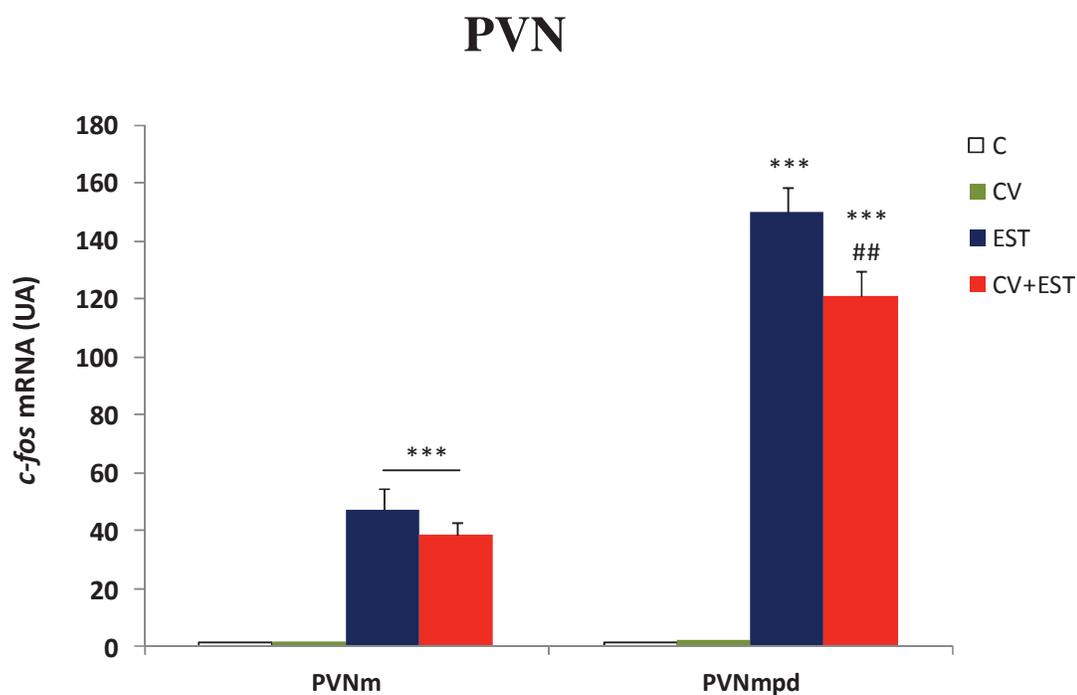


Gráfico 8: Quantificação dos níveis de mRNA de c-fos no Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (regiões magnocelular e parvocelular medial dorsal) de ratos submetidos ao estresse por natação forçada (EST) e pré-tratados via gavagem com CV (dose aguda de 200 mg/kg/1x ao dia). O estresse foi aplicado 24h após o tratamento e os cérebros foram removidos imediatamente após a aplicação do estressor. Animais controle receberam apenas o veículo. Resultados representam a média \pm SE de unidades arbitrárias (UA) de 12 animais por grupo. *** $P<0,001$ com relação a C e CV. ## $P<0,01$ com relação a EST. GzLM, Teste de Tukey. C: controle; CV: pré-tratados com CV; EST: submetidos ao estresse; CV+EST: pré-tratados com CV e submetidos ao estresse.

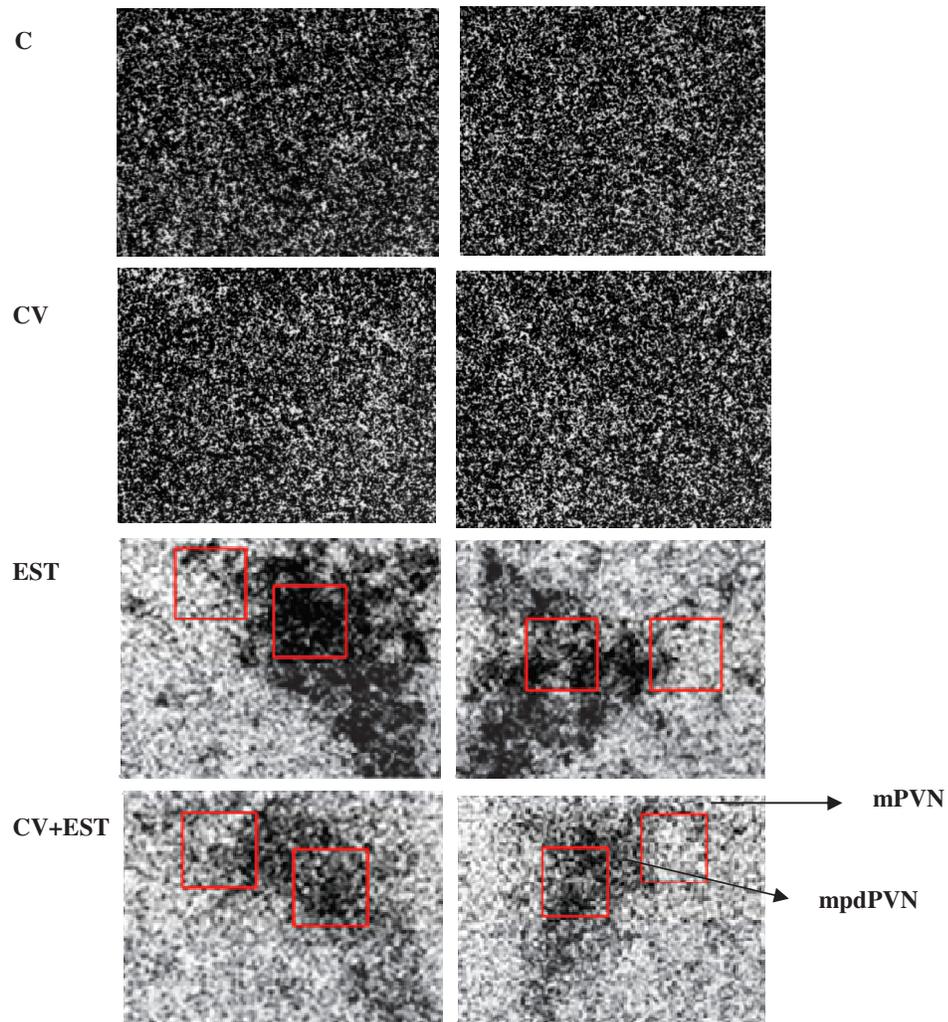


Figura 9: Imagens representativas da expressão de c-fos detectada por hibridização in situ radioativa no mPVN e mpdPVN de ratos tratados com CV (dose aguda de 200 mg/kg) e submetidos ao estresse por natação forçada. Os quadrados em vermelho representam a área quantificada, a qual foi a mesma para a análise de todas as imagens. C: controle; CV: pré-tratados com CV; EST: submetidos ao estresse; CV+EST: pré-tratados com CV e submetidos ao estresse.

No Gráfico 9 observa-se que os fatores inter-grupo (tratamento e estresse) produziram alterações significativas na expressão de c-fos nas regiões dorsal (DRd) (Wald $X^2= 31,7$; $P<0,001$) e ventral (DRv) (Wald $X^2= 46,9$; $P<0,001$) do núcleo dorsal da Raphe (DR). O tratamento com CV dos animais não-estressados não alterou a expressão de c-fos nesta região. O estresse aumentou este parâmetro em ambas as regiões avaliadas (dorsal e ventral) ($P<0,001$ vs. C), e este aumento foi prevenido, de forma total, pelo pré-tratamento com CV ($P<0,001$ vs. EST).

DR

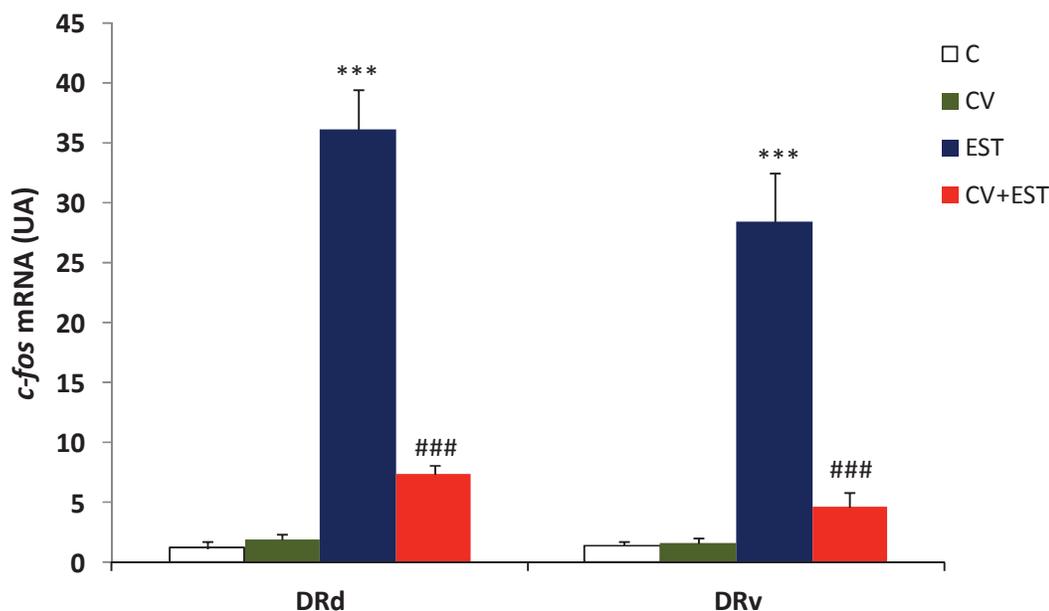


Gráfico 9: Quantificação dos níveis de mRNA de c-fos no Núcleo Dorsal da Raphe (subregiões dorsal e ventral) de ratos submetidos ao estresse por natação forçada (EST) e pré-tratados via gavagem com CV (dose aguda de 200 mg/kg/1x ao dia). O estresse foi aplicado 24h após o tratamento e os cérebros foram removidos imediatamente após a aplicação do estressor. Animais controle receberam apenas o veículo. Resultados representam a média \pm SE de unidades arbitrárias (UA) de 12 animais por grupo. *** $P<0,001$ com relação a C e CV. ### $P<0,001$ com relação a EST. GzLM, Teste de Tukey. C: controle; CV: pré-tratados CV; EST: submetidos ao estresse; CV+EST: pré-tratados com CV e submetidos ao estresse.

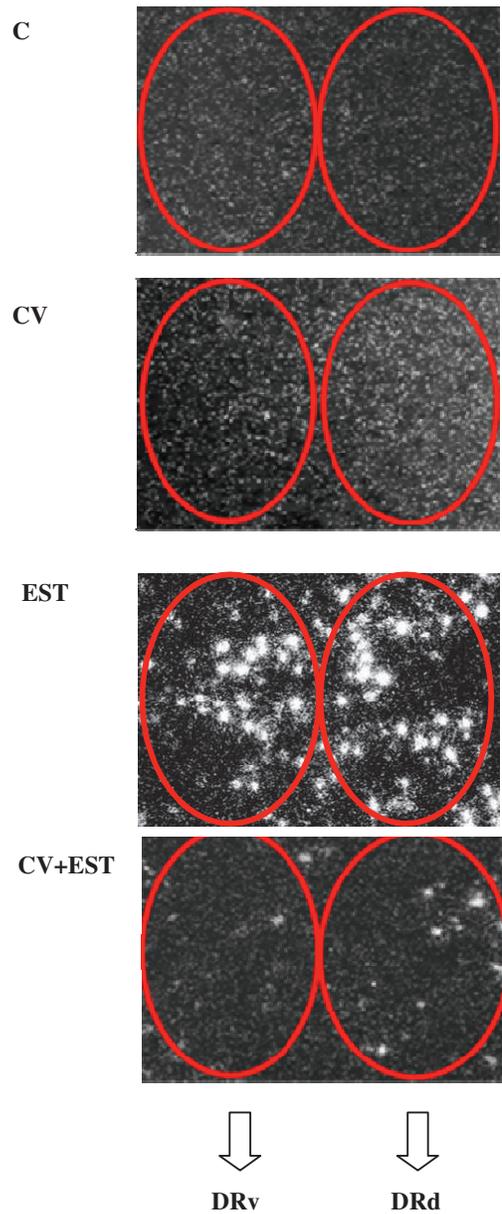


Figura 10: Imagens representativas da expressão de c-fos avaliada por hibridização in situ radioativa no DRd e DRv de ratos tratados com CV (dose aguda de 200 mg/kg) e submetidos ao estresse por natação forçada. Os círculos em vermelho representam a área quantificada, a qual foi a mesma para a análise de todas as imagens. C: controle; CV: pré-tratados com CV; EST: submetidos ao estresse; CV+EST: pré-tratados com CV e submetidos ao estresse.

No Gráfico 10 observa-se que os fatores inter-grupo (tratamento e estresse) produziram alterações significantes na expressão de c-fos no Locus coeruleus (LC) (Wald $X^2= 60,4$; $P<0,001$). O tratamento com CV dos animais não-estressados não alterou a expressão de c-fos nesta região. O estresse produziu um aumento neste parâmetro ($P<0,001$ vs. C) e o pré-tratamento com CV preveniu este aumento de forma parcial ($P<0,001$ vs. EST).

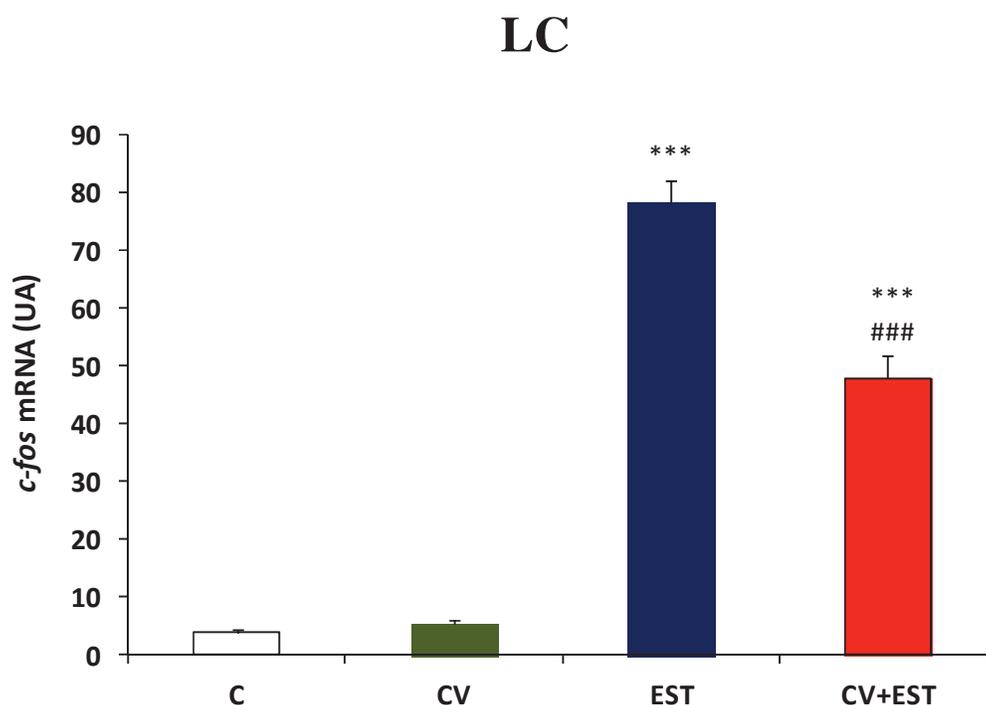


Gráfico 10: Quantificação dos níveis de mRNA de c-fos no Locus Coeruleus (LC) de ratos submetidos ao estresse por natação forçada (EST) e pré-tratados via gavagem com CV (dose aguda de 200mg/kg/1x ao dia. O estresse foi aplicado 24h após o tratamento e os cérebros foram removidos imediatamente após a aplicação do estressor. Animais controle receberam apenas o veículo. Resultados representam a média \pm SE de unidades arbitrárias (UA) de 12 animais por grupo. *** $P<0,001$ com relação a C e CV. ### $P<0,001$ com relação a EST. GzLM, Teste de Tukey. C: controle; CV: pré-tratados com CV; EST: submetidos ao estresse; CV+EST: pré-tratados com CV e submetidos ao estresse.

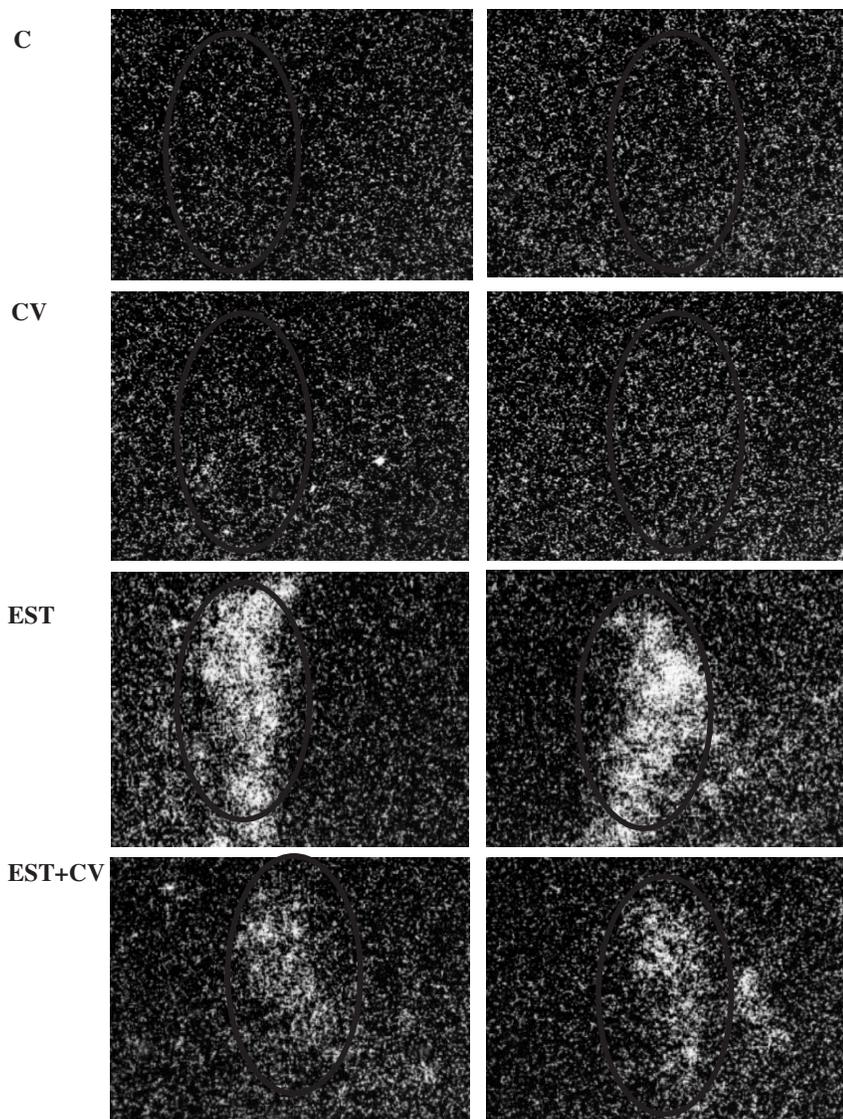


Figura 11: Imagens representativas da expressão de c-fos no LC de ratos tratados com CV (dose aguda de 200 mg/kg) e submetidos ao estresse por natação forçada. C: controle; CV: pré-tratados com CV; EST: submetidos ao estresse; CV+EST: pré-tratados com CV e submetidos ao estresse.

5.4.2 hnCRF

No Gráfico 11 observa-se que os fatores inter-grupo (tratamento e estresse) produziram alterações significantes na expressão do gen de hnCRF na região parvocelular medial dorsal do núcleo paraventricular do hipotálamo, mpdPVN (Wald $X^2= 40,7$; $P<0,001$). O tratamento com CV dos animais não-estressados não alterou a expressão de hnCRF. A aplicação do estresse por natação forçada (EST) produziu um aumento na expressão do gen de hnCRF ($P<0,001$ vs. C), que foi totalmente prevenido pelo pré-tratamento com CV ($P<0,001$ vs. EST).

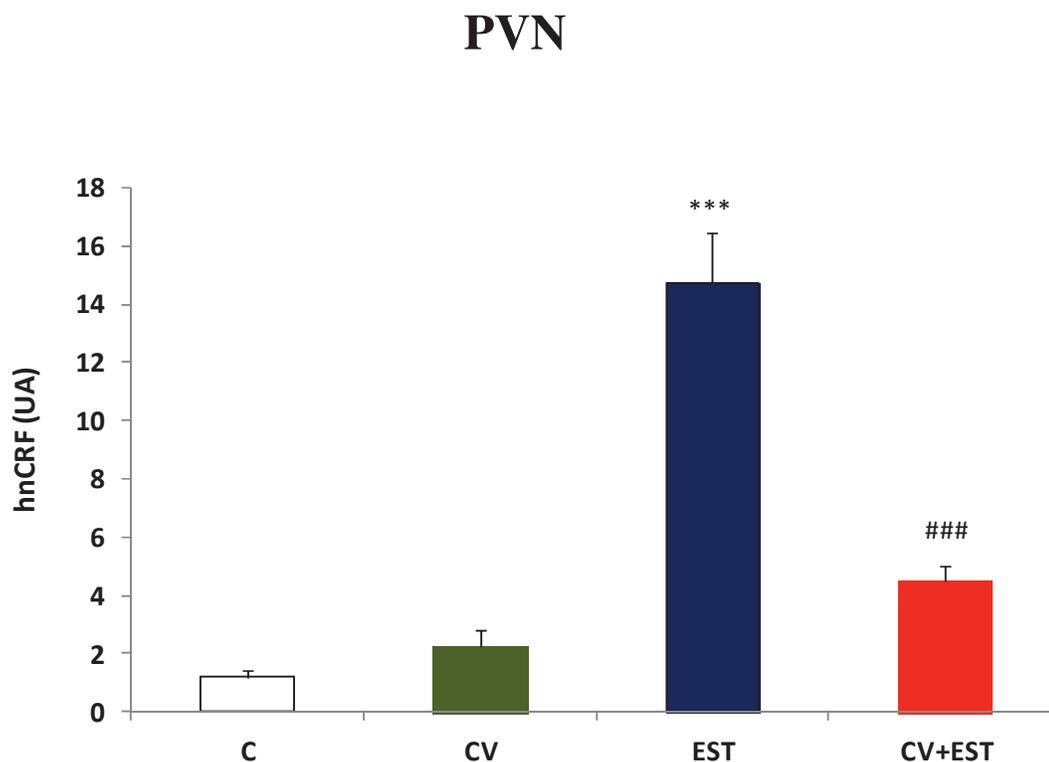


Gráfico 11: Quantificação dos níveis de mRNA de hnCRF na região parvocelular medial dorsal do Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (mpdPVN) de ratos submetidos ao estresse por natação forçada (EST) e pré-tratados via gavagem com a dose aguda de 200mg/kg de CV/1x ao dia. O cérebro foi retirado por perfusão 24 horas após o tratamento e imediatamente após o estresse. Animais controle receberam apenas o veículo. Resultados representam a média \pm SE de unidades arbitrárias (UA) de 12 animais por grupo.*** $P<0,001$ com relação a C e CV. ### $P<0,001$ com relação a EST. GzLM, Teste de Tukey. C: controle; CV: pré-tratados com CV; EST: estresse; CV+EST: pré-tratados com CV e submetidos ao estresse.

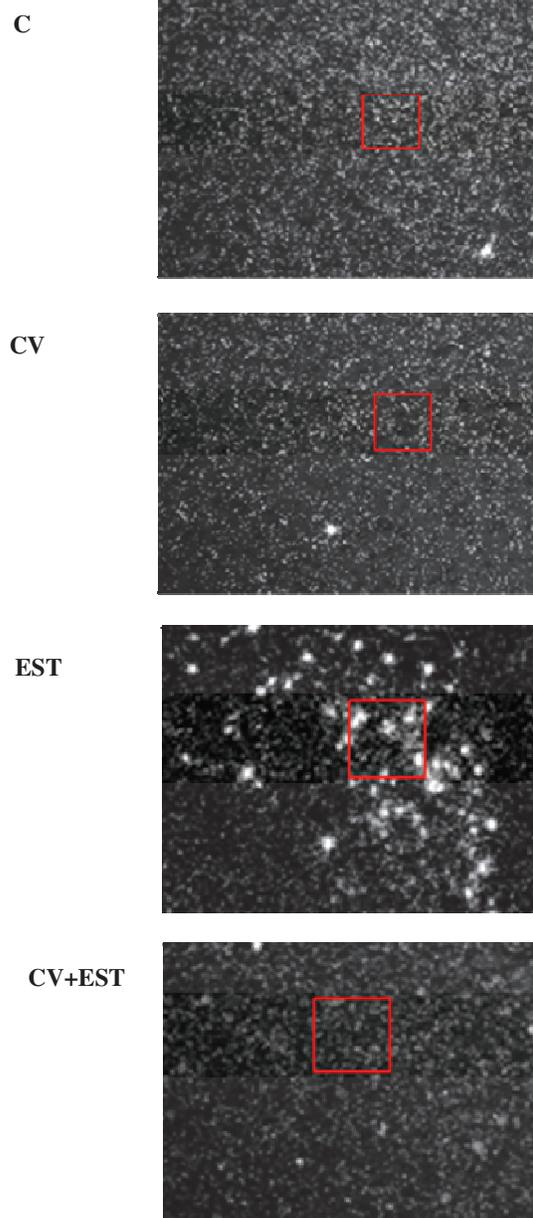


Figura 12: Imagens representativas da expressão de hnCRF detectada por hibridização in situ radioativa no PVN de ratos tratados com CV (dose aguda de 200 mg/kg) e submetidos ao estresse por natação forçada. C: controle; CV: pré-tratados com CV; EST: submetidos ao estresse; CV+EST: pré-tratados com CV e submetidos ao estresse.

5.5 Mielopoese medular

Os próximos experimentos foram realizados em camundongos Balb/c e a CV foi administrada por 5 dias previamente à aplicação do estressor (contenção em tubos) na dose de 50 mg/kg, 1x ao dia.

Os efeitos do tratamento com CV sobre o número de CFU-GM de animais submetidos ao estresse (EST) podem ser observados no Gráfico 12. Observamos que os fatores inter-grupo (tratamento e estresse) produziram alterações significantes no número de CFU-GM ($F=20,1$; $df=5,30$; $P<0,001$). A aplicação do estresse causou uma redução no número de CFU-GM ($P<0,001$ vs. C) e o pré-tratamento com CV preveniu esta redução, mantendo estes números equivalentes aos observado no grupo controle. O tratamento dos animais não-estressados com CV não produziu qualquer alteração no número de CFU-GM da medula óssea.

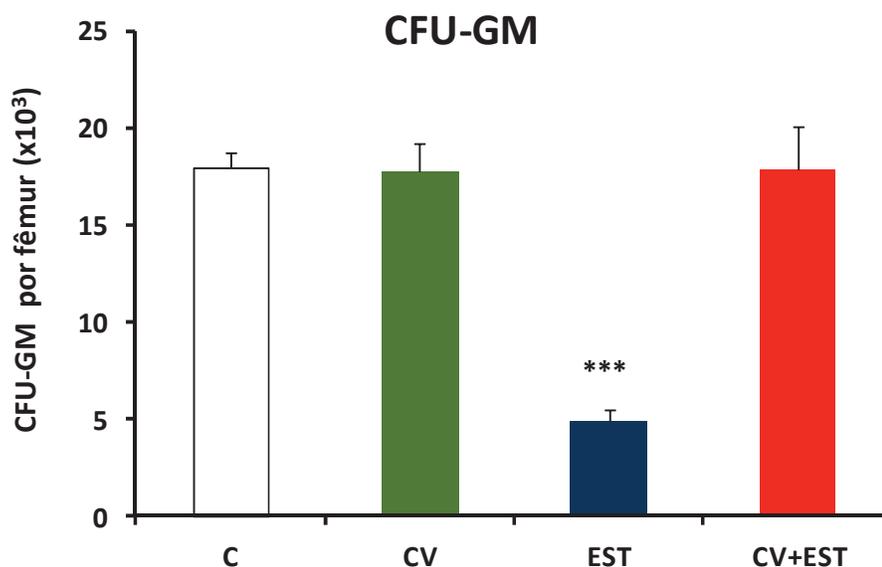


Gráfico 12: Crescimento e diferenciação de precursores para granulócitos e macrófagos (CFU-GM) por fêmur de camundongos submetidos ao estresse por contenção (EST). Os animais foram pré-tratados via gavagem com CV (50mg/Kg por 5 dias/1x ao dia). Os animais foram estressados 24h após o último tratamento e sacrificados 2h após a aplicação do estressor. Animais controle receberam apenas o veículo. Resultados representam a média \pm SE de 6 animais por grupo. ANOVA, Teste de Tukey. *** $P<0,001$ com relação a todos os outros grupos. C: controle; CV: pré-tratados com CV; EST: submetidos ao estresse e CV+EST: pré-tratados com CV e submetidos ao estresse.

5.6 Atividade estimuladora de colônia (CSA)

Os efeitos do tratamento com CV sobre a atividade estimuladora de colônias do soro de animais submetidos ao estresse estão demonstrados no Gráfico 13. Observamos que os fatores inter-grupo (tratamento e estresse) produziram alterações significantes nos níveis de CSA ($F=205,2$; $df=5,30$; $P<0,001$).

A aplicação do estressor por contenção (EST) aumentou significamente o CSA, alcançando níveis 7 vezes maiores que os observados no grupo controle. O tratamento dos animais estressados com CV proporcionou um aumento ainda maior nos níveis de CSA (1.2 vezes, $P<0,001$ vs. EST). O tratamento dos animais não-estressados com CV produziu um aumento no CSA (2 vezes, $P<0,05$ vs. Controle).

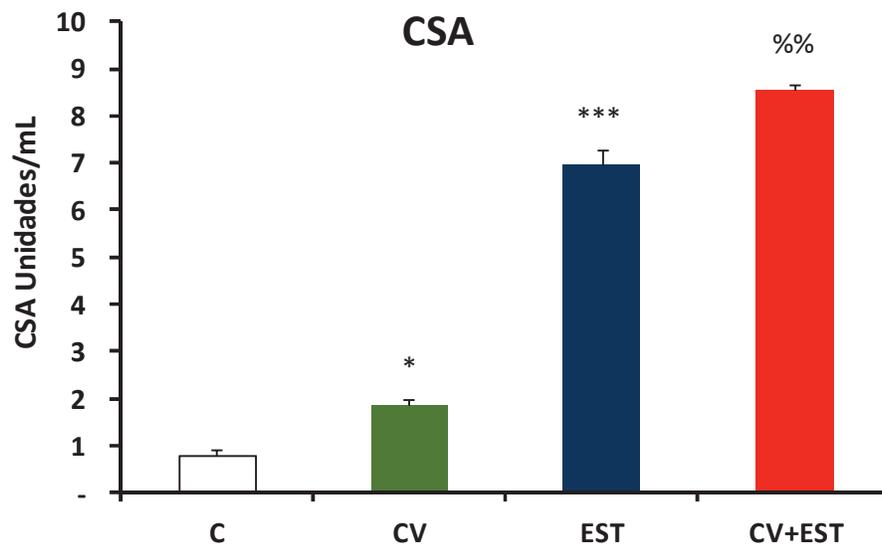


Gráfico 13: Capacidade estimuladora de colônias do soro (CSA) de camundongos submetidos ao estresse por contenção (EST). Os animais foram pré-tratados via gavagem com CV 50mg/Kg por 5 dias/1x ao dia. Os animais foram estressados 24h após o último tratamento e sacrificados 2h após a aplicação do estressor. Animais controle receberam apenas o veículo. Resultados representam a média \pm SE de 6 animais por grupo. ANOVA, Teste de Tukey. * $P<0,05$ com relação ao C; *** $P<0,001$ com relação ao C; %% $P<0,01$ com relação a EST. C: controle; CV: Tratados com CV; EST: submetidos ao estresse e CV+EST: pré-tratados com CV e submetidos ao estresse.

5.7 Imunofenotipagem das células da medula óssea

Os efeitos do tratamento com CV nos linfócitos B (B 220+) e T (CD3+), células mieloides maduras (Gr1⁺/Mac1⁺) e no número de progenitores hematopoéticos (HP, CKit⁺Sca-1⁻) na medula óssea de animais submetidos ao estresse por contenção (EST) estão demonstrados nos Gráficos 14-17. Observamos que os fatores inter-grupo (tratamento e estresse) produziram alterações significantes no número de linfócitos B (F=109,7; df=5,12; P<0,001), linfócitos T (F=19,5; df=5,12; P<0,001), células mieloides maduras (F=40,3; df=5,30; P<0,001) e progenitores hematopoéticos (F=32; df=5,12; P<0,001)

Observamos que a aplicação do estressor diminuiu o número de linfócitos B e T (P<0,001 vs. C) (Grafs. 14 e 15), de células mieloides maduras (Graf. 16) e de progenitores hematopoéticos (Graf. 17) (P<0,001 vs. C). O tratamento com CV preveniu totalmente as reduções causadas pela aplicação do estressor em todas as populações avaliadas, mantendo-se o número de células no nível do observado no grupo controle.

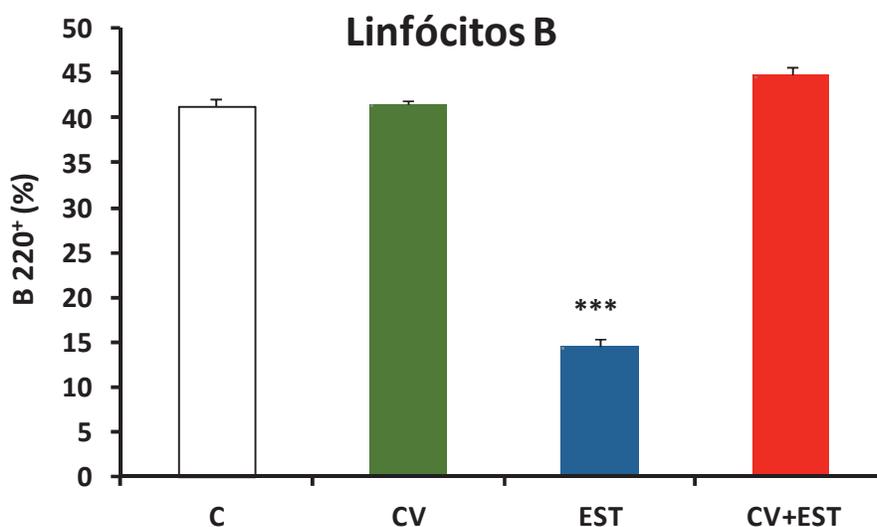


Gráfico 14: Número Linfócitos B por fêmur de camundongos submetidos ao estresse por contenção (EST). Os animais foram pré-tratados via gavagem com CV (50mg/Kg por 5 dias /1x ao dia). Os animais foram estressados 24h após o último tratamento e sacrificados 2h após a aplicação do estressor. Animais controle receberam apenas o veículo. Resultados representam a média \pm SE de 6 animais por grupo. ANOVA, Teste de Tukey. ***P<0,001 com relação a todos os outros grupos. C: controle; CV: pré-tratados com CV; EST: submetidos ao estresse e CV+EST: pré-tratados com CV e submetidos ao estresse.

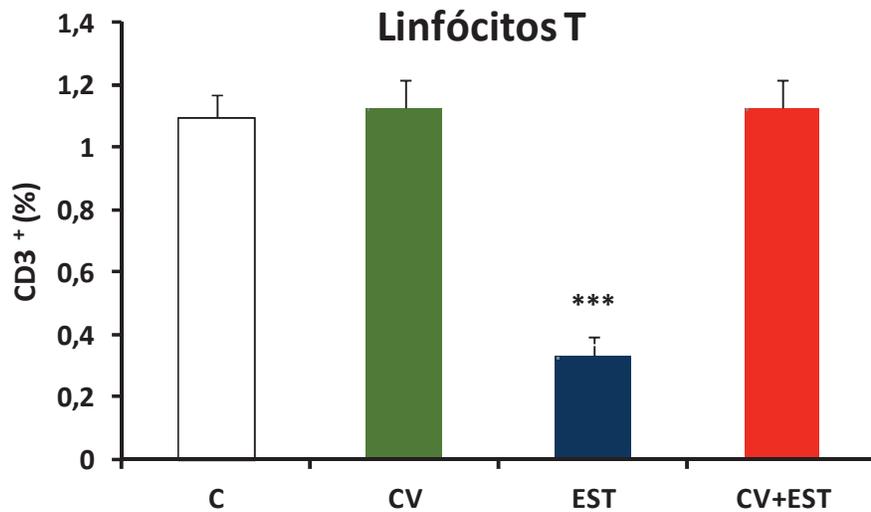


Gráfico 15: Número Linfócitos T por fêmur de camundongos submetidos ao estresse por contenção (EST). Os animais foram pré-tratados via gavagem com CV (50 mg/Kg por 5 dias /1x ao dia). Os animais foram estressados 24h após o último tratamento e sacrificados 2h após a aplicação do estressor. Animais controle receberam apenas o veículo. Resultados representam a média \pm SE de 6 animais por grupo. ANOVA, Teste de Tukey. *** $P < 0,001$ com relação a todos os outros grupos. C: controle; CV: pré-tratados com CV; EST: submetidos ao estresse e CV+EST: pré-tratados com CV e submetidos ao estresse.

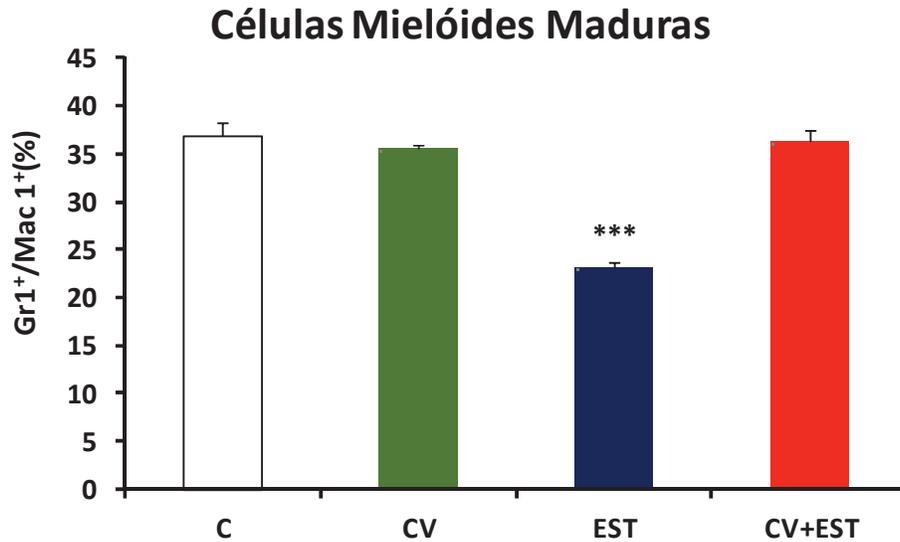


Gráfico 16: Número de células mielóides maduras por fêmur de camundongos submetidos ao estresse por contenção (EST). Os animais foram pré-tratados via gavagem com CV (50mg/Kg por 5 dias/1x ao dia). Os animais foram estressados 24h após o último tratamento e sacrificados 2h após a aplicação do estressor. Animais controle receberam apenas o veículo. Resultados representam a média \pm SE de 6 animais por grupo. ANOVA, Teste de Tukey. *** $P < 0,001$ com relação a todos os outros grupos. C: controle; CV: pré-tratados com CV; EST: submetidos ao estresse e CV+EST: pré-tratados com CV e submetidos ao estresse.

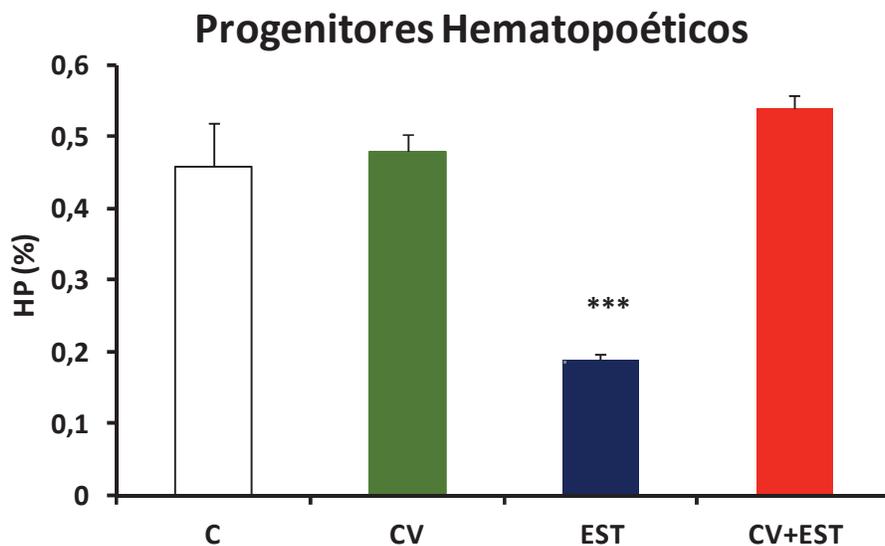


Gráfico 17: Número progenitores hematopoéticos (HP, Ckit⁺Sca1⁺) no fêmur de camundongos submetidos ao estresse por contenção (EST). Os animais foram pré-tratados via gavagem com CV (50mg/Kg por 5 dias /1x ao dia). Os animais foram estressados 24h após o último tratamento e sacrificados 2h após a aplicação do estressor. Animais controle receberam apenas o veículo. Resultados representam a média ± SE de 6 animais por grupo. ANOVA, Teste de Tukey. ***P<0,001 com relação a todos os outros grupos. C: controle; CV: pré-tratados com CV; EST: submetidos ao estresse e CV+EST: pré-tratados com CV e submetidos ao estresse.

5.8 Morte celular

O efeito do tratamento com CV sobre a morte celular na população de células tronco-hematopoéticas (LSK) de animais estressados está apresentado no Gráfico 18. Observamos que os fatores inter-grupo (tratamento e estresse) produziram alterações significantes sobre a morte celular ($F=47,5$; $df=5,12$; $P<0,001$). O estresse por contenção (EST) aumentou significamente a morte celular ($P<0.001$ vs. C). O tratamento com CV destes animais não só preveniu este aumento, como reduziu este parâmetro para níveis inferiores aos do grupo controle ($P<0.05$ vs. C). O tratamento com CV dos animais não-estressados não produziu alterações significantes na morte celular.

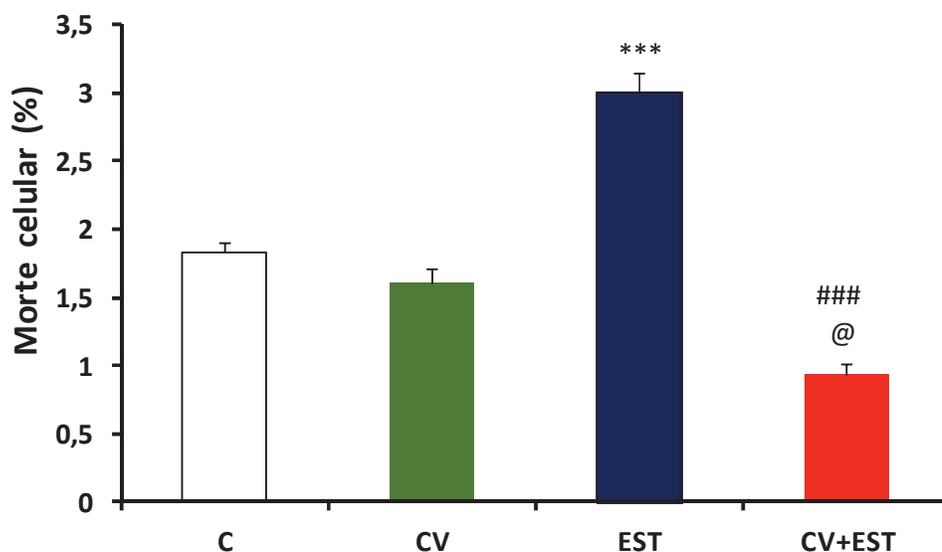


Gráfico 18: Morte celular na população LSK no fêmur de camundongos submetidos ao estresse por contenção (EST). Os animais foram pré-tratados via gavagem com CV (50mg/Kg por 5 dias /1x ao dia. Os animais foram estressados 24h após o último tratamento e sacrificados 2h após a aplicação do estressor. Animais controle receberam apenas o veículo. Resultados representam a média \pm SE de 6 animais por grupo. ANOVA, Teste de Tukey. *** $P<0,001$ com relação a C. ### $P<0,001$ com relação a EST. @ $P<0,05$ com relação a CV. C: controle; CV: pré-tratados com CV; EST: submetidos ao estresse e CV+EST: pré-tratados com CV e submetidos ao estresse.

5.9 Cultura Líquida de Longa Duração

5.9.1 Número total de unidades formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos (CFU-GM) na suspensão de células não-aderentes da LT BMC.

O número de CFU-GM no sobrenadante de LT BMC de camundongos dos grupos controle, estressados e tratados com CV foi avaliado semanalmente desde a 5ª até a 9ª semana de incubação. Estes resultados podem ser observados no Gráfico 19. Observamos que os fatores inter-grupo (tratamento e estresse) produziram alterações significantes no número de CFU-GM na LT BMC (5ª semana: $F=33,3$; $df: 5,12$; 6ª semana: $F=35,7$; $df: 5,12$; 7ª semana: $F=84$; $df: 5,12$; 8ª semana: $F=90,7$; $df: 5,12$; 9ª semana: $F=73,9$; $df: 5,12$; $P<0,001$). Na 5ª semana observamos que um pico no número de CFU-GM foi produzido como consequência da repopulação. O tratamento com CV não alterou a produção de progenitores comprometidos com as linhagens granulocítica e macrofágica nos animais do grupo controle. Por outro lado, na LT BMC de camundongos estressados, a característica fundamental observada foi o dano à capacidade de suportar o crescimento e diferenciação destes progenitores, chegando o número de CFU-GM a ser 4 vezes menor que o do grupo controle ($P<0,001$). Entretanto, quando estes animais foram pré-tratados com CV (50 mg/Kg por 5 dias) os números de CFU-GM foram mantidos nos mesmos níveis do grupo controle em todos os intervalos estudados.

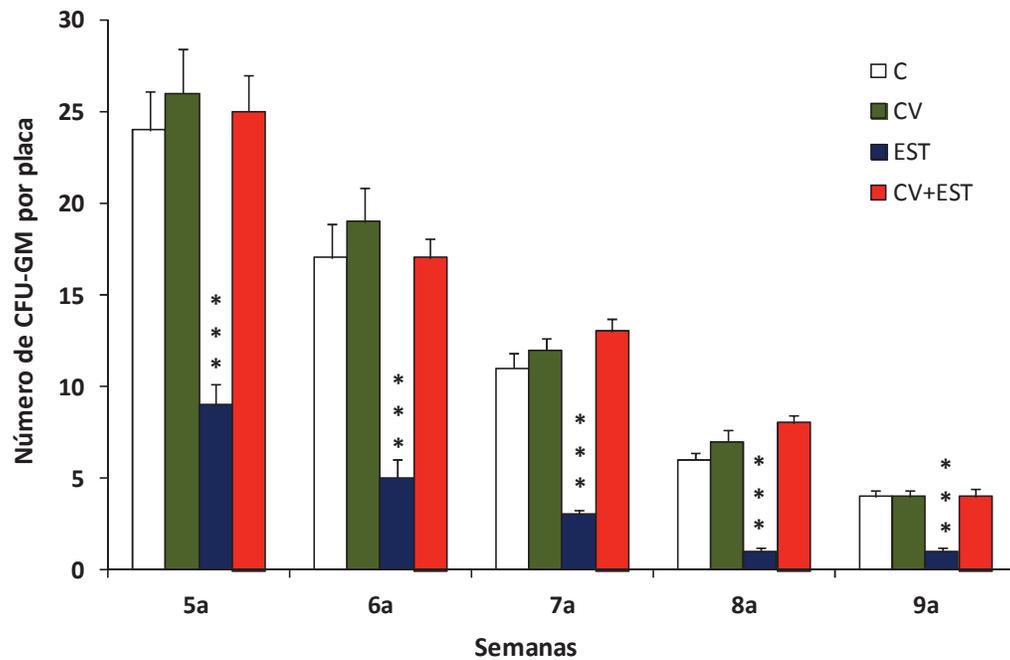
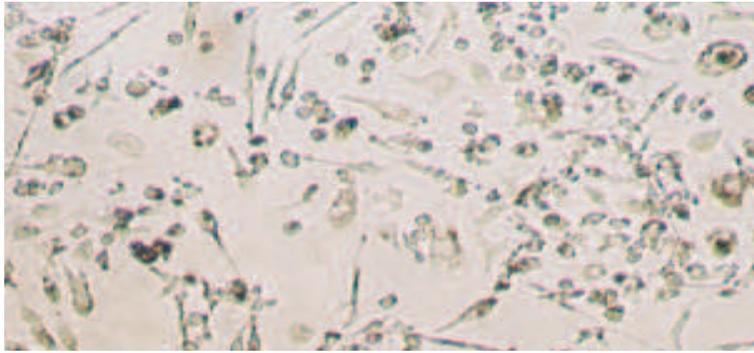
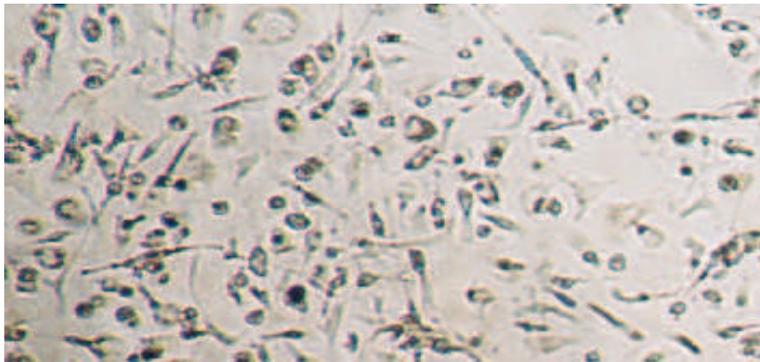


Gráfico 19: Número total de progenitores CFU-GM na suspensão de células não-aderentes de LTBM de camundongos submetidos ao estresse por contenção (EST). Os animais foram pré-tratados via gavagem com CV (50mg/Kg por 5 dias/1x ao dia). Animais controle receberam apenas o veículo. Resultados representam a média \pm SE da triplicata do “pool” da suspensão coletada de 5 frascos por grupo. ANOVA, Teste de Tukey. ***P<0,001 com relação ao controle. ###P<0,001 com relação ao EST. C: controle; CV: pré-tratados com CV; EST: submetidos ao estresse e CV+EST: pré-tratados com CV e submetidos ao estresse.

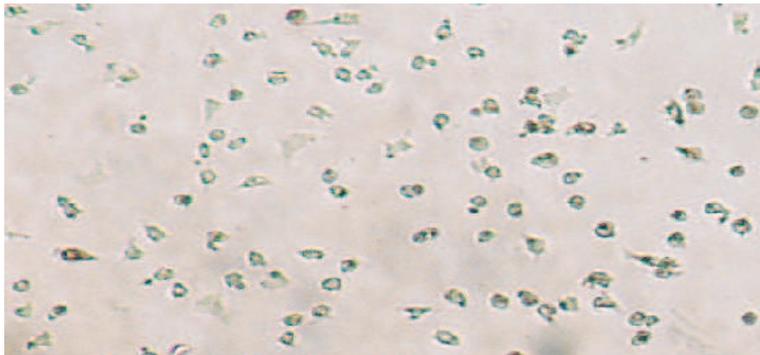
C



CV



EST



CV+EST

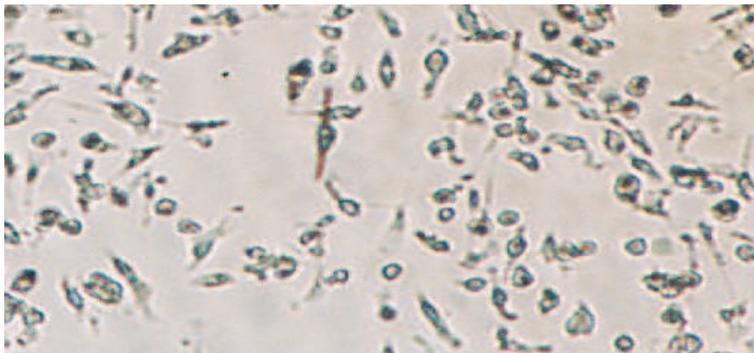


Figura 13: Aspecto microscópico da Cultura Líquida de Longa Duração da Medula Óssea de camundongos tratados com CV (50 mg/kg por 5 dias) e submetidos ao estresse por contenção. C: controle; CV: pré-tratados com CV; EST: submetidos ao estresse; CV+EST: pré-tratados com CV e submetidos ao estresse. Aumento de 20x.

5.9.2 Imunofenotipagem de células da LT BMC

Os efeitos do tratamento com CV em células mieloides maduras ($\text{Gr1}^+/\text{Mac1}^+$) e no número de progenitores hematopoéticos (HP, $\text{Ckit}^+\text{Sca-1}^-$) na LT BMC de animais submetidos ao estresse por contenção (EST) estão demonstrados nos Gráficos 20 e 21. Observamos que os fatores inter-grupo (tratamento e estresse) produziram alterações significantes no número de células mieloides maduras ($F=23,9$; $df=5,6$; $P<0,001$) e progenitores hematopoéticos ($F=23,9$; $df=5,6$; $P<0,001$). O estresse reduziu tanto o número de $\text{Gr1}^+/\text{Mac1}^+$ (Graf. 20) como o de HP (Graf. 21) ($P<0,001$ vs. C). O tratamento com CV (50 mg/kg) preveniu esta redução causada pelo estresse, mantendo-se o número de células de ambas populações semelhante aquele medido no grupo controle.

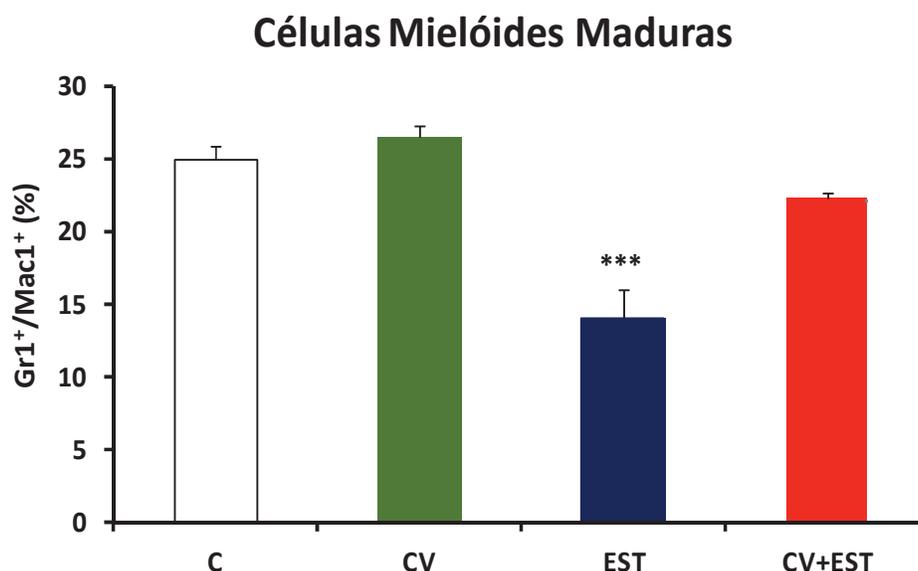


Gráfico 20: Número células mieloides maduras ($\text{Gr1}^+/\text{Mac1}^+$) na LT BMC de camundongos submetidos ao estresse por contenção (EST). Os animais foram pré-tratados via gavagem com CV (50 mg/Kg por 5 dias /1x ao dia). Animais controle receberam apenas o veículo. Resultados representam a média \pm SE de 6 animais por grupo. ANOVA, Teste de Tukey. *** $P<0,001$ com relação a todos os outros grupos. C: controle; CV: pré-tratados com CV; EST: submetidos ao estresse e CV+EST: pré-tratados com CV e submetidos ao estresse.

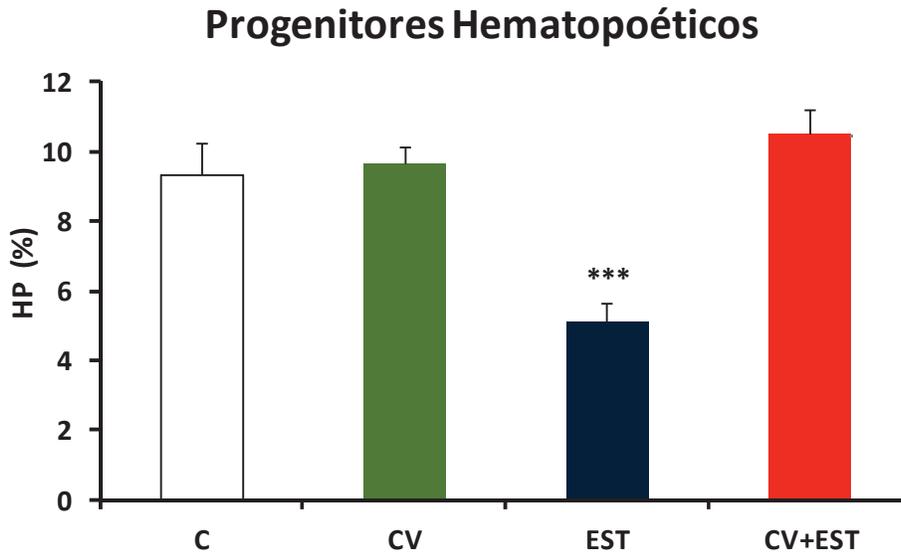


Gráfico 21: Número de precursores hematopoéticos (Ckit1⁺Sca1⁻) na LTBM de camundongos submetidos ao estresse por contenção (EST). Os animais foram pré-tratados via gavagem com CV (50mg/Kg por 5 dias /1x ao dia). Animais controle receberam apenas o veículo. Resultados representam a média \pm SE de 6 animais por grupo. ANOVA, Teste de Tukey. ***P<0,001 com relação a todos os outros grupos. C: controle; CV: pré-tratados com CV; EST: submetidos ao estresse e CV+EST: pré-tratados com CV e submetidos ao estresse.

5.9.3. Produção de IL-1 α e IL-6 no sobrenadante de LTBM

Os níveis de IL-1 α e IL-6 nos sobrenadantes das LTBMcs coletados semanalmente a partir da 4ª semana de incubação estão apresentados nos Gráficos 22 e 23. Observamos que os fatores inter-grupo (tratamento e estresse) produziram alterações significantes nos níveis de IL-1 α (6ª semana: F=53,7; df=3,8; 7ª semana: F=75,5; df=3,8; 8ª semana: F=111,9; df=3,8; 9ª semana: F=239,9; df=3,8, P<0,001) e IL-6 (6ª semana: F=20,7; df=3,8; 7ª semana: F=15,9; df=3,8; 8ª semana: F=17,2; df=3,8; 9ª semana: F=16,9; df=3,8; P<0,001). Na quinta semana de incubação (uma semana após a repopulação das culturas), observamos um aumento (P<0,05) nos níveis de IL-1 α e IL-6 (dados não apresentados), seguido de um decréscimo gradual em todos os grupos avaliados. Pode-se observar em todas as semanas que o tratamento de animais não-estressados com CV produziu um aumento significativo de aproximadamente 15%, quando comparado aos animais controle (P<0,05), nos níveis de ambas as citocinas. A aplicação do estresse causou uma redução significativa de aproximadamente 25% nos níveis de IL-1 α e IL-6 (P<0,05 vs. C). O tratamento de animais estressados com CV preveniu esta redução, mantendo seus níveis semelhantes aos do controle. Este padrão de resposta coincide com o padrão observado nos números de CFU-GM obtidos da suspensão de células não-aderentes da LTBM e na imunofenotipagem.

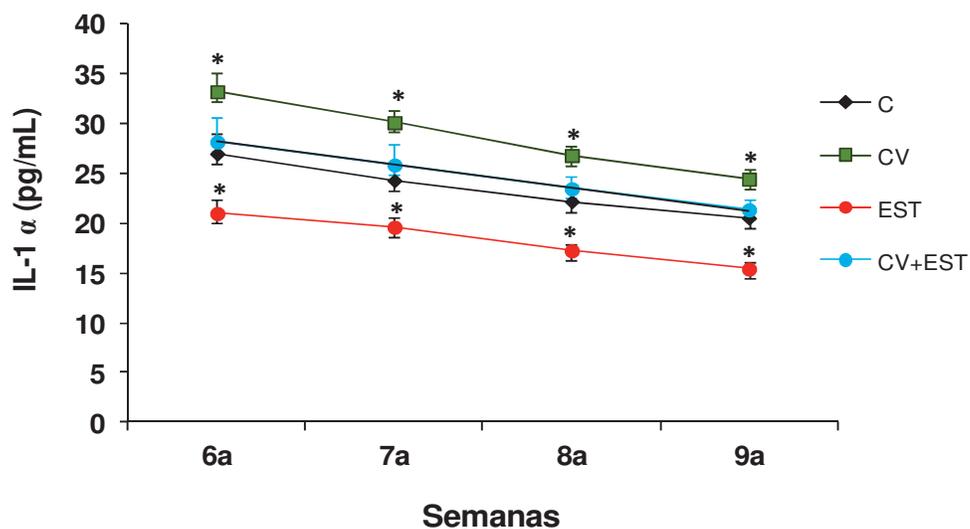


Gráfico 22: Produção de IL-1 α no sobrenadante da LTBM de camundongos submetidos ao estresse por contenção (EST). Os animais foram pré-tratados via gavagem com CV (50mg/Kg por 5 dias /1x ao dia. Animais controle receberam apenas o veículo. Resultados representam a média \pm SE de triplicata do “pool” da suspensão coletada de 5 frascos por grupo. ANOVA, teste de tukey. *P<0,05 com relação a C. C: controle; CV: pré-tratados com CV; EST: submetidos ao estresse e CV+EST: pré-tratados com CV e submetidos ao estresse.

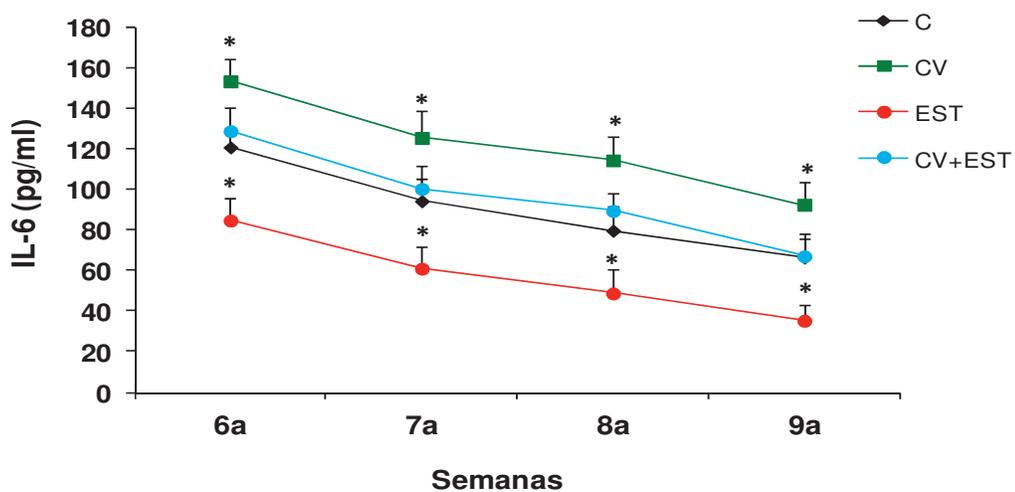


Gráfico 23: Produção de IL-6 no sobrenadante da LTBM de animais submetidos ao estresse por contenção (EST). Os animais foram pré-tratados via gavagem com CV 50mg/Kg/5 dias/1x ao dia. Animais controle receberam apenas o veículo. Resultados representam a média \pm SE de triplicata do “pool” da suspensão coletada de 5 frascos por grupo. ANOVA, teste de Tukey. * $P < 0,05$ com relação a C. C: controle; CV: pré-tratados com CV; EST: submetidos ao estresse e CV+EST: pré-tratados com CV e submetidos ao estresse.

Discussão

Para uma maior compreensão dos mecanismos moduladores da *Chlorella vulgaris* (CV) em situações de estresse, avaliamos o efeito do tratamento com a alga sobre a expressão de c-fos em áreas cerebrais relacionadas ao estresse emocional, sobre a ativação do eixo HPA e indiretamente sobre a ativação do Sistema Nervoso Autônomo Simpático (SNAS), através da medida dos níveis de glicose do plasma. Considerando-se a estreita comunicação existente entre o sistema nervoso e o sistema imune avaliamos, também, a resposta hematopoética de camundongos estressados. Para os parâmetros hematopoéticos selecionamos a dose de CV previamente estabelecida em nossos laboratórios para camundongos, isto é, de 50mg/Kg/5 dias, por ter sido ela a menor dose que apresentou eficácia terapêutica (Souza-Queiroz et al., 2004). Já para os parâmetros centrais, utilizamos ratos e fizemos um estudo com 3 tipos de tratamento: tratamento agudo com 50 mg/kg ou 200 mg/kg 24 horas antes da aplicação do estressor e tratamento repetido com 200 mg/kg durante 7 dias, uma vez ao dia antes do estresse. Diante dos resultados obtidos sobre os níveis de ACTH, selecionamos a dose aguda de 200 mg/kg para estudos relacionados à avaliação da ativação neuronal (expressão de c-fos).

Nossos resultados mostraram que: 1) O estresse por natação forçada aumentou a ativação neuronal em todas as regiões avaliadas (córtex pré-frontal – mPFC; Septum Lateral Ventral – LSV; Núcleo Paraventricular do Hipotálamo – PVN; Rafe Dorsal – DR; e Locus Coeruleus - LC); 2) O tratamento com a dose aguda de 200 mg/kg de CV preveniu de forma parcial o aumento na expressão de c-fos no mPFC, em todas as subáreas avaliadas (Cg, PrL e IF), no LSV, no mpdPVN (região parvocelular medial dorsal do PVN) e no LC. Observamos, ainda, uma redução total na expressão de c-fos causada pelo tratamento com CV no DR (subáreas dorsal e ventral) após o estresse, mantendo-se a ativação neuronal nesta região em níveis semelhantes àqueles observados no grupo controle; 3) O tratamento com CV dos animais não-estressados produziu um aumento na expressão de c-fos no mPFC (Cg, PrL, IF), porém este aumento só foi significativo na região IF do mPFC; 4) O estresse por natação forçada aumentou a expressão de hnCRF no mpdPVN, uma região de grande interesse já que contém a maioria

dos neurônios que sintetizam CRF. O pré-tratamento dos animais com CV previamente ao estresse preveniu totalmente este aumento; 5) O estresse por natação forçada aumentou a liberação de ACTH, corticosterona e glicose no plasma e a dose aguda de 200 mg/Kg preveniu parcialmente o aumento nos níveis de ACTH e de glicose, porém não causou alterações significantes nos níveis de corticosterona; 5) O estresse causou uma redução significativa no número de CFU-GM da medula óssea e um aumento do CSA no plasma, assim como um comprometimento do estroma medular, verificado através da redução do CFU-GM e da produção de IL-1 α e IL-6 na LTBM. Observamos tanto na medula óssea como na LTBM um comprometimento no número de populações maduras e imatura após o estresse; 6) A morte celular na população de células tronco-hematopoéticas (LSK) foi significativamente aumentada pelo estresse e o tratamento com CV reduziu este parâmetro para níveis inferiores aos observados nos animais do grupo controle.

Considerando-se que os experimentos sobre neuroendocrinologia e sobre hematopoiesis foram realizados em diferentes laboratórios, nos deparamos com a necessidade de usar ratos para os experimentos neuroendocrinológicos. Isto porque a retirada repetida de sangue e o estudo da expressão neuronal se faz mais conveniente em ratos. No entanto, considerando-se o meu trabalho de mestrado (Souza-Queiroz et al., 2008), um estudo pioneiro quanto a resposta mielopoética de ratos Wistar à aplicação de estressores, observamos que os ratos apresentaram a mesma resposta mielossupressora aos estressores que àquela observada em camundongos (Souza-Queiroz et al., 2004). Desta forma, nos parece razoável comparar os dados que obtivemos sobre a ativação neuronal em ratos àqueles obtidos na medula óssea e LTBM de camundongos.

1) Ativação Neuronal e Resposta Endócrina

A ativação neuronal frente ao estresse foi avaliada no presente estudo usando um tipo de IEG (c-fos). As áreas que avaliamos se restringiram àquelas que julgamos ser algumas das mais relevantes na integração da resposta induzida pela exposição a um estressor de caráter emocional (Román, 2011; Marín-Blasco, 2010). Essa integração ocorre de forma ampla, complexa e orquestrada: a

codificação de um estímulo estressor para o organismo ocorre em nível cognitivo (mPFC), motor (LS), autonômico (PVN, DR e LC) e endócrino (PVN).

Os estímulos emocionais processados em estruturas encefálicas superiores, como o mPFC e LS, ativam de forma polissináptica o PVN. Análise eletrofisiológica demonstra que a maioria dos inputs sinápticos aos neurônios do PVN são mediados por sinapses glutamatérgicas ou GABAérgicas (Wuarin e Dudek, 1991) e a maioria destes inputs são provenientes da zona hipotalâmica que rodeia o PVN, a região peri-PVN (Boudaba et al., 1996 e 1997). Sendo assim, a ativação de núcleos cerebrais poderia convergir tanto em aumento como em redução da expressão de c-fos no PVN. A subregião mpdPVN é onde estão localizados neurônios que se projetam para o sistema porta-hipofisário da eminência média externa. A maior estimulação desta região parece ser consequência da natureza emocional do estressor estudado (Dayas et al., 1999; Herman et al., 2003; Román, 2011; Marín-Blasco, 2010).

Pelo fato de a natureza forçada tratar-se de um estressor do tipo emocional, observamos um aumento bastante significativo na expressão de c-fos nas regiões mPFC e LS (revisão em Kovacs et al., 1998). O mPFC possui neurônios predominantemente glutamatérgicos (Diorio et al., 1993; Figueiredo et al., 2003; McDougall et al., 2004), que inervam áreas predominantemente GABAérgicas que se projetam para o PVN (Sesack et al., 1989; Hurley et al., 1991), tendo assim um papel predominantemente inibidor sobre esta área (causando um aumento na liberação de ACTH). Já o papel do LS na regulação do eixo HPA em resposta ao estresse ainda não está claro, podendo ser tanto ativador quanto inibidor (Herman et al., 2003), uma vez que seus neurônios, do tipo glutamatérgico, se projetam à região peri-PVN e também à outras áreas hipotalâmicas que contém neurônios tanto GABAérgicos como glutamatérgicos (Decavel e Van Den Pol, 1990; Okamura et al., 1990; Risold e Swanson, 1997b; Ziegler et al., 2002). Dentro do mPFC avaliamos as subáreas Cg, PrL e IF, e estas foram ativadas de forma semelhante pelo estresse. As subáreas PrL e IF também se projetam para a amígdala e para o DR e podem, portanto, mediar a ativação do eixo HPA através destas estruturas (McDonald et al., 1996, Lowry et al., 2002, Herman et al. 2003).

O mPFC recebe projeções do LC, e é através do mPFC, assim como da amígdala e da formação hipocampal, que o LC ativa o eixo HPA (Herman e

Cullinan, 1997, revisão em Herman et al., 2003). Este núcleo é fonte principal de noradrenalina no SNC. Esta região está relacionada com o estado de alerta geral e à manutenção do estado de ativação necessário para perceber e processar informações sensoriais relevantes através da inervação noradrenérgica dos circuitos corticais e subcorticais que participam dos processos de atenção e memória (revisão em Berridge e Waterhouse, 2003). Consistente com um papel predominantemente ativador do eixo HPA, estudos mostram uma drástica redução da indução de c-fos no mPFC após a destruição de terminais noradrenérgicos provenientes do LC (Stone et al., 1993; Spencer e Day, 2004) e que, lesão no LC causa uma menor resposta de ACTH e de corticosterona após 30 minutos de imobilização (Ziegler et al., 1999).

Considerando-se as áreas avaliadas no presente estudo, o LC projeta diretamente para o mPFC, que projeta diretamente para o DR. O DR é a origem da maioria das projeções serotoninérgicas do SNC (Jacobs e Azmitia, 1992, revisão em Lowry, 2002) e se projeta diretamente para o PVN, modulando a atividade do eixo HPA (Herman et al., 2003). Foi demonstrado que lesões no DR causaram uma diminuição da resposta do eixo HPA ao estresse por contenção (Jorgensen et al., 1998). Desta forma, através do controle inibitório que recebe do mPFC, o DR determina o grau de controle que o organismo tem sobre um estressor. Neste sentido, Grahn et al. (1999) mostrou que a aplicação de choques inescapáveis leva a uma maior ativação de neurônios 5-HT no DR em relação à aplicação de choques escapáveis. Para testar a possibilidade de que esse fator seria realmente mediado pelo mPFC, Amat et al. (2005) inativou esta região em ratos através da microinjeção do agonista para GABA (muscimol) durante a exposição aos choques escapáveis ou inescapáveis, e observou que, depois disso, houve uma mesma intensidade de ativação de neurônios 5-HT no DR.

No presente estudo observamos que o estresse por natação forçada aumentou a expressão de c-fos no mPFC, no DR e no LC e que o tratamento com CV de animais estressados preveniu parcialmente a expressão de c-fos no mPFC e LC e totalmente no DR. Extendendo-se para a ativação do eixo HPA, observamos que o grupo de animais tratados com CV apresentou uma redução total na expressão de hnCRF no mpdPVN e parcial nos níveis de ACTH (de 700 para 400 pg/ml). No entanto, não houve redução significativa nos níveis de corticosterona. Isto poderia ser justificado pelo fato de ser a liberação de 400-500 pg/ml de ACTH

suficiente para manter uma atividade secretora máxima do córtex da adrenal (Keller-Wood et al., 1983; Armario, 2006b), demonstrando-se assim que a avaliação dos níveis de ACTH é muito mais precisa do que a de glicocorticóides.

Por ser este o primeiro estudo que demonstra que a *Chlorella vulgares* apresenta atividade no SNC, muito pouco se sabe sobre os mecanismos da alga que poderiam estar atuando no cérebro. Um dos efeitos possíveis seria através das citocinas. Sabe-se que a CV, em situações onde o padrão de citocinas anti-inflamatórias é estimulado, como no estresse ou na infecção, produz modulação de macrófagos peritoneais, observado através de aumento na produção de IL-12 (Hasegawa et al., 1997; Queiroz et al., 2002) e redução da produção de ânion superóxido, assim como as atividades de ligação nuclear do NFkB de macrófagos (Lee et al., 2003). A IL-12, por sua vez, estimula células NK a produzirem INF- γ , uma citocina importante que produz aumento na produção outras citocinas do padrão Th1 (pró-inflamatórias), prevenindo o aumento de citocinas anti-inflamatórias (o aspecto modulador de citocinas da CV será também discutido na segunda parte da discussão). Nos estudos de nosso laboratório, o resultado desta modulação tem sido observado em aumento da sobrevivência de animais inoculados com tumor e infectados (Souza Queiroz et al., 2008, Ramos et al., 2010).

Neste sentido, foi demonstrado que citocinas periféricas pró-inflamatórias, como a IL-6 e IL-2, podem penetrar a barreira hematoencefálica diretamente ou através de mecanismos de transporte ativo (Banks e Kastin, 1991; Schneider et al., 2012), ou indiretamente através da ativação aferente do nervo vago (Tracey 2002). Esta ativação do nervo vago resulta em aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias no cérebro. O aumento dos níveis de citocinas pró-inflamatórias no cérebro pode gerar alterações físicas e funcionais neste órgão (Maier e Watkins, 1998). Neste sentido, Marsland et al. (2008) demonstrou que níveis periféricos de IL-6 correlaciona-se inversamente, de forma dose-dependente, ao volume da substância cinzenta hipocampal. Além disso, foi demonstrado que a IL-2 influencia a liberação de dopamina nas porções estriatais e mesolímbicas de fatias de cérebros de ratos (Alonso et al., 1993), afeta a liberação de serotonina e acetilcolina hipocampal (Hanisch et al., 1997; Pauli et al., 1998) e possui um impacto no *turnover* de noradrenalina (Zalcman et al., 1994; Lacosta et al., 2000).

Estudos consistentes mostram que a desregulação do eixo HPA também é resultado de um aumento de citocinas periféricas (Bernton et al., 1987; Sapolsky et al., 1987; Besedovsky et al., 1991).

A importância do papel das células glia, principalmente a microglia, como fonte e alvo de vários sinais de citocinas tem sido demonstrada (Otero e Merrill, 1994; Hanisch, 2002; Streit, 2002; Monji et al., 2009 e 2011; Schneider et al., 2012). A microglia é considerada o macrófago residente do cérebro, uma vez que possui papel fundamental na imunidade inata do sistema nervoso central (Hendriks et al., 2005; Monji et al., 2011). Possuem receptores para citocinas (Bessis et al., 2007; Schneider et al., 2012) e são rapidamente ativadas frente a alterações no cérebro. Sua ativação contribui diretamente para a degeneração neuronal, através da produção de citocinas pró-inflamatórias e de radicais livres, como o óxido nítrico (Hendriks et al., 2005; Nataf, 2009; Van Horssen et al., 2011).

Além da ativação da microglia, foi demonstrado que o aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias no cérebro pode reduzir a expressão do fator neurotrófico derivado do cérebro (Brain Derived Neurotrophic Factor, BDNF) (Hayley et al., 2005; Mondelli et al., 2011), o qual também pode ser medido no soro e no plasma (Mondelli et al., 2011). O BDNF é conhecido por ter um papel crucial na proliferação, regeneração e sobrevivência de neurônios (Lewin et al., 1996). Neste sentido, Mondelli et al. (2011) demonstrou, no sangue de pacientes que tiveram o primeiro episódio de psicose, uma correlação entre aumento da expressão gênica de IL-6 e TNF- α com reduzida expressão gênica de BDNF, e que estes fatores poderiam estar relacionados a redução que foi observada no volume do hipocampo esquerdo.

Além da capacidade da CV de modular a liberação de citocinas em condições de estresse, é importante discutir também sobre seu efeito anti-oxidante, uma vez que estudos da literatura demonstram que o estresse altera a atividade da superóxido dismutase e catalase, modificando a peroxidação lipídica e os níveis de glutatona em diversas áreas cerebrais (Rasheed et al., 2011). Além disso, foi demonstrado que a natação forçada, em particular, causa um aumento na produção de radicais livres no sistema nervoso central (Abdel-Wahab e Salama, 2011).

Este efeito antioxidante da CV pode ser justificado pela presença de luteína, α e β -caroteno, ácido ascórbico (vitamina C), clorofila, compostos fenólicos e tocoferol (vitamina E) (Hasegawa et al., 1995; Shibata et al., 2001, 2003). Todos estes compostos possuem importante papel no ciclo oxidativo (Barreiros e David, 2006), podendo exercer efeito anti-oxidante tanto em células do SNC quanto do sistema imune. Neste sentido, Moretti et al (2012) mostraram que o ácido ascórbico (10mg/kg) administrado na segunda semana de estresse, foi capaz de reduzir significativamente a quantidade de marcadores de estresse oxidativo em diferentes regiões do cérebro após o estresse do tipo crônico moderado (por duas semanas).

O tocoferol também possui numerosas propriedades biológicas (Singh et al., 2006; Azzi, 2007), além da capacidade de reduzir espécies reativas de nitrogênio e de oxigênio (Zingg, 2007). Estudos reportam um papel específico do α -tocopherol na sinalização celular e regulação da expressão gênica. Possui efeitos significantes na inflamação, proliferação celular e apoptose (Lemaire-Ewing et al., 2000). Estudos realizados em animais irradiados mostraram que o tratamento com α -tocopherol antes da irradiação aumentou a sobrevivência destes animais. Estes efeitos têm sido relacionados com o aumento no número de unidades formadoras de colônias no baço (CFUs) (Roy et al., 1982; Bichay e Roy, 1986, Cherdyntseva et al., 2005). A vitamina E está dentre os componentes necessários para a regulação da proliferação e diferenciação das células tronco-hematopoéticas (HSC), junto com outros reguladores ambientais importantes, que incluem os componentes da matrix extracelular, radicais livres, purinas, nutrientes e, principalmente, citocinas (Verfaillie et al., 1994; Krutzik et al., 2005; Gupta et al., 2006; Moore et al., 2007; Paredes-Gamero et al., 2008; Barbosa et al., 2011; Leon et al., 2011). Estes componentes estão envolvidos com os complexos eventos de sinalização que ligam os processos genéticos intrínsecos de células sanguíneas e o ambiente, determinando se as células devem permanecer quiescentes, proliferar, se auto-renovar ou sofrer apoptose (Wilson e Trumpp, 2006). Estudo demonstra que os efeitos benéficos do α -tocopherol podem ser observados com uma única dose de 9 mg/kg administrada imediatamente após irradiação, ou ainda por um tratamento com 20 mg/kg por 5 dias pré-irradiação. Ambos os tratamentos resultaram em aumento no número de células progenitoras hematopoéticas (HP), demonstrado por um aumento nos ensaios de CFU-GM.

Como um marcador direto da atividade anti-oxidante da CV, no presente trabalho, observamos uma capacidade da alga em reduzir os níveis de glicose após natação forçada (de 160 para 120 mg/dl). Resultados anteriores (Cherng et al., 2005; Aizzat et al., 2010) corroboram com este achado, demonstrando que o tratamento com CV causou uma redução na produção excessiva de ROS por prevenir condições de hiperglicemia, reduzindo, assim, o dano nos tecidos e no DNA de ratos diabéticos.

O aumento dos níveis plasmáticos de glicose reflete o potente efeito do estressor na ativação do SNAS (Armario et al., 1990b; Márquez et al., 2002; 2004). Sabe-se que a elevação da glicemia é o resultado imediato da ativação da medula das adrenais com conseqüente liberação de adrenalina (Bialik et al., 1988; 1989; Arakawa et al., 1997), ainda que seja possível supor uma contribuição adicional da inervação hepática e de outros hormônios com papel secundário (Zhou e Livett, 1990; Yamada et al., 1993; Arakawa et al., 1997). Essas mudanças metabólicas sugerem que o organismo se prepara para uma situação de “emergência” acompanhada de atividade (tentativa de escapar), assegurando um aporte adequado de glicose ao SNC e outros tecidos dependentes da glicose, como o coração (Marín-Blasco, 2010).

Além da propriedade moduladora de citocinas e antioxidante da CV, foi demonstrada uma capacidade da alga de modular a sinalização intracelular. Através de um estudo com células do sistema imune, mostrou-se que a CV altera a sinalização intracelular por modulação de proteínas reguladoras da expressão gênica (Lee et al., 2003; Cheng et al., 2004). Cheng et al., (2004) mostraram através de estudo *in vitro*, que a *Chlorella* é um potente inibidor da proteína tirosina fosfatase transmembrana CD45, que possui um papel importante em muitas funções celulares, como sinalização de MAP kinase, por exemplo. Estes mesmos autores mostraram também uma atividade inibitória da CV sobre a matrix metaloproteinase (MMPs), que apresentam baixa atividade em condições basais, mas são ativadas durante a inflamação ou resposta fisiológica à determinado estímulo, como citocinas e fatores de crescimento (Knight et al., 1992; Nagase, 1997 e 1999). Neste sentido, sabe-se que são as mudanças nas vias de sinalização intracelular que induzem a expressão de c-fos e não a despolarização *per se* (Robertson et al., 1995); o principal evento que culmina com a expressão de

c-fos envolve a ativação de receptores por estímulos extra-celulares, abrindo-se aqui os canais de cálcio, que conduzem a fosforilação do fator de transcrição CREB (CAMP-response element binding protein), iniciando a transcrição dos genes de expressão precoce c-fos, produzindo a proteína Fos.

Interessante observar que o tratamento dos ratos estressados com a dose aguda de 200mg/kg foi mais eficaz que o tratamento crônico (também com 200mg/kg, por 7 dias) na prevenção do aumento do ACTH. Rutkowski e Grzegorzcyk (2012) demonstram que o uso de antioxidantes em humanos em excesso (ex: quando a concentração de beta-caroteno atinge 5,5 mg/kg; ou quantidades maiores 300 mg/dia de vitamina E, e doses maiores que 500mg/dia de vitamina C) poderia levar a casos de intoxicação, além de danos ao DNA, ao invés dos esperados efeitos benéficos à saúde. Maxwell (1999) comprovou, inclusive, que o uso em excesso de beta-caroteno pode aumentar o índice de desenvolvimento de câncer em pacientes de alto risco. Por estas razões, a suplementação regular da dieta com vitaminas antioxidantes ainda não pode ser considerada como uma ação para uma vida saudável.

2) O sistema Hematopoético

No presente estudo, células hematopoéticas de camundongos tratados com CV e expostos ao impacto do estresse por contenção foram estimuladas na presença de fatores de crescimento a formarem colônias, permitindo a obtenção de informações precisas sobre a modulação da CV sobre as mudanças hematopoéticas causadas pelo estresse. Nossos resultados mostraram uma frequência reduzida de células progenitoras (CFU-GM) na medula óssea. Também foi observado um aumento na atividade estimuladora de colônias no soro (CSA) após o estresse. Os fatores estimuladores de colônias (CSFs) pertencem a um grupo de glicoproteínas que controlam o crescimento e a diferenciação de progenitores pluripotentes da medula óssea que podem dar origem a qualquer célula sanguínea, dependendo do estímulo recebido, pois regulam sua produção, maturação e função (Wing et al., 1985; Metcalf et al. 1986; Cheers et al., 1988; Kayashima et al., 1993; Zhan et al., 1998; Guleria e Pollard, 2001; Jin et al., 2002;). Nossos resultados corroboram com

dados de estudos do nosso laboratório (Eberlin et al., 2005, Souza-Queiroz et al., 2008; Torello et al., 2010): demonstramos que o tratamento com CV, embora não apresente efeito sobre o número de CFU-GM da medula óssea de camundongos normais, aumentou de forma significativa a CSA do soro nestes animais. O pré-tratamento do grupo estressado com CV produziu um aumento ainda maior nestes níveis e preveniu a redução do CFU-GM. Estes resultados também corroboram com estudos anteriores (Hasegawa et al., 1997, 2000; Pariente et al., 1999), que mostraram um aumento nos níveis de mRNA específico para o fator estimulante do crescimento de colônias para granulócitos e macrófagos (GM-CSF) após o tratamento com CV. Este estímulo na produção da CSA pode estar relacionado à presença de uma glicoproteína solúvel em água, que foi purificada a partir da CV, e tem sido relatada como estimuladora da hematopoese e, desta forma, da recuperação após quimioterapia (Konishi et al. 1996).

Para melhor investigarmos os mecanismos protetores da CV, quantificamos populações de células maduras e imaturas na medula óssea. O estresse causou uma redução nos números de linfócitos B e T, assim como de células mieloides maduras ($Gr1^+/Mac1^+$) e de progenitores hematopoéticos – HP ($Ckit^+Sca1^-$). A redução no número de linfócitos, junto com atrofia do timo, é uma resposta bastante conhecida do organismo ao estresse (Edgar et al., 2003; Souza-Queiroz et al., 2008). Linfócitos e macrófagos possuem receptores B_2 -adrenérgicos (Heyworht et al., 1992; Black, 1994; Myian et al., 1998; Spiegel et al., 2007) e o nível aumentado de adrenalina e noradrenalina pode produzir mudanças na função de linfócitos, monócitos e leucócitos (Dunn, 1990). Foi também observado um aumento na morte celular na população de células tronco-hematopoéticas (LSK) após o estresse e, os animais estressados que receberam o pré-tratamento com CV, tiveram uma prevenção neste parâmetro, reduzindo-se a morte celular para níveis inferiores aos observados no grupo controle. Neste sentido, Hasegawa et al., (2000) observou que a administração oral de uma glicoproteína da CV preveniu a apoptose de timócitos após um estresse psicológico e Lee et al (2003) demonstrou que a *Chlorella* possui uma atividade inibitória sobre as caspases, que são os executores da morte celular programada – apoptose.

O número reduzido de progenitores hematopoéticos – HP ($Ckit^+Sca1^-$) da medula óssea após o estresse corrobora com a presença de colônias de menor tamanho formadas por células progenitoras deste grupo, em associação com um

grande número de clusters e células soltas nas placas de CFU-GM (dados não mostrados). Corroborando com resultados anteriores de nosso laboratório (Queiroz et al., 2011), o tratamento com CV reverteu todos os efeitos causados pelo estresse observados no número de CFU-GM, no número de células maduras e imaturas e levou à formação de colônias celulares maiores e com um núcleo mais denso. Se considerarmos a presença de receptores específicos para muitos fatores neuroendócrinos em células imunocompetentes, como para CRF (Webster et al., 1990), ACTH (Weigent e Blalock, 1987), catecolaminas (Ovadia e Abramski, 1987; Black, 1994; Dunn, 1995), etc, podemos sugerir que a prevenção destes parâmetros esteja vinculada ao efeito preventivo que o tratamento com CV apresentou sobre os níveis de ACTH e sobre a atividade do SNAS, dando menor ênfase ao efeito causado pelos glicocorticoides. De fato, resultados anteriores mostraram que o bloqueio da produção de glicocorticoides não preveniu a mielosupressão causada pelo estresse (Malacrida et al., 1997b). Dados da literatura mostram que o CRF estimula a proliferação de células B e a atividade de células NK, assim como a produção de IL-1, IL-12, e IL-6. O ACTH tem efeitos diretos na resposta imune, incluindo-se inibição da produção de anticorpos e modulação da função de células B (Heijnen et al., 1991). Sendo assim, e corroborando dados da literatura, sugerimos que outros hormônios, além do cortisol, liberados em situações de estresse, sejam cruciais em mediar a imunomodulação (Dunn, 1995).

A utilização da LTBMCM permite a reprodução *in vitro* da maioria dos componentes envolvidos na hematopoese medular (Sponcer et al. 1993). A principal característica destas culturas é que a hematopoese é sustentada sem a adição de fatores de crescimento, sendo totalmente dependente do estabelecimento de camadas aderentes de células estromais derivadas da medula óssea (Dexter, 1990). As células estromais mantêm a hematopoese através da formação de um microambiente apropriado para promover a sobrevivência, auto-renovação, proliferação e diferenciação das células tronco-hematopoiéticas. Esta função é provavelmente decorrente da combinação de: a) moléculas de adesão, que permitem a ligação de células tronco-hematopoiéticas e de sua progênie a elementos específicos das células estromais; b) comunicação intercelular entre diferentes tipos de células estromais e entre células estromais e hematopoiéticas; c) síntese, secreção e apresentação, pelas células estromais, de concentrações apropriadas de fatores estimuladores e inibidores de crescimento que são

responsáveis pela regulação da proliferação e desenvolvimento de células progenitoras hematopoéticas; d) síntese de moléculas da matriz extracelular pelas células estromais, que desempenham uma variedade de papéis na manutenção da integridade do microambiente hematopoético e, também, na apresentação de fatores de crescimento para o desenvolvimento de células hematopoéticas (Sponcer et al. 1993).

A formação da camada estromal ocorre entre a 2ª e 4ª semana de cultura. Na sequência, as células mais primitivas migram para esta camada e em íntima associação com o microambiente, estabelecem a hematopoese *in vitro*. As células mais imaturas permanecem no estroma e à medida que estas células sofrem divisão e maturação, sua progênie é lançada no sobrenadante. A suspensão de células é predominantemente de neutrófilos maduros, além de células primitivas e progenitores comprometidos os quais podem ser identificados por ensaios de cultura clonal, como o CFU (Sponcer et al. 1993). O ensaio de LT BMC permite o estudo de vários parâmetros hematopoéticos, tais como, fatores de crescimento, mecanismos de ação e a interferência de drogas tóxicas para o estroma medular (Queiroz et al., 2008; Ramos et al., 2010). Neste sentido, para verificar a ação da CV no compartimento hematopoético de camundongos estressados, avaliamos os efeitos desta alga sobre a manutenção do estroma medular, a capacidade de suportar o crescimento e diferenciação de progenitores para granulócitos e macrófagos e a produção das citocinas IL-6 e IL-1 α no sobrenadante de LT BMC.

Poucos estudos na literatura tratam dos efeitos exercidos pelo estresse sobre o microambiente medular. Estudos de nosso laboratório mostraram que ocorre uma diminuição dramática no número total de CFU-GM na suspensão de células não-aderentes das LT BMCs de ratos inoculados com tumor (Queiroz et al., 2004; Ramos et al., 2010), expostos ao chumbo (Queiroz et al., 2008) ou infectados (Torello et al., 2010) quando comparados a animais normais. Nossos resultados corroboram com os da literatura uma vez que não foram observados nas culturas correspondentes às células de animais estressados os mesmos estromas densos e confluentes, observados nas culturas correspondentes aos animais controle. Além disso, a característica fundamental observada foi o dano à capacidade de suportar o crescimento e diferenciação de progenitores para granulócitos e macrófagos em todos os intervalos avaliados após o estresse, chegando o número de CFU-GM a

ser 4 vezes menor, na nona semana, quando comparado aos animais do grupo controle.

Esta diminuição foi observada já na 5ª semana de incubação e se manteve até a 9ª semana, quando foi observado um declínio acentuado no número de células viáveis do sobrenadante, corroborando com resultados da literatura (Sponcer et al., 1993). A falta de um estroma confluyente, que promova o contato entre células hematopoéticas e as camadas aderentes, tem como consequência a diminuição da capacidade de proliferação e de diferenciação das células progenitoras da medula óssea observadas na LTBM. Está bem estabelecido na literatura a importância da interação entre as células do estroma medular e os precursores hematopoiéticos para a manutenção das célula-tronco hematopoiéticas e de suas características (Dexter, 1990; Sponcer et al., 1993). Dessa forma, sugerimos que o estresse interfira diretamente neste contato físico que é estritamente necessário para a manutenção da hematopoese, visto que ao final de cada semana de cultura os animais estressados apresentariam uma diminuição significativa dos precursores para granulócitos e macrófagos em relação aos do grupo controle.

O tratamento de animais estressados com CV foi capaz de prevenir este efeito. Observamos uma prevenção da redução dos números de CFU-GM da suspensão de células não-aderentes de animais estressados. Estes achados confirmam a capacidade da CV de modular a mielopoese, estimulando o crescimento e a diferenciação de células precursoras hematopoéticas e, também, atuando sobre o microambiente hematopoético envolvido na regulação da maturação das células-tronco (Vacek et al., 1990).

Além das interações célula-célula existentes entre os precursores hematopoéticos e o estroma medular, inúmeras glicoproteínas solúveis controlam a mitose e a diferenciação de células hematopoéticas (Anjos et al., 2000). Dentre os vários fatores envolvidos no controle da hematopoiese, a IL-6 possui uma função crítica na geração e manutenção da mielopoese em culturas líquidas de longa duração de células da medula óssea (Hauser et al., 1997). Além disso, evidências da literatura sugerem que a IL-6 em associação com os fatores estimuladores de colônias e as citocinas IL-1 e IL-3 são fundamentais na regulação da atividade funcional das células hematopoéticas primitivas (Muench et al., 1992), sendo a IL-6 considerada um fator de sobrevivência para as células progenitoras mais jovens

(células-tronco) (Bernad et al., 1994). A IL-1 tem como característica principal o aumento na produção de CSFs (Dinarello, 1996). A associação desta citocina ao GM-CSF, IL-3 e/ou IL-6 mostrou-se ainda mais eficaz na recuperação da mielossupressão. Nossos resultados sobre a produção de IL-6 e IL-1 α mostraram uma diminuição nos níveis destas citocinas no sobrenadante de LTBMCS de camundongos estressados. Por outro lado, o tratamento com CV não só aumentou os níveis de IL-6 e IL-1 α em animais não-estressados, como também evitou a queda dos níveis destas citocinas em animais estressados, mantendo-se os níveis semelhantes aos do controle.

A atividade da CV pode estar relacionada com alguma habilidade do composto de manter o balanço entre estímulos positivos e negativos que controlam direta ou indiretamente a mielopoese, causando mudanças no comportamento local, particularmente nas células T e macrófagos. Resultados anteriores de nosso laboratório (Souza Queiroz et al., 2008) mostraram um aumento na produção de IL-10 e uma redução no IFN- γ após o estresse emocional e o pré-tratamento com CV preveniu este efeito. A liberação de catecolaminas durante o estresse agudo inibe a produção de INF- γ pelas células Th1 e aumenta a secreção de IL-10 pelas células Th2 (Woiciechowsky et al., 1998). Neste caso, evidências indicam que a supressão da imunidade celular através da inibição da função Th1, em favor da resposta Th2, é uma característica importante do estresse (Elenkov et al., 1996, 2000; Zhang et al., 2005). Agonistas dos receptores β_2 são conhecidos por inibirem a produção de IL-12 (Panina-Bordignon et al., 1997). Como já mencionado, IL-12 possui um papel central no sistema imune por estimular a resposta do tipo Th1. Estudos do nosso laboratório mostraram uma recuperação na produção de IL-1 α e TNF- α que estavam reduzidos em animais inoculados com tumor (Ramos et al., 2010) e expostos ao chumbo (Queiroz et al., 2008 e 2011). Essas citocinas são conhecidas por estimularem a produção de neutrófilos na medula óssea e mediar a quimioatração de granulócitos da circulação para focos de lesão na periferia.

Observamos no presente trabalho que a CV possui pouca atividade sobre animais não-estressados. O tratamento destes animais causou um pequeno, porém significativo, incremento nos níveis de CSA do plasma, o que sugere um aumento de citocinas periféricas consideradas reguladoras positivas da hematopoese.

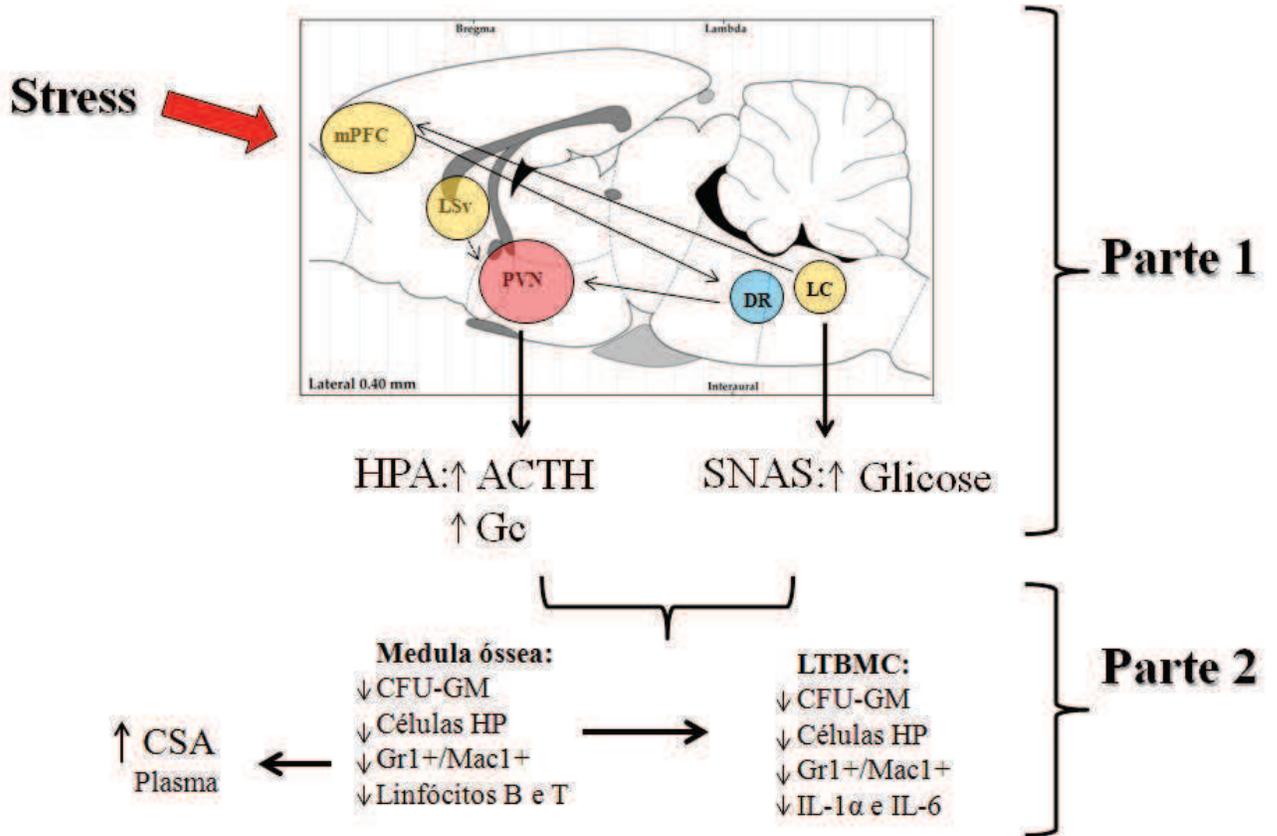
Constatamos também nestes animais, que o tratamento com CV aumentou a expressão de c-fos no mPFC, nas três subregiões avaliadas, porém com significância apenas na subregião IF. Considerando-se a discussão acima sobre os efeitos de citocinas periféricas no cérebro, podemos sugerir que a ativação de c-fos no IF poderia estar relacionado ao incremento nos níveis de CSA. No entanto, não sabemos até que ponto isto pode ser relevante ou não para o organismo.

De uma forma geral, nossos resultados mostram que o pré-tratamento com CV previniu os efeitos do estresse sobre a hematopoese, mantendo-se a integridade do estroma medular e, conseqüentemente, a capacidade de células progenitoras de formarem colônias para granulócitos e magrófagos. O eixo HPA é uma das principais vias de regulação neuro-imune e, em seu conjunto, nossos dados demonstraram que o tratamento com CV reduziu significativamente a atividade deste eixo. Temos que considerar também a redução observada nos níveis de glicose, o que não sugere apenas uma redução de marcadores de estresse oxidativo, mas também uma possível redução da atividade do SNAS. O fato de termos observado uma redução na ativação neuronal no LC corrobora esta correlação.

Desta forma, estes estudos abrem caminho para uma série de muitos outros, com o objetivo de se investigar os efeitos da CV como modulador da atividade cerebral em condições de desequilíbrio. Neste sentido, sabe-se que a desregulação do eixo HPA esta presente na etiopatogenia de muitas condições neuropsiquiátricas, como o transtorno de estresse pós-traumático, esquizofrenia ou síndrome do pânico (Phillips et al., 2006; Mondelli et al., 2011; Ho et al., 2012; Holtzman et al., 2013) e também que o tratamento convencional destas condições é bastante sintomático.

Em resumo:

A.



B.

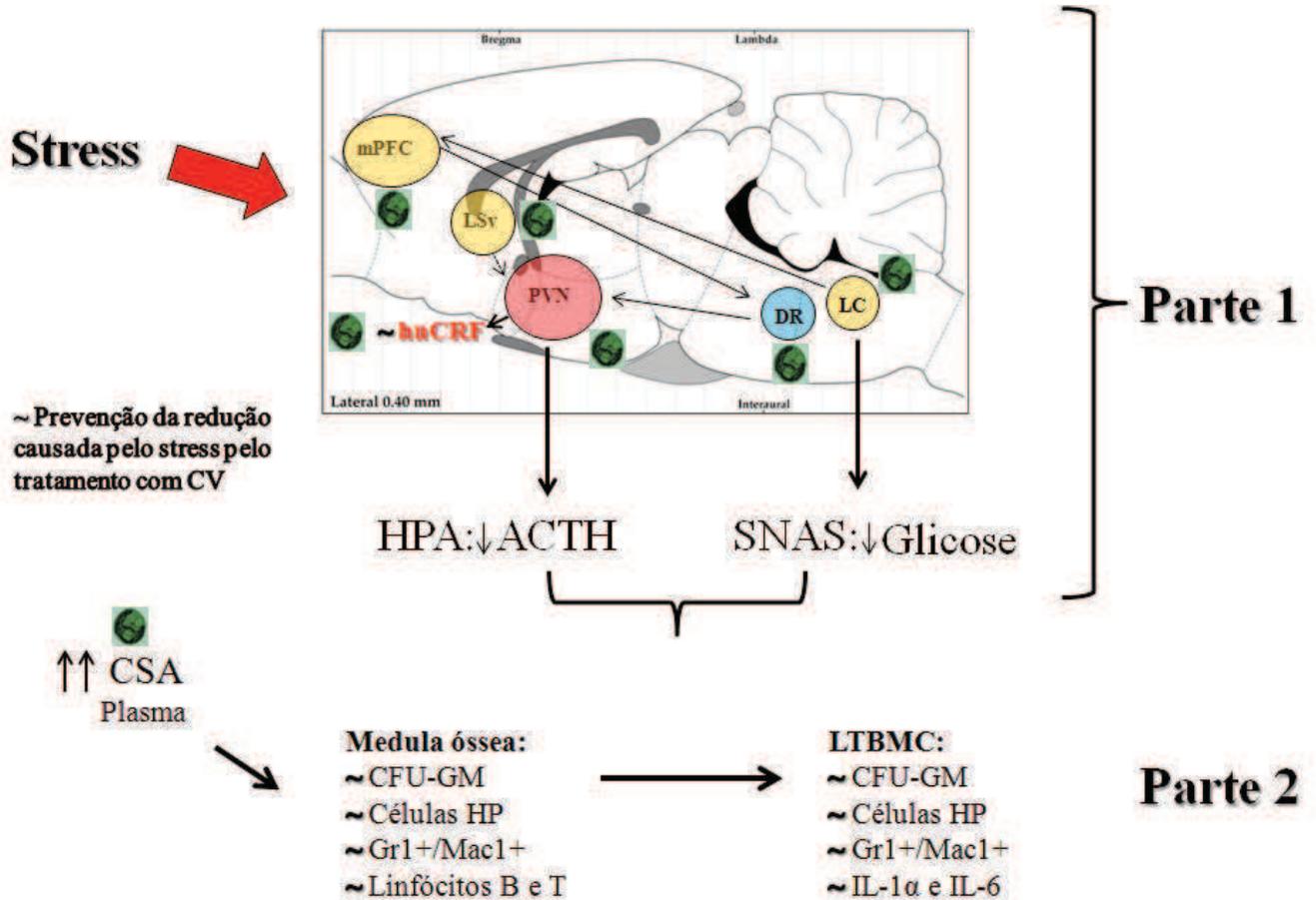


Figura 14: (A) Efeito do estresse sobre o Sistema Nervoso Central (Parte 1) e sobre o Sistema Hematopoético (Parte 2). (B) Mecanismos de ação da CV sobre os efeitos do estresse sobre o Sistema Nervoso Central (Parte 1) e sobre o Sistema Hematopoético (Parte 2). Abreviaturas: mPFC: córtex pré-frontal medial; LSV: septum lateral ventral; PVN: núcleo paraventricular do hipotálamo; DR: núcleo dorsal da raphe; LC: locus coeruleus; hnCRF: RNA heteronuclear de CRF; HPA: eixo hipotálamo pituitária adrenal; SNAS: sistema nervoso autônomo simpático; ACTH: hormônio adrenocorticotrópico; LTBMC: cultura líquida de longa duração de células da medula óssea; CFU-GM: número unidades formadoras de colônias de granulócitos e macrófagos; CSA: atividade estimuladora de colônias do soro; HP: progenitores hematopoéticos; Gr-1⁺Mac-1⁺: células mieloides maduras; IL: interleucinas.

Conclusões

Nossos resultados apresentam evidências consistentes de que o pré-tratamento com CV previniu os efeitos do estresse, tais como:

1. Preveniu o aumento da expressão de c-fos no mPFC, LSv, PVN, DR e LC.
2. Causou uma prevenção total no aumento da expressão de mRNA de hnCRF na região mpdPVN.
3. Preveniu o aumento nos níveis de ACTH e glicose aumentados pelo estresse, porém a redução nos níveis glicocorticoides não foi significativa.
4. Preveniu a redução do CFU-GM e aumentou CSA.
5. Preveniu redução em populações de células maduras (Linfócitos B e T e células mieloides) e imaturas (progenitores hematopoiéticos).
6. Preveniu a morte celular de células tronco hematopoéticas na medula óssea.
7. Preveniu a redução da atividade funcional do estroma (LTBMC), que foi observada através do CFU-GM, e níveis de IL-1 α e IL-6 presentes nas culturas.

Referências Bibliográficas

- Abdel-Wahab BA, Salama RH. Venlafaxine protects against stress-induced oxidative DNA damage in hippocampus during antidepressant testing in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 2011; 100(1):59-65.
- Adan RA, Gispen WH. Melanocortins and the brain: from effects via receptors to drug targets. *Eur J Pharmacol* 2000; 405:13-24.
- Aizzat O, Yap SW, Sopia H, Madiha MM, Hazreen M, Shailah A, Wan Junizam WY, Nur Syaidah A, Srijit Das, Musalmah M, Yasmin Anum MY. Modulation of oxidative stress by *Chlorella vulgaris* in streptozotocin (STZ) induced diabetic Sprague-Dawley rats. *Adv in Med Sci* 2010; 55(2):281-288.
- Alheid GF. Extended amygdala and basal forebrain. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 985, 185-205.
- Alonso R, Chaudieu I, Diorio J, Krishnamurthy A, Quirion R, Boksa P. Interleukin-2 modulates evoked release of [3H] dopamine in rat cultured mesencephalic cells. *J Neurochem* 1993; 61:1284–1290.
- Amat J, Paul E, Zarza C, Watkins LR, Maier SF. Previous Experience with Behavioral Control over Stress Blocks the Behavioral and Dorsal Raphe Nucleus Activating Effects of Later Uncontrollable Stress: Role of the Ventral Medial Prefrontal Cortex. *The J of Neurosci* 2006; 26(51):13264 –13272.
- Anjos AR, Alvares-Silva M, Borelli P. Matriz Extracelular e Leucemia. *Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia* 2000; 22(3):404-412.
- Arai F, Yoshihara, H, Hosokawa, K, Nakamura, Y, Gomei, Y, Iwasaki, H, Suda, T. Niche regulation of hematopoietic stem cells in the endosteum. *Ann NY Acad Sci* 2006; 1179:36-46.
- Arakawa H, Kodama H, Matsuoka N, Yamaguchi I. Stress increases plasma enzyme activity in rats: differential effects of adrenergic and cholinergic blockades. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; 280: 1296-1303.
- Armario A, Gavaldà A, Martí O. Forced swimming test in rats: effect of desipramine administration and the period of exposure to the test on struggling behavior, swimming, immobility and defecation rate. *Eur J Pharmacol* 1988; 158:207-212.
- Armario A, Campmany L, Borrás M, Hidalgo J. Vitamin E-supplemented diets reduce lipid peroxidation but do not alter either pituitary-adrenal, glucose, and lactate responses to immobilization stress or gastric ulceration. *Free Radic Res Commun* 1990a; 9:113-118.
- Armario A, Martí J, Gil M. The serum glucose response to acute stress is sensitive to the intensity of the stressor and to habituation. *Psychoneuroendocrinology* 1990b; 15:341-347.

- Armario, A. Estrés: concepto y respuesta fisiológica. In: Tresguerres, J. and et al. (Eds.), Tratado de endocrinología básica y clínica. Síntesis, Madrid 1998; 2176-2205.
- Armario A. Neurobiología del estrés: una perspectiva desde el eje hipotalámico-pituitario-adrenal. Sandi C and Calés JM (Eds), Estrés: Consecuencias Psicológicas, Fisiológicas y Clínicas, Sanz y Torres 2000; 47-79.
- Armario A. The contribution of immediate early genes to the understanding of brain processing of stressors. In: Pinaud, R. and Tremere, L. (Eds.), Immediate early genes in sensory processing, cognitive performance and neurological disorders. Springer science 2006a.
- Armario A. Fisiología y fisiopatología del estrés. In: Achetegui Laizate, J. (Ed.), El estrés crónico: aspectos clínicos y terapéuticos. Edicions Mayo, Barcelona 2006b; 19-29.
- Armario A. Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by addictive drugs: different pathways, common outcome. Trends Pharmacol Sci 2010; 31:318-325.
- Armario A, Daviu N, Muñoz-Abellán C, Rabasa C, Fuentes S, Belda X, Gagliano H, Nadal R. What can we know from pituitary-adrenal hormones about the nature and consequences of exposure to emotional stressors? Cell. Mol. Neurobiol 2012; 32(5):749-758.
- Armstrong W. Hypothalamic Supraoptic and Paraventricular Nuclei. In: Paxinos, G. (Ed.), The Rat Nervous System (2ed). Academic Press, Sidney 1995; 377-403.
- Azzi, A. Molecular mechanism of α -tocopherol action. Free Radic Biol Med 2007; 43:16–21.
- Baianova I e Trubachev IN. Comparative evaluation of vitamin composition of unicellular algae and higher plants Brown under artificial conditions. Prikladnaia Biokhimiia i Mikrobiologiia 1981; 17(3):400-407.
- Banks WA, Kastin AJ. Blood to brain transport of interleukin links the immune and central nervous systems. *Life Sci* 1991; 48:PL117–PL121.
- Barbosa CM, Leon CM, Nogueira-Pedro A, Wasinsk F, Araujo RC, Miranda A, Ferreir, A, Paredes-Gamero EJ. Differentiation of hematopoietic stem cell and myeloid populations by ATP is modulated by cytokines. Cell Death Dis 2011 2, e165.
- Bauer ME, Verhara K, Perks P, Wilcock GK, Lightman SL, Shanks N. Chronic stress in caregivers of dementia patients is associated with reduced lymphocyte sensitivity to glucocorticoids. J of Neuroimmunol 2000; 103:84-92.
- Belda X, Márquez C, Armario A. Long-term effects of a single exposure to stress in adult rats on behavior and hypothalamic-pituitary-adrenal responsiveness: comparison of two outbred rat strains. Behav Brain Res 2004; 154:399-408.

- Berczi I. The stress concept and neuroimmunoregulation in modern biology. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 851: 3-12.
- Bernad A, Kopf M, Kulbacki R, Weich N, Koehler G, Gutierrez-Ramos JC. Interleukin-6 is required in vivo for the regulation of stem cells and committed progenitors of the hematopoietic system. *Immunity* 1994; 1(9):725-731.
- Bernton EW, Beach JE, Holaday JW, Smallridge RC, Fein HG. Release of multiple hormones by a direct action of interleukin-1 on pituitary cells. *Science* 1987;238(4826):519-21.
- Berridge CW, Waterhouse BD. The locus coeruleus-noradrenergic system: modulation of behavioral state and state-dependent cognitive processes. *Brain Res* 2003; 42:33-84.
- Besedovsky HO, Del Rey AE, Sorkin E. Immune-neuroendocrine interactions. *J Immunol* 1985, 135:750S-754S.
- Besedovsky HO, del Rey A, Klusman I, Furukawa H, Monge Arditi G, Kabiersch A. Cytokines as modulators of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991;40(4-6):613-8.
- Bessis A, Bechade C, Bernard D, Roumier A. Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia* 2007; 55: 233–238.
- Bialik RJ, Smythe JW, Roberts DC. Alpha 2-adrenergic receptors mediate the increase in blood glucose levels induced by epinephrine and brief footshock stress. *Prog europsoypharmacol Biol Psychiatry* 1988; 12:307-314.
- Bialik RJ, Smythe JW, Sardelis M, Roberts DC. Adrenal demedullation blocks and brain norepinephrine depletion potentiates the hyperglycemic response to a variety of stressors. *Brain Res* 1989; 502:88-98.
- Bichay TJ, Roy RM. Modification of survival and hematopoiesis in mice by tocopherol injection following irradiation. *Strahlenther Onkol* 1986; 162:391–399.
- Black PH. Central nervous system-immune system interactions: psychoneuroendocrinology of stress and its immune consequences. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38(1):1-6.
- Blalock JE. A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. *Physiol Rev* 1989; 69:1-32.
- Blalock JE. Shared ligands and receptors as a molecular mechanism for communication between the immune and neuroendocrine systems. *Ann N Y Acad Sci* 1994a; 741:292-298.
- Blalock JE. The syntax of immune-neuroendocrine communication. *Immunol Today* 1994b; 15:504-510.

- Boggs DR, Boggs SS, Saxe DF, Gress LA, Canfiend, DR. Hematopoietic stem cell with high proliferative potential: assay of their concentration in marrow by the frequency and duration of cure of W/W^v mice. *J Clin Invest* 1982; 70(2):242-253.
- Bohus B, Koolhaas JM. Stress and the cardiovascular system: central and peripheral physiological mechanisms. Stanford, SC and Salmon, P (Eds), *Stress: from synapse to syndrome* Academic Press, San Diego 1993, 75-117.
- Borowsky B, Kuhn CM. D1 and D2 dopamine receptors stimulate hypothalamo-pituitary-adrenal activity in rats. *Neuropharmacology* 1992; 31:671-678.
- Borowsky B, Kuhn CM. GBR12909 stimulates hypothalamo-pituitaryadrenal activity by inhibition of uptake at hypothalamic dopamine neurons. *Brain Res* 1993; 613:251-258.
- Boudaba C, Szabo K, Tasker JG. Physiological mapping of local inhibitory inputs to the hypothalamic paraventricular nucleus. *J. Neurosci* 1996; 16:7151-7160.
- Boudaba C, Schrader LA, Tasker JG. Physiological evidence for local excitatory synaptic circuits in the rat hypothalamus. *J. Neurophysiol* 1997; 77:3396-3400.
- Bradford GB, Williams S, Rossi R, Bertocello I. Quiescence, cycling, and turnover in the primitive hematopoietic stem cell compartment. *Exp Hematol* 1997; 25: 445-453.
- Bradley TR, Metcalf D. The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *J Exp Biol Med Sci* 1996; 44:287-299.
- Brambilla F. Social stress in anorexia nervosa: a review of immuno-endocrine relationships. *Physiol Behav* 2001; 73:365-369.
- Broome CS, Miyan JA. Neuropeptide control of bone marrow neutrophil production. A key axis for neuroimmunomodulation. *Ann Ny Acad Sci* 2000; 94:424-434.
- Bubser M, Deutch, AY. Stress induces Fos expression in neurons of the thalamic paraventricular nucleus that innervate limbic forebrain sites. *Synapse* 1999; 32:13-22.
- Chakraborti A, Gulati K, Banerjee BD, Ray A. Possible involvement of free radicals in the differential neurobehavioral responses to stress in male and female rats. *Behav Brain Res* 2007;179(2):321-5.
- Champagne D, Beaulieu J, Drolet G. CRFergic innervation of the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus: a tract-tracing study. *J Neuroendocrinol* 1998; 10:119-131.
- Cheers C, Haigh AM, Kelso A, Metcalf, D, Stanley, ER, Young, AM.. Production of colony-stimulating factors (CSFs) during infection: separate determinations of Macrophage-, Granulocyte-, Granulocyte-macrophage-, and Multi-CSF. *Infect Immun* 1988; 56 (1):247-251.

- Cheng FC, Lin A, Feng JJ, Mizoguchi T, Takekoshi H, Kubota H, Kato Y, Naoki Y. Effects of chlorella on activities of protein tyrosine phosphatases, matrix metalloproteinases, caspases, cytokine release, B and T cell proliferations, and phorbol ester receptor binding. *J Med Food* 2004; 7(2):146-152.
- Cheung S, Ballew JR, Moore KE, Lookingland KJ. Contribution of dopamine neurons in the medial zona incerta to the innervation of the central nucleus of the amygdala, horizontal diagonal band of Broca and hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res* 1998; 808:174-181.
- Cherdyntseva N, Shishkina A, Butorin I, Murase H, Gervas P, Kagiya TV. Effect of tocopherol-monoglucoside (TMG), a watersoluble glycosylated derivate of vitamin E, on hematopoietic recovery in irradiated mice. *J Radiat Res (Tokyo)* 2005; 46:37-41.
- Cherng Jong-Yuh, Shih Mei-FenT. Potential hypoglycemic effects of Chlorella in streptozotocin-induced diabetic mice. *Life Sciences* 2005; 77:980-990.
- Choi, DC, Furay, AR, Evanson, NK, Ostrander, MM., Ulrich-Lai, YM, Herman, JP. Bed nucleus of the stria terminalis subregions differentially regulate hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity: implications for the integration of limbic inputs. *J Neurosci* 2007; 27:2025-2034.
- Chrousos GP, Gold PW. The concepts of stress and stress system disorders. Overview of physical and behavioral homeostasis. *JAMA* 1992; 267:1244-1252.
- Chrousos GP. The HPA axis and the stress response. *End research* 2000; 26 (4):513-4.
- Cole RL, Sawchenko PE. Neurotransmitter regulation of cellular activation and neuropeptide gene expression in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *J Neurosci* 2002; 22:959-969.
- Costa-Pinto F, Palermo-Neto J. Neuroimmune interactions in stress. *Neuroimmunomodulation* 2010; 17:196-169.
- Cryan JF, Valentino RJ, Lucki I. Assessing substrates underlying the behavioral effects of antidepressants using the modified rat forced swimming test. *Neurosci Biobehav Rev* 2005; 29:547-569.
- Cullinan WE, Herman JP, Battaglia DF, Akil H, Watson, SJ. Pattern and time course of immediate early gene expression in rat brain following acute stress. *Neuroscience* 1995; 64:477-505.
- Cullinan, WE, Herman, JP, Watson SJ. Ventral subicular interaction with the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence for a relay in the bed nucleus of the stria terminalis. *J Comp Neurol* 1993; 332:1-20.
- Cunningham ET, Bohn MC, Sawchenko PE. Organization of adrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus in the rat. *J Comp Neurol* 1990; 292:651-667.

- Dabrowska J, Hazra R, Ahern TH, Guo JD, McDonald AJ, Mascagni F, Muller JF, Young LJ, Rainnie DG. Neuroanatomical evidence for reciprocal regulation of the corticotrophin-releasing factor and oxytocin systems in the hypothalamus and the bed nucleus of the stria terminalis of the rat: Implications for balancing stress and affect. *Psychoneuroendocrinology* 2011; 36:1312-1326.
- Dal-Zotto S, Martí O, Armario A. Influence of single or repeated experience of rats with forced swimming on behavioural and physiological responses to the stressor. *Behav Brain Res* 2000; 114:175-181.
- Dal-Zotto S, Martí O, Delgado R, Armario A. Potentiation of glucocorticoid release does not modify the long-term effects of a single exposure to immobilization stress. *Psychopharmacology* 2004; 177:230-237.
- Daniel DP, Ponting IL, Dexter TM. Growth and development of hemopoietic cells: a deterministic process? *Hamatol Bluttransfus* 1989; 32:172-177.
- Dantas DCM, Kaneno R, Queiroz MLS. The effects of *Chlorella vulgaris* in the protection of mice infected with *Listeria monocytogenes*. Role of natural killer cells. *Immunotoxicology and Immunopharmacology* 1999; 21(3):609-619.
- Dantas, DC, Queiroz, MLS. Effects of *Chlorella vulgaris* on bone marrow progenitor cells of mice infected with *Listeria monocytogenes*. *Int J Immunopharmacol* 1999; 21, 499–508.
- Dayas, CV, Buller, KM, Crane, JW, Xu, Y, Day T A. Stressor categorization: acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups. *Eur J Neurosci* 2001; 14:1143-1152.
- Dayas CV, Buller KM, Day TA. Neuroendocrine responses to an emotional stressor: evidence for involvement of the medial but not the central amygdala. *Eur J Neurosci* 1999; 11, 2312-2322.
- Dayas CV, Day TA. Opposing roles for medial and central amygdala in the initiation of noradrenergic cell responses to a psychological stressor. *Eur J Neurosci* 2002; 15:1712-1718.
- Decavel C, Van den Pol AN. GABA: a dominant neurotransmitter in the hypothalamus. *J Comp Neurol.* 1990; 302:1019-1037.
- de Kloet, ER, Reul, JM, Sutanto, W. Corticosteroids and the brain. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1990; 37:387-394.
- de Kloet, ER, Vreugdenhil E, Oitzl MS, Joels M. Brain corticosteroid receptor balance in health and disease. *Endocr Rev* 1998, 19:269- 301.
- Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG. Conditions controlling the proliferation of hematopoietic stem cells in vitro. *J Cell Physiol* 1977; 91:335.

- Dexter TM. Hematopoietic growth factors: review of biology and clinical potential. Gardiner-Caldwell Communications Ltd, United Kingdom 1990.
- Dhabhar, FS, Millar, AH, McEwen, BS, Spencer, RL. Effects of stress on immune cell distribution: dynamics and hormonal mechanisms. *J Immunol* 1995; 154:5511–5527.
- Dhabhar FS. Enhancing versus suppressive effects of stress on immune function: implications for immunoprotection and immunopathology. *Neuroimmunomodulation* 2009; 16:300-317.
- Dhabhar FS, McEwen BS, Spencer RL. Adaptation to prolonged or repeated stress—comparison between rat strains showing intrinsic differences in reactivity to acute stress. *Neuroendocrinology* 1997; 65:360-368.
- Di S, Malcher-Lopes R, Halmos KC, Tasker, JG. Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *J Neurosci* 2003; 23:4850-4857.
- Dinarello CA. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* 1996; 87(6):2095-2147.
- Diorio D, Viau V, Meaney M J. The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *J Neurosci* 1993; 13:3839-3847.
- Dobbs CM, Feng, N, Beck, FM, Sheridan, JP. Neuroendocrine regulation of cytokine production during experimental influenza viral infection: effects of restraint stress-induced elevation in endogenous corticosterone. *J Immunol* 1996, 157(5):1870-1877.
- Domen J, Weissman IL. Self-renewal, differentiation or death: regulation and manipulation of hematopoietic stem cell fate. *Mol Med Today* 1999; 5:201–208.
- Dorshkind K. Regulation of hemopoiesis by bone marrow stromal cell and their products. *Ann Rev Immunol* 1990; 8:111-137.
- Downing JE, Miyan JA. Neural immunoregulation emerging roles for nerves in immune homeostasis and disease. *Immunol today* 2000; 21:281-289.
- Dugan AL, Schwemberger S, Noel GJ, Babcock GF, Ogle CK, Buckley DJ, Horseman ND, Gregerson KA. Stress and prolactin effects on bone marrow myeloid cells, serum chemokine and serum glucocorticoid levels in mice. *Neuroimmunomodulation* 2007; 14: 287-296.
- Dunn, AJ. Interleukin-1 as a stimulator of hormone secretion. *Prog. Neuroendocrinimmunol* 1990; 3:26-34.
- Dunn, AJ. Interactions between the Nervous System and the Immune System: Implications for Psychopharmacology. *Psychopharmacol* 1995; chapter 63, 719-731.

- Eberlin S, Santos LMB, Queiroz MLS. Uncaria tomentosa extract increases the number of myeloid progenitor cells in the bone marrow of mice infected with *Listeria monocytogenes*. *Int Immunopharmacol* 2005; 5:1235–1246.
- Edgar VA, Silberman DM, Cremaschi GA, Zieher LM, Genaro AM. Altered lymphocyte catecholamine reactivity in mice subjected to chronic mild stress. *Biochem Pharmacol* 2003; 65(1):15-23.
- Elenkov IJ, Papanicolaou DA, Wilder RL, Chrousos GP. Modulatory effects of glucocorticoids and catecholamines on human interleukin-12 and interleukin-10 production: clinical implications. *Proc Assoc Am Phys* 1996; 108:374–381.
- Elenkov IJ, Webster EL, Torpy DJ, Chrousos GP. Stress, corticotropin-releasing hormone, glucocorticoids, and the immune/inflammatory response: acute and chronic effects. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 876:1-11.
- Elenkov IJ, Wilder RL, Chrousos GP, Vizi ES. The sympathetic nerve—an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. *Pharmacol Rev* 2000; 52:595–638.
- Emmert MH, Herman JP. Differential forebrain c-fos mRNA induction by ether inhalation and novelty: evidence for distinctive stress pathways. *Brain Res* 1999; 845:60-67.
- Engeland WC, Miller P, Gann DS. Dissociation between changes in plasma bioactive and immunoreactive adrenocorticotropin after hemorrhage in awake dogs. *Endocrinology* 1989 124:2978-2985.
- Evanson NK, Tasker JG, Hill MN, Hillard CJ, Herman JP. Fast feedback inhibition of the HPA axis by glucocorticoids is mediated by endocannabinoid signaling. *Endocrinology* 2010; 151:4811-4819.
- Fellmann D, Bugnon C, Gouget A. Immunocytochemical demonstration of corticoliberin-like immunoreactivity (CLI) in neurones of the rat amygdala central nucleus (ACN). *Neurosci Lett* 1982; 34:253-258.
- Felten DL, Livnat S, Felten SY, Carlson SL, Bellinger DL, Yeh P. Sympathetic innervation of lymph nodes in mice. *Brain Res Bull* 1984; 13, 693-699.
- Figueiredo HF, Bruestle A, Bodie B, Dolgas CM, Herman JP. The medial prefrontal cortex differentially regulates stress-induced c-fos expression in the forebrain depending on type of stressor. *Eur J Neurosci* 2003; 18:2357-2364.
- Fonseca ES, Massoco CO, Palermo-Neto, J. Effects of prenatal stress on stress-induced changes in behavior and macrophage activity of mice. *Physiol Behav* 2002; 77:205-215.
- Frey T. Nucleic acid dyes for detection of apoptosis in live cells. *Cytometry* 1995; 21(3):265-74.

- Friedman EM, Irwin MR. Modulation of immune cell function by the autonomic nervous system. *Pharmacol Ther* 1997; 74(1):27-38.
- Fuertes G, Laorden ML, Milanés, MV. Noradrenergic and dopaminergic activity in the hypothalamic paraventricular nucleus after naloxone-induced morphine withdrawal. *Neuroendocrinology* 2000; 71:60-67.
- Gaillet S, Lachuer J, Malaval F, Assenmacher I, Szafarczyk A. The involvement of noradrenergic ascending pathways in the stress-induced activation of ACTH and corticosterone secretions is dependent on the nature of stressors. *Exp Brain Res* 1991; 87:173-180.
- Gallini R, Hendry JH, Molineux G, Testa NG. Residual haemopoietic damage in the mouse after fractionated gamma-irradiation, down to 0.1 Gy per fraction. *Radiother Oncol* 1989; 14(1):43-8.
- Gamaro GD, Michalowski MB, Catelli DH, Xavier MH, Dalmaz C. Effect of repeated restraint stress on memory in different tasks. *Braz J Med Biol Res* 1999; 32(3):341-7.
- Garcia A, Marti O, Valles A, Dal-Zotto S, Armario A. Recovery of the hypothalamic-pituitary-adrenal response to stress. Effect of stress intensity, stress duration and previous stress exposure. *Neuroendocrinology* 2000, 72:114-125.
- Ginty DD, Bonni A, Greenberg ME. Nerve growth factor activates a Ras-dependent protein kinase that stimulates c-fos transcription via phosphorylation of CREB. *Cell* 1994; 77:713-725.
- Gol'dberg ED, Dygai AM, Shakhov VP, Bogdaskin IV, Mikhlenko AV. Lymphocytic mechanisms of myelopoiesis regulation under stress. *Biomed Sci* 1990; 1:366-372.
- Goldstein DS, McEwen B. 2002. Allostasis, homeostats, and the nature of stress. *Stress* 2002; 5:55-58.
- Goldstein DS, Kopin IJ. Evolution of concepts of stress. *Stress* 2007; 10:109-120.
- Gordon MY. Hematopoietic growth factors and receptors: bound and free. *Cancer Cells* 1991; 3:127-133.
- Groeneweg FL, Karst H, de Kloet ER, Joels M. Rapid non-genomic effects of corticosteroids and their role in the central stress response. *J Endocrinol* 2011; 209:153-167.
- Grahn RE, Will MJ, Hammack SE, Maswood S, McQueen MB, Watkins LR, Maier SF. Activation of serotonin-immunoreactive cells in the dorsal raphe nucleus in rats exposed to an uncontrollable stressor. *Brain Res* 1999; 826:35– 43.
- Guleria I, Pollard JW. Aberrant macrophage and neutrophil population dynamics and impaired Th1 response to *Listeria monocytogenes* in colony-stimulating factor 1-deficient mice. *Infect Immun* 2001; 69:1795–1807.

- Gupta R, Karpatkin S, Basch RS. Hematopoiesis and stem cell renewal in long-term bone marrow cultures containing catalase. *Blood* 2006; 107:1837–1846.
- Halbreich U. Hormones and depression. Raven Press, New York, 1987.
- Haller J, Mikics E, Makara GB. The effects of non-genomic glucocorticoid mechanisms on bodily functions and the central neural system. A critical evaluation of findings. *Front Neuroendocrinol* 2008; 29:273-291.
- Hendriks JJ, Teunissen CE, de Vries HE, Dijkstra CD. Macrophages and neurodegeneration. *Brain Res Rev* 2005; 48:185–195.
- Hanisch UK, Neuhaus J, Rowe W, Van RD, Moller T, Kettenmann H, Quirion R,. Neurotoxic consequences of central long-term administration of interleukin-2 in rats. *Neurosci* 1997; 79:799–818.
- Hanisch UK. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia* 2002; 40:140–155.
- Hasegawa T, Okuda M, Nomoto K, Yoshikai Y. Augmentation of the resistance against *Listeria monocytogenes* by oral administration of a hot water extract of *Chlorella vulgaris* in mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1994; 16:191–202.
- Hasegawa T, Okuda, M, Makino M, Hiromatsu K, Nomoto K, Yoshikai Y. Hot water extracts of *Chlorella vulgaris* reduce opportunistic infection with *Listeria monocytogenes* in C57BL/6 mice infected with LP-BM5 murine leukemia viruses. *Int. J. Immunopharmacol* 1995; 17:505–512.
- Hasegawa T, Kimura Y, Hiromatsu K, Kobayashi N, Yamada A, Makino M, Okuda M, Sano T, Nomoto K, Yoshikai Y. Effect of hot water extract of *Chlorella vulgaris* on cytokine expression patterns in mice with murine acquired immunodeficiency syndrome after infection with *Listeria monocytogenes*. *Immunopharmacology* 1997; 35:273–282.
- Hasegawa, T., Ito, K., Ueno, S., et al. Oral administration of hot water extracts of *Chlorella vulgaris* reduces IgE production against milk casein in mice. *Int J Immunopharmacol* 1999; 21, 311–323.
- Hasegawa T, Noda K, Kumamoto S, Ando Y, Yamada A, Yoshikai Y. *Chlorella vulgaris* culture supernatant (CVS) reduces psychological stress-induced apoptosis in thymocytes of mice. *Int J Immunopharmacol* 2000; 22:877– 885.
- Hauger RL, Millan MA, Lorang M, Harwood JP, Aguilera G. Corticotropin-releasing factor receptors and pituitary adrenal responses during immobilization stress. *Endocrinology* 1988; 123:396-405.
- Hauser SP, Kajkenova O, Lipschitz DA. The Pivotal Role of Interleukin 6 in Formation and Function of Hematopoietically Active Murine Long-Term Bone Marrow Cultures Stem Cells 1997; 15:125-132.

- Hayley S, Poutler MO, Merali Z, Anisman H. The pathogenesis of clinical depression: stressor- and cytokine-induced alterations of neuroplasticity. *Neuroscience* 2005; 135(3):659-678.
- Herdegen T, Leah J D. Inducible and constitutive transcription factors in the mammalian nervous system: control of gene expression by Jun, Fos and Krox, and CREB/ATF proteins. *Brain Res Brain Res Rev* 1998; 28:370-490.
- Herman JP, Cullinan WE, Watson SJ. Involvement of the bed nucleus of the stria terminalis in tonic regulation of paraventricular hypothalamic CRH and AVP mRNA expression. *J Neuroendocrinol* 1994; 6:433-442.
- Herman JP, Cullinan WE. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Trends Neurosci* 1997; 20:78-84.
- Herman JP, Figueiredo H, Mueller NK, Ulrich-Lai Y, Ostrander, MM, Choi DC, Cullinan WE. Central mechanisms of stress integration: hierarchical circuitry controlling hypothalamo-pituitary-adrenocortical responsiveness. *Front Neuroendocrinol* 2003; 24:151-180.
- Herman JP, Ostrander MM, Mueller NK, Figueiredo H. Limbic system mechanisms of stress regulation: hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005; 29:1201-1213.
- Herrera DG, Robertson HA. Activation of c-fos in the brain. *Prog Neurobiol* 1996; 50:83-107.
- Heyworth CM, Whetton AD, Nicholls SE, Zsebo K, Dexter TM. Stem cell factor directly stimulates the development of enriched granulocyte–macrophage colony-forming cells and promotes the effects of other colony-stimulating factors. *Blood* 1992; 80:2230–2236.
- Ho RT, Au Yeung FS, Lo PH, Law KY, Wong KO, Cheung IK, Ng SM. Tai-chi for residential patients with schizophrenia on movement coordination, negative symptoms, and functioning: a pilot randomized controlled trial. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012.
- Hoffman GE, Lyo D. Anatomical markers of activity in neuroendocrine systems: are we all 'fos-ed out'? *J Neuroendocrinol* 2002; 14:259-268.
- Holtzman CW, Trotman HD, Goulding SM, Ryan AT, McDonald AN, Shapiro DI, Brasfield JL, Walker EF. Stress and Neurodevelopmental Processes in the Emergence of Psychosis. *Neuroscience*. 2013 [Epub ahead of print].
- Horiguchi J, Warren K, Kufe D. Expression of the macrophage-specific colony stimulating factor in human stimulating factor. *Blood* 1987; 69:1259-1261.
- Hurley KM, Herbert H, Moga MM, Saper, CB. Efferent projections of the infralimbic cortex of the rat. *J Comp Neurol* 1991; 308:249-276.

- Hyo-Jin A, Hong-Kun R, Hyun-Ja J, Seung-Heon H, Jae-Young U, Hyung-Min K. Hot water extracts of *Chlorella vulgaris* improve immune function in protein-deficient weanling mice and immune cells. *Immunopharmacol and Immunotoxicol* 2010; 32(4): 585–592.
- Jacobs BL, Azmitia EC. Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* 1992; 72:165-229.
- Jacobson SE. IL-12, a direct stimulator and indirect inhibitor of hematopoiesis. *Res. Immunol* 1995; 146(7-8):506-514, Review.
- Jaferi A, Nowak N, Bhatnagar S. Negative feedback functions in chronically stressed rats: role of the posterior paraventricular thalamus. *Physiol Behav* 2003; 78:365-373.
- Jariel-Encontre I, Salvat C, Steff A M, Pariat M, Acquaviva C, Furstoss O, Piechaczyk M. Complex mechanisms for c-fos and c-jun degradation. *Mol Biol Rep* 1997; 24:51-56.
- Jin Y, Dons L, Kristensson K, Rottenberg ME. Colony-stimulating factor 1- dependent cells protect mice against systemic infection with *Listeria monocytogenes* but facilitate neuroinvasion. *Infect Immun* 2002; 70:4682–4686.
- Johnson GR, Metcalf D. Pure and mixed erythroid colony formation in vitro stimulated by spleen conditioned medium with no detectable erythropoietin. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74:3879-3881.
- Johnson AK, Cunningham JT, Thunhorst RL. Integrative role of the lamina terminalis in the regulation of cardiovascular and body fluid homeostasis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1996; 23:183-191.
- Jorgensen H, Knigge A, Kjaer A, Vadsholt T, Warberg J. Serotonergic involvement in stress induced ACTH release. *Brain Res* 1998; 811:10-20.
- Jorgensen H, Knigge U, Kjaer A, Moller M, Warberg I. Serotonergic stimulation of corticotropin-releasing hormone and pro-opiomelanocortin gene expression. *J of Neuroendocrinol* 2002; 14:788-794.
- Ju G, Swanson LW, Simerly RB. Studies on the cellular architecture of the bed nuclei of the stria terminalis in the rat: II. Chemoarchitecture. *J Comp Neurol* 1989; 280:603-621.
- Justo GZ, Silva MR, Queiroz MLS. Effects of the green algae *Chlorella vulgaris* on the response of the host hematopoietic system to intraperitoneal Ehrlich ascites tumor transplantation in mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2001; 23:119–132.
- Kant GJ, Leu JR, Anderson SM, Mougey EH. Effects of chronic stress on plasma corticosterone, ACTH and prolactin. *Physiol Behav* 1987; 40:775-779.
- Khansari DN, Murgo AJ, Faith RE. Effects of stress on the immune system. *Immunol Today* 1990; 11:170–175.

- Kayashima S, Tsuru S, Hata N, Rokutanda M. The therapeutic effect of granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) on the protection against *Listeria* infection in SCID mice. *Immunology* 1993; 80:471–476.
- Keller-Wood ME, Shinsako J, Dallman MF. Integral as well as proportional adrenal responses to ACTH. *Am J Physiol* 1983; 245:53-59.
- Keller-Wood ME, Dallman, MF. Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocr Rev* 1984; 5:1-24.
- Kelley KW, Johnson RW, Dantzer R. Immunology discovers physiology. *Vet Immunol Immunopathol*, 1994; 43:157-165.
- Kiel MJ, Morrison SJ. Uncertainty in the niches that maintain hematopoietic stem cells. *Nature Rev Immunol* 2008; 8:290-301.
- Knight CG, Willenbrock F, Murphy G. A novel coumarin-labelled peptide for sensitive continuous assays of the matrix metalloproteinases. *FEBS Lett* 1992; 296:263–266.
- Konishi F, Tanaka K, Himeno K, Taniguchi K, Nomoto K. Antitumor effect induced by a hot water extract of *Chlorella vulgaris* (CE): resistance to Meth-A tumor growth mediated by CE-induced polymorphonuclear leukocytes. *Cancer Immunol Immunother* 1985; 19:73–78.
- Konishi F, Tanaka K, Kumamoto S, Hasegawa T, Okuda M, Yano Y, Yoshikai Y, Nomoto K. Enhanced resistance against *Escherichia coli* infection by subcutaneous administration of the hot-water extract of *Chlorella vulgaris* in cyclophosphamide-treated mice. *Cancer Immunol. Immunother* 1990; 32:1–7.
- Konishi F, Mitsuyama M, Okuda M, Tanaka K, Hasegawa T, Nomoto K. Protective effect of an acidic glycoprotein obtained from culture of *Chlorella vulgaris* against myelosuppression by 5-fluorouracil. *Cancer Immunol. Immunother* 1996; 42:268–274.
- Korosi A, Baram TZ. The central corticotropin releasing factor system during development and adulthood. *Eur J Pharmacol* 2008; 583:204-214.
- Korte SM, Koolhaas JM, Wingfield JC, McEwen BS. The Darwinian concept of stress: benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease. *Neurosci Biobehav Rev* 2005; 29:3-38.
- Kovacs GL, Sarnyai Z, Szabo G. Oxytocin and addiction: a review. *Psychoneuroendocrinology* 1998; 23:945-962.
- Krutzik PO, Hale MB, Nolan GP. Characterization of the murine immunological signaling network with phosphospecific flow cytometry. *J Immunol* 2005; 175, 2366–2373.
- Kusnekov AV, Grota LJ, Schmidt SG, Bonneau RH, Sheridan JF, Glaser R, Moynihan JA. Decreased herpes simplex viral immunity and enhanced pathogenesis following stressor administration in mice. *J Neuroimmunol* 1992; 38 (1-2):129-137.

- Lacosta S, Merali Z, Anisman H. Central monoamine activity following acute and repeated systemic interleukin-2 administration. *NeuroImmunoModulation* 2000; 8:83–90.
- Larsson J, Karlsson S. The role of Smad signaling in hematopoiesis. *Oncogene* 2005; 24, 5676-5692.
- Lazarus RS. From psychological stress to the emotions: a history of changing outlooks. *Annu Rev Psychol* 1993; 44:1-21.
- Lee GR, Foerster J et al. *Wintrobe's Clinical Hematology*. Lea e Febiger, Philadelphia, London 1993; 79.
- Lee HS, Chun YC, Cho C, Song Y. Attenuating effect of Chlorella supplementation on oxidative stress and NFkB activation in peritoneal macrophages and liver of C57BL/6 mice fed on an atherogenic diet. *Biosci Biotechnol Biochem* 2003; 64(10):2083-2090.
- Lemaire-Ewing S, Desrumaux C, Neel D, Lagrost L. Vitamin E transport, membrane incorporation and cell metabolism: is α -tocopherol in lipid rafts an oar in the lifeboat? *Mol Nutr Food Res* 2010; 54:631–640.
- Lemieux ME, Rebel VI, Lansdorp PM, Eaves, CJ. Characterization and purification of a primitive hematopoietic cell type in adult mouse marrow capable of lymphomyeloid differentiation in long-term marrow “switch” culture. *Blood* 1995; 86:1339-1347.
- Leon CM, Barbosa CM, Justo GZ, Borelli P, Junior JD, de Oliveira JS, Ferreira AT, Paredes-Gamero, EJ. Requirement for PLC₂ in IL-3 and GM-CSF-stimulated MEK/ERK phosphorylation in murine and human hematopoietic stem/progenitor cells. *J Cell Physiol* 2011; 226:1780–1792.
- Levin N, Blum M, Roberts JL. Modulation of basal and corticotropin-releasing factor-stimulated proopiomelanocortin gene expression by vasopressin in rat anterior pituitary. *Endocrinology* 1989; 125:2957-2966.
- Lewin GR, Barde YA. Physiology of the neurotrophins. *Annu Rev Neurosci* 1996; 19(1):289-317.
- Li HY, Ericsson A, Sawchenko PE. Distinct mechanisms underlie activation of hypothalamic neurosecretory neurons and their medullary catecholaminergic afferents in categorically different stress paradigms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93:2359-2364.
- Liposits Z, Paull WK, Setalo G, Vigh S. Evidence for local corticotropin releasing factor (CRF)-immunoreactive neuronal circuits in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. An electron microscopic immunohistochemical analysis. *Histochemistry* 1985; 83:5-16.
- Lopez AF, Elliot MJ, Woodcock J, Vadas MA. GM-CSF, IL-3 and IL-5: cross competition on human haematopoietic cells. *Immunol Today* 1992; 13:495-500.

- Lowry CA. Functional subsets of serotonergic neurons.: implications for control of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J Neuroendocrinol* 2002; 14:911-923.
- Luckman SM, Dyball RE, Leng G. Induction of c-fos expression in hypothalamic magnocellular neurons requires synaptic activation and not simply increased spike activity. *J Neurosci* 1994; 14:4825-4830.
- Lyman SD, Jacobsen SE. C-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood* 1998; 91:1101–1134.
- Maestroni GJ, Conti A. Noradrenergic modulation of lymphohematopoiesis. *Int J Immunopharmacol* 1994; 12(2):117-122.
- Maestroni GJ. Neurohormones and catecholamines as functional components of the bone marrow microenvironment. *Ann NY Acad Sci* 2000; 917:29-37.
- Maier SF, Watkins LR. Cytokines for psychologists: Implications of bidirectional immune-to-brain communication for understanding behavior, mood, and cognition. *Psychol Rev* 1998; 105:83–107.
- Malacrida SA. Efeitos do estresse sobre o crescimento e diferenciação das células precursoras da medula óssea (CFU-C) em ratos. 53 f. Tese (Mestrado em Farmacologia). Faculdade de Ciências Médicas (FCM). Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas. 1996.
- Malacrida SA, Teixeira NA, Queiroz MLS. Hematopoietic changes in rats after inescapable and escapable shocks. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1997a; 19:523-533.
- Malacrida SA, Teixeira NA, Queiroz MLS. Regulation of stress-induced reduced myelopoiesis in rats. *Int J Immunopharmacol* 1997b; 19:227-233.
- Makara GB, Haller J. Non-genomic effects of glucocorticoids in the neural system. Evidence, mechanisms and implications. *Prog Neurobiol* 2001; 65:367-390.
- Márquez C, Nadal R, Armario A. Influence of reactivity to novelty and anxiety on hypothalamic-pituitary- adrenal and prolactin responses to two different novel environments in adult male rats. *Behav Brain Res* 2006; 168:13-22.
- Marx C, Ehrhart-Bornstein M, Scherbaum WA, Bornstein SR. Regulation of adrenocortical function by cytokines – relevance for immune-endocrine interaction. *Horm Metab Res* 1998; 30:416-420.
- Masini CV, Sasse SK, Garcia RJ, Nyhuis TJ, Day HE, Campeau S. Disruption of neuroendocrine stress responses to acute ferret odor by medial, but not central amygdala lesions in rats. *Brain Res* 2009; 1288:79-87.

- Marín-Blasco I. Una exposición prolongada a la inmovilización modifica la expresión de *c-fos* y la activación del eje HPA en respuesta a una nueva situación estresante. [Tesis Master]. Barcelona (España): Universidad Autònoma de Barcelona, 2010.
- Márquez C, Belda X, Armario A. Post-stress recovery of pituitary-adrenal hormones and glucose, but not the response during exposure to the stressor, is a marker of stress intensity in highly stressful situations. *Brain Res* 2002; 926:181-185.
- Marquez C, Nadal R, Armario A. The hypothalamic-pituitary-adrenal and glucose responses to daily repeated immobilisation stress in rats: individual differences. *Neuroscience* 2004; 123:601-612.
- Marsland AL, Gianaros PJ, Abramowitch SM, Manuck SB, Hariri AR. Interleukin-6 Covaries Inversely with Hippocampal Grey Matter Volume in Middle-Aged Adults. *Biol Psychiatry* 2008; 64(6):484-90.
- Martí O, Andrés R, Armario A. Defective ACTH response to stress in previously stressed rats: dependence on glucocorticoid status. *Am J Physiol* 1999; 277:869-877.
- Martí J, Armario A. Effects of diazepam and desipramine in the forced swimming test: influence of previous experience with the situation. *Eur J Pharmacol* 1993; 236:295-299.
- Maxwell SRJ. Antioxidant Vitamin Supplements: Update of Their Potential Benefits and Possible Risks. *Drug Safety* 1999; 21 (4): 253-266.
- McDonald, AJ, Mascagni, F, Guo, L. Projections of the medial and lateral prefrontal cortices to the amygdala; a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin study in rat. *Neuroscience* 1996; 71:55-75.
- McDonald, AJ. Is there an amygdala and how far does it extend? An anatomical perspective. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 985:1-21.
- McDougall SJ, Widdop RE, Lawrence AJ. Medial prefrontal cortical integration of psychological stress in rats. *Eur J Neurosci* 2004; 20:2430-2440.
- McEwen BS, Sapolsky RM. Stress and cognitive function. *Curr Opin Neurobiol* 1995; 5:205-216.
- McEwen BS, Biron CA, Brunson KW, Bulloch K, Chambers WH, Dhabhar FS, Goldfarb RH, Kitson RP, Miller AH, Spencer RL, Weiss JM. The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions. *Brain Res Rev* 1997; 23:79-133.
- McKinley MJ, Gerstberger R, Mathai ML, Oldfield BJ, Schmid H. The lamina terminalis and its role in fluid and electrolyte homeostasis. *J Clin Neurosci* 1999; 6:289-301.
- McNiece IK, Bradley TR, Kriegler AB, Hodgson GS. Subpopulations of mouse bone marrow high-proliferative-potential colony-forming cells. *Exp Hematol* 1986; 14:856-860.

- Metcalf D. Control of hemopoietic cell proliferation and differentiation. CCDD, Part A 1981; 473-486.
- Metcalf D. The molecular biology and functions of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factors. *Blood* 1986; 67(2): 257-267.
- Metcalf D. The molecular control of cell division, differentiation commitment and maturation in hematopoietic cells. *Nature* 1989; 339: 27-30.
- Merchenthaler I, Vigh S, Petrusz P, Schally AV. Immunocytochemical localization of corticotropin-releasing factor (CRF) in the rat brain. *Am J Anat* 1982; 165:385-396.
- Min Li W, Huang WQ, Huang HY, Jiamg DZ, Wang Q R. Positive and negative haematopoietic cytokines produced by bone marrow endothelial cells. *Cytokine* 1999; 12(7):1017-1023.
- Miyajima A, Mui ALF, Ogorochi T, Sakamaki, K. Receptors for granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating factor, Interleukin-3, and Interleukin-5. *Blood* 1993; 1960-1974.
- Miyan JA, Broome CS, Afan AM. Coordinated host defense through an integration of the neural, immune and hemopoietic systems. *Domest Anim Endocrinol* 1998; 15:297-304.
- Mizobe K, Kishiharou K, Ezz-Din El-Noggar R., Madkour GA, Kubo C, Nomoto K. Restraint stress-induced elevation of endogenous glucocorticoid suppresses migration of granulocytes and macrophages to an inflammatory locus. *J Neuroimmunol* 1997; 73(1-2):81-89.
- Mizoguchi T, Takehara I, Masuzawa T, Saito T, Naoki Y. Nutrigenomic studies of effects of *Chlorella* on subjects with high-risk factors for lifestyle-related disease. *J Med Food* 2008; 11(3):395-404.
- Moberg GP. Influence of stress on reproduction: measure of well-being. Moberg, GP (Ed), *Animal stress*. American Physiological Society, Baltimore 1985; 245-267.
- Mondelli V, Murri MB, Hepgul N, Aitchison KJ, Dazzan P. Stress and inflammation reduce Brain-Derived Neurotrophic factor expression in first episode psychosis: A pathway to Smaller Hippocampal Volume. *J Clin Psychiatry* 2011; 72(12):1677-1684.
- Monji A, Kato T, Kanba S. Cytokines and schizophrenia: Microglia hypothesis of schizophrenia. *Psychiatry Clin Neurosci* 2009; 63(3):257-65.
- Monji A, Kato TA, Mizoguchi Y, Horikawa H, Seki Y, Kasai M, Yamauchi Y, Yamada S, Kanba S. Neuroinflammation in schizophrenia especially focused on the role of microglia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2011; 13. [Epub ahead of print]
- Moore MAS. Clinical implications of positive and negative hematopoietic stem cell regulators. *Blood* 1991; 78(1).

- Moore MA, Dorn DC, Schuringa JJ, Chung KY, Morrone G. Constitutive activation of Flt3 and STAT5A enhances self-renewal and alters differentiation of hematopoietic stem cells. *Exp. Hematol* 2007; 35:105–116.
- Moretti M, Colla A, de Oliveira Balen G, dos Santos DB, Budni J, de Freitas AE, Farina M, Severo Rodrigues AL. Ascorbic acid treatment, similarly to fluoxetine, reverses depressive-like behavior and brain oxidative damage induced by chronic unpredictable stress. *Journal of Psychiatric Research* 2012; 46(3):331-340.
- Muench MO, Schneider JG, Moore MA. Interactions among colony-stimulating factors, IL-1 beta, IL-6, and kit-ligand in the regulation of primitive murine hematopoietic cells. *Experimental Hematology* 1992; 20(3):339-349.
- Nagase H: Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1997; 272:151–160.
- Nagase H, Woessner JF Jr: Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 1999; 274:21491–21494.
- Nakahata T, Ogawa M. Identification in culture of a class of hematopoietic colony-forming units with extensive capability to self-renew and generate multipotential colonies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982; 79: 3843-3847.
- Nataf S. Neuroinflammation responses and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Rev Neurol (Paris)* 2009; 165:1023–1028.
- Nicola NA. Hematopoietic cell growth factor and their interactions with specific receptors. *J Cell Physiol*, 1987; 5:9-14.
- Nicola NA. Hematopoietic cell growth factor and their receptors. *Annu Ver Biochem*, 1989; 58:45.
- Nicola NA, Begley CG, Metcalf D. Identification of the human analogue of a regulator that induces differentiation in murine leukaemic cells. *Nature* 1985; 314:625-628.
- Nicola NA, Metcalf D. Down-modulation of receptors for granulocyte colony-stimulating factor on human neutrophils by granulocyte-activating agents. *J Cell Physiol* 1986; 128(3):501-509.
- Okamura H, Abitbol M, Julien JF, Dumas S, Berod A, Geffard M, Kitahama K, Bobillier P, Mallet J, Wiklund L. Neurons containing messenger RNA encoding glutamate decarboxylase in rat hypothalamus demonstrated by in situ hybridization, with special emphasis on cell groups in medial preoptic area, anterior hypothalamic area and dorsomedial hypothalamic nucleus. *Neuroscience* 1990; 39:675-699.
- Olschowka JA, O'Donohue TL, Mueller GP, Jacobowitz DM. The distribution of corticotropin releasing factor-like immunoreactive neurons in rat brain. *Peptides* 1982; 3:995-1015.

- Orlic D, Fisher R, Nishikawa SI, et al. Purification and characterization of heterogeneous pluripotent hematopoietic stem cell populations expressing high levels of c-kit receptor. *Blood* 1993; 82:762-770.
- Otero GC, Merrill JE. Cytokine receptors on glial cells. *Glia* 1994; 11:117–128.
- Ovadia H, Abramsky O. Dopamine receptor. *J Neurosci Res.* 1987; 18(1), 70-4.
- Pacak K, Palkovits M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev* 2001; 22:502-548.
- Palermo-Neto J, Massoco CO, Favare RC. Effects of maternal stress on anxiety levels, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. *Neurotoxicol Teratol* 2001; 23:497-507.
- Palermo-Neto J, de Oliveira Massoco C, Robespierre de Souza W. Effects of physical and psychological stressor on behavior, macrophage activity and Ehrlich tumor growth. *Brain Behav and Immun* 2003; 17(1):43-54.
- Pan L, Gilbert F. Activation of 5-HT_{1A} receptor subtype in the paraventricular nuclei of the hypothalamus induces CRH and ACTH release in the rat. *Neuroendocrinology* 1992; 56:797-802.
- Panina-Bordignon P, Mazzeo D, Lucia PD, D'Ambrosio D, Lang R, Fabbri L, Self C, Sinigaglia F. Beta2-agonists prevent Th1 development by selective inhibition of interleukin 12. *J Clin Invest* 1997; 100(6):1513-1519.
- Paredes-Gamero EJ, Leon CM, Borojevic R, Oshiro ME, Ferreira AT. Changes in intracellular Ca²⁺ levels induced by cytokines and p2 agonists differentially modulate proliferation or commitment with macrophage differentiation in murine hematopoietic cells. *J Biol Chem* 2008; 283:31909–31919.
- Pariante CM, Orrú MG, Baita A, Farci MG, Carpinello B. Treatment with interferon-alpha in patients with chronic hepatitis and mood anxiety disorders. *Lancet* 1999; 354(9173):131-132.
- Pauli S, Linthorst AC, Reul JM, 1998. Tumour necrosis factor-alpha and interleukin-2 differentially affect hippocampal serotonergic neurotransmission, behavioural activity, body temperature and hypothalamic–pituitary–adrenocortical axis activity in the rat. *Eur J NeuroSci* 1998; 10:868–878.
- Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* Elsevier, Amsterdam 2007.
- Philippe J, Louagie H, Thierens H, Vral A, Cornelissen M, De Ridder L. Quantification of apoptosis in lymphocyte subsets and effect of apoptosis on apparent expression of membrane antigens. *Cytometry* 1997; 29:242-249.
- Phillips LJ, McGorry PD, Garner B, Thompson KN, Pantelis C, Wood SJ, Berger G. Stress, the hippocampus and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: implications

- for the development of psychotic disorders. *Aust N Z J Psychiatry* 2006; 40(9):725-41.
- Piazza PV, Le Moal M. Glucocorticoids as a biological substrate of reward: physiological and pathophysiological implications. *Brain Res Rev* 1997; 25:359-372.
- Ploemacher RE, Van der Sluijs JP, Voerman JSA, et al. An in vitro limiting-dilution assay of long-term repopulating hematopoietic stem cells in the mouse. *Blood* 1989; 74:2755.
- Ploemacher RE, Van der Sluijs JP, Van Berden CAJ, Baert, MR, Chan PL. Use of limiting-dilution type long-term marrow cultures in frequency analysis of marrow-repopulating and spleen colony-forming hematopoietic stem cells in the mouse. *Blood* 1991; 78:2527-2522.
- Plotsky PM. Pathways to the secretion of adrenocorticotropin: a view from the portal. *J Neuroendocrinol* 1991; 3:1-9.
- Poot M, Gibson LL, Singer VL. Detection of apoptosis in live cells by MitoTracker red CMXRos and SYTO dye flow cytometry. *Cytometry* 1997; 4:358-64.
- Porsolt RD Animal model of depression. *Biomedicine* 1979; 30:139-140.
- Queiroz MLS, Bincoletto C, Valadares MC, Dantas DCM, Santos, L.M.B., Effects of *Chlorella vulgaris* extract on cytokines production in *Listeria monocytogenes* infected mice. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2002; 24:483–496.
- Queiroz MLS, Rodrigues APO, Bincoletto C, Figueiredo CAV, Malacrida S. Protective effects of *Chlorella vulgaris* in lead-exposed mice infected with *Listeria monocytogenes*. *Int Immunopharmacol* 2003; 3:889–900.
- Queiroz MLS, Torello CO, Perhs SMC, Rocha MC, Bechara EJH, Morgano MA, Valadares MC, Rodrigues APO, Ramos AL. *Food and Chemical Toxicol* 2008; 46:3147-3154.
- Queiroz MLS, da Rocha MC, Torello, CO, de Souza Queiroz, J, Bincoletto C, Morgano MA, Romano MR, Paredes-Gamero EJ, Barbosa CM, Calgarotto AK. *Chlorella vulgaris* restores bone marrow cellularity and cytokine production in lead-exposed mice. *Food Chem Toxicol* 2011; 49(11):2934-2941.
- Quinteiro-Filho WM, Rodrigues MV, Ribeiro A, Ferraz-de-Paula V, Pinheiro ML, Sá LR, Ferreira AJ, Palermo-Neto J. Acute heat stress impairs performance parameters and induces mild intestinal enteritis in broiler chickens: Role of acute hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation. *J Anim Sci* 2012; 90(6):1986-94.
- Radley JJ, Arias CM, Sawchenko PE. Regional differentiation of the medial prefrontal cortex in regulating adaptive responses to acute emotional stress. *J Neurosci* 2006; 26:12967-12976.

- Radley JJ, Gosselink KL, Sawchenko PE. A discrete GABAergic relay mediates medial prefrontal cortical inhibition of the neuroendocrine stress response. *J Neurosci* 2009; 29:7330-7340.
- Ramos AL, Torello CO, Queiroz MLS. *Chlorella vulgaris* modulates immunomyelopoietic activity and enhances the resistance of tumor-bearing mice. *Nutrition and Cancer* 2010; 62(8), 1170-1180.
- Rasheed N, Ahmad A, Al-Sheeha M, Alghasham A, Palit G. Neurosci Lett. Neuroprotective and anti-stress effect of A68930 in acute and chronic unpredictable stress model in rats. *Neurosci Lett* 2011; 504(2):151-155.
- Reul JM, de Kloet ER. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* 1985; 117:2505-2511.
- Risold PY, Swanson LW. Chemoarchitecture of the rat lateral septal nucleus. *Brain Res* 1997a; 24:91-113.
- Risold PY, Swanson LW. Connections of the rat lateral septal complex. *Brain Res* 1997b; 24:115-195.
- Ritter S, Watts AG, Dinh TT, Sanchez-Watts G, Pedrow C. Immunotoxin lesion of hypothalamically projecting norepinephrine and epinephrine neurons differentially affects circadian and stressor-stimulated corticosterone secretion. *Endocrinology* 2003; 144:1357-1367.
- Rivier C, Vale W. Diminished responsiveness of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the rat during exposure to prolonged stress: a pituitary-mediated mechanism. *Endocrinology* 1987; 121:1320-1328.
- Rodriguez-Garcia I, Guil-Guerrero JL. Evaluation of the antioxidant activity of three microalgal species for use as dietary supplements and in the preservation of foods. *Food Chemistry* 2008; 108:1023–1026.
- Robertson LM, Kerppola TK, Vendrell M, Luk D, Smeyne RJ, Bocchiaro C, Morgan JI, Curran T. Regulation of c-fos expression in transgenic mice requires multiple interdependent transcription control elements. *Neuron*. 1995, 14:241-252.
- Roland BL, Sawchenko PE. Local origins of some GABAergic projections to the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus in the rat. *J Comp Neurol*. 1993, 332:123-143.
- Román, AG. La exposición simultánea al estrés y a la anfetamina revela sinergias negativas que afectan a la respuesta neuroendocrina y a la activación del sistema nervioso central. [Tesis Doctorado]. Barcelona (España): Universidad Autònoma de Barcelona, 2011.
- Romero LM, Sapolsky RM. Patterns of ACTH secretagog secretion in response to psychological stimuli. *J Neuroendocrinol* 1996; 8:243-258.

- Roosendaal B, Hernandez A, Cabrera SM, Hagewoud R, Malvaez M, Stefanko DP, Haettig J, Wood MA. Membrane-associated glucocorticoid activity is necessary for modulation of long-term memory via chromatin modification. *J Neurosci* 2010; 30:5037-5046.
- Roy RM, Malick MA, Clark GM. Increased haematopoietic stem cell survival in mice injected with tocopherol after X-irradiation. *Strahlentherapie* 1982; 158:312–318.
- Rutkowski M, Grzegorzczak K. Adverse effects of antioxidant vitamins. *Inter J of Occupat Med and Env Health* 2012; 25(2):105 – 121
- Sakanaka M, Shibasaki T, Lederis K. Corticotropin releasing factorlike immunoreactivity in the rat brain as revealed by a modified cobaltglucose oxidase-diaminobenzidine method. *J Comp Neurol* 1987; 260, 256-298.
- Saper C. Central autonomic system. In: Paxinos, G. (Ed.), *The Rat Nervous System* (2ed). Academic Press, Sidney 1995; 107-135.
- Sapolsky R, Rivier C, Yamamoto G, Plotsky P, Vale W. Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Science* 1987; 238(4826):522-4.
- Sapolsky RM. *Stress, the aging brain and the mechanisms of neuron death*. MIT Press, Cambridge 1992.
- Sapolsky RM, Romero LM, Munck AU. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. *Endocr Rev* 2000; 21:55.
- Sawchenko PE, Swanson LW, Steinbusch HW, Verhofstad AA. The distribution and cells of origin of serotonergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *Brain Res* 1983; 277:355-360.
- Sawchenko PE, Li HY, Ericsson A. Circuits and mechanisms governing hypothalamic responses to stress: a tale of two paradigms. *Prog Brain Res* 2000; 122, 61-78.
- Schneider P, Weber-Fahr W, Schweinfurth N, Ho YJ, Sartorius A, Spanagel R, Pawlak CR. Central metabolite changes and activation of microglia after peripheral interleukin-2 challenge. *Brain Behav Immun* 2012; 26:277–283.
- Sewer MB, Waterman MR. ACTH modulation of transcription factors responsible for steroid hydroxylase gene expression in the adrenal cortex. *Microsc Res Tech* 2003; 61:300-307.
- Sesack SR, Deutch, Roth RH, Bunney BS. Topographical organization of the efferent projections of the medial prefrontal cortex in the rat: an anterograde tract-tracing study with Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. *J Comp Neurol* 1989, 290:213-242.
- Selye, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature* 1936, 138, 32–34.

- Shibata S, Oda K, Onodera-Masuoka N, Matsubara S, Kikuchi-Hayakawa H, Ishikawa F, Iwabuchi A, Sansawa H. Hypocholesterolemic effect of indigestible fraction of *Chlorella regularis* in cholesterol-fed rats. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2001; 47(6):373-7.
- Shibata S, Natori Y, Nishihara T, Tomisaka K, Matsumoto K, Sansawa H, Nguyen VC. Antioxidant and anti-cataract effects of *Chlorella* on rats with streptozotocin-induced diabetes. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2003; 49(5):334-9.
- Shieh JH, Peterson RHF, Moore MA. Bacterial endotoxin regulation of cytokine receptors on murine bone marrow cells: in vivo and in vitro study. *J Immunol* 1994; 152: 859-866.
- Shivdasani RA, Orkin SH. The transcriptional control of hematopoiesis. *Blood* 1996; 87:4025-4039 1996.
- Singewald GM, Rjabokon A, Singewald N, Ebner K. The modulatory role of the lateral septum on neuroendocrine and behavioral stress responses. *Neuropsychopharmacology* 2011; 36:793-804.
- Smagin GN, Dunn AJ. The role of CRF receptor subtypes in stress-induced behavioural responses. *Eur J Pharmacol* 2000; 405:199-206.
- Solomon MB, Jones K, Packard BA, Herman JP. The medial amygdala modulates body weight but not neuroendocrine responses to chronic stress. *J Neuroendocrinol* 2010; 22:13-23.
- Souza-Queiroz J, Malacrida SA, Justo GZ, Queiroz MLS. Myelopoietic response in mice exposed to acute cold/restraint stress: modulation by *Chlorella vulgaris* prophylactic treatment. *Immunopharmacol. Immunotoxicol* 2004; 26:455– 467.
- Souza-Queiroz J, Torello CO, Palermo-Neto J, Valadares MC, Queiroz MLS. Hematopoietic response of rats exposed to the impact of an acute psychophysiological stressor on responsiveness to an in vivo challenge with *Listeria monocytogenes*: Modulation by *Chlorella vulgaris* prophylactic treatment. *Brain Behav and Immun* 2008; 20:1056-1065.
- Spangrude GJ, Heimfeld S, Weissman IL. Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 1988, 241:58–62.
- Spencer SJ, Day TA. Role of catecholaminergic inputs to the medial prefrontal cortex in local and subcortical expression of Fos after psychological stress. *J Neurosci Res* 2004; 78:279-288.
- Sponcer E, et al. Haemopoiesis: A practical approach. New York: Molineux Oxford University Press, 1993, 56-73.
- Sternberg EM. Neural-immune interactions in health and disease. *J Clin Invest* 1997; 100:2641–2647.

- Stevens-Felten SY, Bellinger DL. Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid organs. *Chem Immunol* 1997; 69: 99-131.
- Stone EA, Zhang Y, John S, Filer D, Bing G. Effect of locus coeruleus lesion on c-fos expression in the cerebral cortex caused by yohimbine injection or stress. *Brain Res* 1993; 603:181-185.
- Stratakis CA, Chrousos GP. Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. *Ann NY Acad Sci* 1995; 771:1–2.
- Streit, W.J. Microglia as neuroprotective, immunocompetent cells of the CNS. *Glia* 2002; 40:133–139.
- Sutherland HJ, Eaves CJ, Eaves AC, Dragowska W, Lansdorp, PM. Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro. *Blood* 1989; 74:1563, 1989.
- Swanson LW, Sawchenko PE, Rivier J, Vale WW. Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat brain: an immunohistochemical study. *Neuroendocrinology* 1983; 36:165-186.
- Sewer MB, Waterman MR. ACTH modulation of transcription factors responsible for steroid hydroxylase gene expression in the adrenal cortex. *Microsc Res Tech* 2003; 61:300-307.
- Sheng M, Greenberg ME. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron* 1990; 4:477-485.
- Shyu AB, Greenberg ME, Belasco JG. The c-fos transcript is targeted for rapid decay by two distinct mRNA degradation pathways. *Genes Dev* 1989; 3:60-72.
- Singh VK, Shafran RL, Jackson III WE, Seed TM, Kumar KS. Induction of cytokines by radioprotective tocopherol analogs. *Exp Mol Pathol* 2006; 81, 55–61.
- Spiegel A, Shvitiel S, Kalinkovich A, Ludin A, Netzer N, Goichberg P, Azaria Y, Resnick I, Hardan I, Ben-Hur H, Nagler A, Rubinstein M, Lapidot T. Catecholaminergic neurotransmitters regulate migration and repopulation of immature human CD34+ cells through Wnt signaling. *Nat. Immunol.* 2007, 8(10):1123-1131.
- Stephens A. Stress and the cardiovascular system: a psychosocial perspective. Stanford, SC and Salmon, P (Eds), *Stress: from synapse to syndrome* Academic Press, San Diego 1993; 119-141.
- Swanson LW, Simmons DM. Differential steroid hormone and neural influences on peptide mRNA levels in CRH cells of the paraventricular nucleus: a hybridization histochemical study in the rat. *J Comp Neurol* 1989; 285:413-435.
- Tabarowski Z, Gilson-Berry K, Felten SY. Noradrenergic and peptidergic innervation of the mouse femur bone marrow. *Acta Histochem* 1996; 98:453-457.

- Tanaka K, Konishi F, Himeno K, Taniguchi K, Nomoto K. Augmentation of antitumor resistance by a strain of unicellular green-algae, *Chlorella vulgaris*. *Cancer Immunol Immunother* 1984; 17:90–94.
- Tanaka K, Koga T, Konishi F, Nakamura M, Mitsuyama M, Himeno K, Nomoto K. Augmentation of host defense by a unicellular green alga, *Chlorella vulgaris*, to *Escherichia coli* infection. *Infect Immun* 1986; 53:267–271.
- Taves MD, Gómez-Sánchez CE, Soma KK. Extra-adrenal glucocorticoids and mineralocorticoids: evidence for local synthesis, regulation, and function. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011; 301:E11-24.
- Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 1961; 14: 213-222.
- Torello CO, Souza-Queiroz J, Oliveira SC, Queiroz MLS. Immunohematopoietic modulation by oral B-1,3-glucan in mice infected with *Listeria monocytogenes*. *Int Immunopharmacol* 2010; 10(12):1573-1579.
- Tracey KJ. The inflammatory reflex 2002; *Nature* 420:853– 859.
- Turnbull AV, Rivier CL. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev* 1999; 79:1-71.
- Vacek A, Rotkovská D, Bartonícková A. Radioprotection of hemopoiesis conferred by aqueous extract from chlorococcal algae (*Ivastimul*) administered to mice before irradiation. *Experimental Hematology* 1990; 18(3):234-237.
- Vahl TP, Ulrich-Lai YM, Ostrander MM, Dolgas CM, Elfers EE, Seeley RJ, D'Alessio DA, Herman JP. Comparative analysis of ACTH and corticosterone sampling methods in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2005; 289:E823-828.
- Valentino R J, Page M, Van Bockstaele E. and Aston-Jones, G. Corticotropin-releasing factor innervation of the locus coeruleus region: distribution of fibers and sources of input. *Neuroscience* 1992; 48:689-705.
- Van de Kar LD, Javed A, Zhang Y, Serres F, Raap DK, Gray TS. 5HT2A receptors stimulate ACTH, corticosterone, oxytocin, renin, and prolactin release and activate hypothalamic CRF and oxytocin-expressing cells. *J Neurosci* 2001; 21:3572-3579.
- Van Den Engh G, Bol S. The presence of a CSF enhancing activity in the serum of endotoxin-treated mice. *Cell Tiss Kinet* 1975; 8:579-587.
- Van Horssen J, Witte ME, Schreibelt G, de Vries HE. Radical changes in multiple sclerosis pathogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1812:141–150.
- Verfaillie CM, Benis A, Iida J, McGlave PB, McCarthy JB. Adhesion of committed human hematopoietic progenitors to synthetic peptides from the C-terminal

- heparin-binding domain of fibronectin: cooperation between the integrin alpha 4 beta 1 and the CD44 adhesion receptor. *Blood* 1994; 84:1802–1811.
- Viau V, Sawchenko PE. Hypophysiotropic neurons of the paraventricular nucleus respond in spatially, temporally, and phenotypically differentiated manners to acute vs. repeated restraint stress: rapid publication. *J Comp Neurol* 2002; 445:293-307.
- Vijayavel K, Anbuselvam C, Balasubramanian MP. Antioxidant effect of the marine algae *Chlorella vulgaris* against naphthalene-induced oxidative stress in the albino rats. *Mol Cell Biochem* 2007, 303:39–44.
- Vinson GP, Hinson JP, Toth IE. The neuroendocrinology of the adrenal cortex. *J Neuroendocrinol.* 1994, 6:235-246.
- Visser JWM, vanBekun DW. Purification of pluripotent hematopoietic stem cells: past and present. *Exp Hematol* 1990; 18: 248-256.
- Wagner CK, Eaton MJ, Moore KE, Lookingland KJ. Efferent projections from the region of the medial zona incerta containing A13 dopaminergic neurons: a PHA-L anterograde tract-tracing study in the rat. *Brain Res* 1995; 677:229-237.
- Walker F, Nicola NA, Metcalf D, Burgess AW. Hierarchical down-modulation of hemopoietic growth factor receptors. *Cell* 1985; 43:269-276.
- Walker E, Mittal V, Tessner K. Stress and the hypothalamic pituitary adrenal axis in the developmental course of schizophrenia. *Annu Rev Clin Psychol* 2008; 4:189-216.
- Webster EL, Tracey DE, Jutila MA, Wolfe SA Jr, De Souza EB. Corticotropin-releasing factor receptors in mouse spleen: identification of receptor-bearing cells as resident macrophages. *Endocrinology* 1990; 127(1):440-52.
- Weigent DA, Blalock JE. Interactions between the neuroendocrine and immune systems: common hormones and receptors. *Immunol Rev* 1987; 100:79-108.
- Weigent DA, Blalock JE. Associations between the neuroendocrine and immune systems. *J Leukocyte Biol* 1995; 58:37-150.
- Weigent DA., Blalock JE. Production of peptide hormones and neurotransmitters by the immune system. *Chem Immunol* 1997; 69, 1-30.
- Willians DA, Rios M, Stephans C, Patel, VP. Fibronectin and VLA-4 in hematopoiesis stem cell microenvironment interactions. *Nature* 1989; 352(6334):27-438-441.
- Willians DE, Fletcher FA, Lyman SO, De Vries P. Cytokine regulation of hematopoietic stem cells. *Semin Immunol* 1991; 3(6):391-396.
- Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol* 2006; 6:93–106.

- Wing EJ, Barczynski LC, Waheed A, Shaddock RK. Effect of *Listeria monocytogenes* infection on serum levels of colony-stimulating factor and number of progenitor cells in immune and nonimmune mice. *Infect. Immun.* 1985, 49:325–328.
- Wlodkowic D, Skommer J, Darzynkiewicz Z. SYTO probes in the cytometry of tumor cell death. *Cytometry A* 2008; 73(6):496-507.
- Woiciechowsky C, Asadullah K, Nestler D, Eberhardt B, Platzer C, Schoning B, Glockner F, Lanksch WR, Volk HD, Docke WD. Sympathetic activation triggers Systemic interleukin-10 release in immunodepression induced by brain injury. *Nat Med* 1998; 4:808–813.
- Woods SC, Seeley RJ, Porte, D, Schwartz M W. Signals that regulate food intake and energy homeostasis. *Science* 1998; 280:1378-1383.
- Wuarin JP, Dudek FE. Excitatory amino acid antagonists inhibit synaptic responses in the guinea pig hypothalamic paraventricular nucleus. *J Neurophysiol* 1991; 65:946-951.
- Yamada F, Inoue S, Saitoh T, Tanaka K, Satoh S, Takamura Y. Glucocorticoid hormones in the immobilization stress-induced increase of plasma glucose in fasted and fed rats. *Endocrinology* 1993; 132:2199-2205.
- Yamamoto Y, Yasumizu R, Amou Y, Watanabe N, Nishio N, Toki J, Fukuhara S, Ikehara S. Characterization of peripheral blood stem cells in mice. *Blood* 1996; 88:445-454.
- Yamazaki K, Allen TD. Ultrastructural morphometric study of efferent nerve terminals on murine bone marrow stromal cells, and the recognition of a novel anatomical unit: the neuro-reticular complex. *Am J Anat* 1990; 187(3):261-276.
- Zalcman SS, Green-Johnson JM, Murray L, Nance DM, Dyck D, Anisman H, Greenberg AH. Cytokine-specific central monoamine alterations induced by interleukin-1, -2 and -6. *Brain Res* 1994; 643:40–49.
- Zangenehpour S, Chaudhuri A. Differential induction and decay curves of c-fos and zif268 revealed through dual activity maps. *Mol Brain Res* 2002; 109:221-225.
- Zelena D, Mergl Z, Foldes A, Kovacs KJ, Toth Z, Makara GB. Role of hypothalamic inputs in maintaining pituitary-adrenal responsiveness in repeated restraint. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285:1110-1117.
- Ziegler DR, Cass WA, Herman JP. Excitatory influence of the locus coeruleus on hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis responses to stress. *J Neuroendocrinol* 1999; 11:361-369.
- Ziegler DR, Cullinan WE, Herman JP. Distribution of vesicular glutamate transporter mRNA in rat hypothalamus. *J Comp Neurol* 2002; 448:217-229.

- Zingg JM. Vitamin E: an overview of major research directions. *Mol Aspects Med* 2007; 28:400–422.
- Zhan Y, Lieschke GJ, Grail D, Dunn AR, Cheers C. Essential roles for granulocyte–macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and G-CSF in the sustained hematopoietic response of *Listeria monocytogenes*-infected mice. *Blood* 1998, 91:863–869.
- Zhang X, Okutsu M, Kanemi O, Nagatomi R. Effect of foot shock stress on the interferon- γ production of murine intestinal intraepithelial lymphocytes. *Immunology Lett* 2005; 100:170–176.
- Zhou XF, Livett BG. Effect of capsaicin-sensitive sensory nerves on plasma glucose and catecholamine levels during 2-deoxyglucose-induced stress in conscious rats. *Br J Pharmacol.* 1990; 100:523-529.

**Comissão de Ética na Experimentação Animal
CEEA/Unicamp**

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº 1997-1, sobre "Atividade moduladora da alga *Chlorella vulgaris* sobre alterações neuroendócrinas, imuno-hematológicas e comportamentais causadas pelo estresse agudo crônico", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Mary Luci de Souza Queiroz / Julia de Souza Queiroz, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 05 de outubro de 2009.

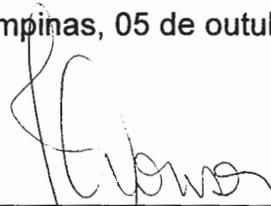
CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1997-1, entitled "Effect of *Chlorella vulgaris* on neuroendocrine and immuno-hematopoietic alterations and the behavior of mice exposed to chronic and acute stress", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on October 5, 2009.

Campinas, 05 de outubro de 2009.



Prof. Dr. Stephen Hyslop
Vice-Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva