



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

Este exemplar corresponde à redação final da Tese defendida pela candidata Heloisa Helena de Araujo Ferreira e aprovada pela comissão julgadora.

Gilberto A. Fernandes
8/6/90

INFLUÊNCIA DO HIPOCAMPO NA RESPOSTA IMUNE
DE RATOS ESTRESSADOS

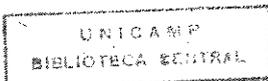
HELOISA HELENA DE ARAÚJO FERREIRA

PROF. DR. GILBERTO D'ASSUNÇÃO FERNANDES

ORIENTADOR

T/UNICAMP
F4 131

13150



LEMBRETE

"Se procurar bem, você acaba encontrando
não a explicação (duvidosa) da vida,
mas a poesia (inexplicável) da vida".

(CARLOS DRUMOND DE ANDRADE)

A meus pais e irmãos.

A meus filhos, Jurandyr e Tatiana.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Gilberto D'Assunção Fernandes, pela orientação, estímulo e confiança durante a execução deste trabalho.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Imunologia e aos seus professores pelos ensinamentos e incentivo.

Aos professores Drs. Leonilda Maria Barbosa dos Santos, Maria Marluce dos Santos Villela, Marta Krieger Azolini e Marcos Garcia Costa, pela análise prévia deste trabalho da qual resultaram valiosas críticas e sugestões.

Aos professores e funcionários do Depto. de Microbiologia e Imunologia, pela agradável convivência.

Ao professor Edgard Zanolli, pela amizade, apoio, solidariedade e pelas contribuições críticas que foram fundamentais na minha formação profissional e no desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores e funcionários do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental - FCM - Unicamp e aos colegas de laboratório Tereza Carvalho Baptiston, William Adalberto Silva, Roberto Cesar Stahl, David Antonio Silva e Laurione Cândido de Oliveira, pelo apoio técnico nos experimentos e pelo companheirismo em todos os momentos.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Imunologia e às

companheiras de laboratório Maria Cristina Orsini Tosi e Ana Lucia Erbolato Catalan, pelo apoio e amizade.

Ao Depto. de Estatística do IMEC e em especial ao Dr. Aluisio Jardim Dornellas de Barros, pela dedicação e eficiência no trabalho da Análise Estatística.

Ao Depto. de Anatomia Patológica-FCM e ao funcionário Jamilson Conceição Alves, pela colaboração na realização dos cortes histológicos.

Ao Centro de Informática em Saúde-FCM, na figura do Dr. Antonio Azevedo de Barros Filho, pela permissão do uso de equipamento para edição deste trabalho e aos funcionários Renata Maia e Jorge Airton Cicala, pela atenção.

À Diretoria de Apoio a Recursos Didáticos-FCM, na figura de Vilma Proide e ao funcionário Emilton Barbosa de Oliveira pela confecção das fotos e "slides".

A todos os amigos com os quais convivi durante estes anos e, especialmente, à minha filha Tatiana, companheira carinhosa e compreensiva dos momentos alegres e dos difíceis.

Este trabalho foi realizado no Laboratório Experimental do Departamento de Patologia Clínica do NMCE - FCM - Unicamp e contou com o apoio financeiro das seguintes instituições:

- Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior - CAPES.
- Pró-Reitoria de Pesquisas da UNICAMP.

A autora e o orientador externam seus agradecimentos às estas instituições.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
2.1 Modelo Experimental.....	19
2.1.1 Animais.....	19
2.1.2 Planejamento.....	19
2.2 Lesão do Hipocampo.....	20
2.2.1 Procedimento Cirúrgico.....	20
2.2.2 Controle da Lesão.....	22
2.3 Procedimentos de Estresse.....	27
2.4 Pesos dos órgãos.....	29
2.5 Sacrifício dos animais	29
2.6 Dosagem de Corticosterona.....	30
2.7 Resposta Imune Humoral.....	31
2.7.1 Imunização.....	31
2.7.2 Determinação do número de células formadoras de placas.....	31
2.8 Análise Estatística.....	32

3. RESULTADOS.....	33
3.1 Pesos dos Timos e das Adrenais.....	33
3.1.1 Efeitos da cirurgia nos grupos GS e GL..	33
3.1.2 Animais do grupo 1.....	34
3.1.3 Animais do grupo 2.....	35
3.1.4 Animais do grupo 3.....	35
3.2 Avaliação da resposta imune primária à hemácia de carneiro.....	36
3.2.1 Animais do grupo 1.....	36
3.2.2 Animais do grupo 2.....	39
3.2.3 Animais do grupo 3.....	41
3.3 Determinação dos níveis de corticosterona sérica.....	47
3.3.1 Animais do grupo 1 não imunizados.....	47
3.3.2 Animais do grupo 1 não imunizados.....	48
3.3.3 Animais do grupo 3 não imunizados.....	48
3.3.4 Animais imunizados com HC.....	50
4. DISCUSSÃO.....	54
5. RESUMO E CONCLUSÕES.....	69
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71

ABREVIACOES

SI	sistema imune
SNC	sistema nervoso central
RI	resposta imune
HHA	eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal
ACTH	hormônio adrenocorticotrófico ou corticotrofina
CRF	fator liberador de corticotrofina
GIF	fator de aumento de glicocorticóides
HC	hemácia de carneiro
CFP	células formadoras de placas
IL-1	interleucina 1
IL-2	interleucina 2
IFN	interferon
Con A	concanavalina A
PHA	fitohemaglutinina
PWM	mitógeno "pokeweed"

1. INTRODUÇÃO

Claude Bernard (1878) foi quem primeiro reconheceu a capacidade de resposta fisiológica dos animais a estímulos do meio ambiente ao descrever o "milieu intérieur" do animal, caracterizado por sua constância e o ambiente externo por sua variabilidade. Posteriormente, Walter Cannon (1929) denominou o conjunto de respostas biológicas necessário para manter o estado constante do organismo, de homeostasia. A estabilidade é obtida através de interações precisas entre os processos fisiológicos balanceadores que ocorrem dentro do organismo. Atualmente existe uma extensa discussão a respeito do conceito original de homeostasia, baseada na noção que define as flutuações que ocorrem no meio interno, a partir de estímulos do meio ambiente, como fazendo parte de sua essência biológica (Menna-Barreto e Marques, 1988).

Em 1936 o termo estresse, no sentido biológico, foi introduzido na medicina por Hans Selye. A descrição da resposta a diversos agentes nocivos ou a "Síndrome Geral de Adaptação", como primeiro a denominou, é proveniente da comprovação do papel do eixo hipófise-adrenal no processo de

adaptação, conseqüentemente nas reações exigidas por esta, que se constitui do estresse. A síndrome foi classificada como tendo três fases distintas: primária, uma reação de alarme; secundária, a fase de resistência e, se o estresse não for dissipado, a terciária, podendo alcançar a exaustão do sistema biológico. Em resumo, Síndrome como um todo parece representar uma tentativa generalizada do organismo de se adaptar às novas condições, de modo semelhante a reações gerais de defesa como, por exemplo, a resposta inflamatória.

O termo estresse tem sido usado essencialmente como agente que promove a ativação do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HHA). A resposta do sistema neuroendócrino a estímulos nocivos externos (designados estressores), envolve agentes humorais (epinefrina e norepinefrina) e hormonais, como glicorticoides em geral (Axelrod e Reisine, 1984).

A importância de se estudar a relação recíproca entre o Sistema Imune (SI) e o Sistema Nervoso Central (SNC) fundamentou-se nas observações clínicas de que o estado psicológico pode afetar diferentes parâmetros da resposta imune (RI) (Dantzer e Kelley, 1989). Os estudos conduzidos em indivíduos em situações de vida estressantes indicam uma clara relação entre o estresse e a maior incidência de doenças.

Pesquisas pioneiras de Bartrop e cols. (1977) em humanos

demonstraram a ocorrência de depressão da resposta de células T aos mitógenos Concanavalina A (Con A) e Fitohemaglutinina (PHA) durante o luto conjugal. Apesar de não existir diferença na resposta 2 semanas após a morte do cônjuge, a proliferação de células T foi significativamente diminuída na sexta semana, para ambos mitógenos (Bartrop et al, 1977).

Mais recentemente, Schleifer e cols. (1983) estudaram a RI em homens cujas esposas estavam em estado avançado de câncer de mama, sendo a avaliação realizada durante o luto. Uma supressão significativa da proliferação de linfócitos a PHA, Con A e Pokeweed (PWM) foi encontrada 1 a 2 meses após a perda persistindo, ainda, por 14 meses, embora de forma mais atenuada. Estes mesmos autores constataram também que a estimulação de linfócitos aos três mitógenos foi significativamente menor em pacientes depressivos hospitalizados, comparados com indivíduos não deprimidos (Schleifer et al, 1984).

A comprovação da ligação entre a evolução do curso de doenças autoimunes e fatores emocionais levaram à criação de uma nova área de estudo, a Psiconeuroimunologia, por Ader em 1981. Em doenças autoimunes como lupus eritematoso sistêmico e artrite reumatóide os sintomas podem ser potencializados por eventos de vida estressante (Deberdt et al, 1976; Baker e Breweton, 1981).

Black e cols. (1963) demonstraram que em indivíduos sob

sugestão hipnótica, a hipersensibilidade tardia (Reação à tuberculina) pôde ser abolida. Esta observação foi confirmada por outros pesquisadores (Smith e McDaniel 1983), reforçando a relevância de fatores psicológicos na RI.

Em pesquisas realizadas com estudantes, Locke e cols. (1984) observaram que o estresse per se não produz imunossupressão, mas sim a persistência deste associado a alterações psicológicas. Em período de exame (situação estressante), a atividade de células NK ("natural killer") apresentou-se diminuída somente nos colegiais que não possuíam boa estrutura psicológica. Portanto, pode-se inferir que a capacidade do indivíduo de enfrentar o agente estressor determina os efeitos deste no organismo.

Uma variedade de estímulos estressantes que alteram a RI podem ser estudados em modelos animais. Nestes modelos, entretanto, tem-se mostrado que a modulação do SI é dependente do procedimento metodológico para estressar o animal e, apesar da maioria das pesquisas apontarem para uma diminuição da RI, o estresse não é, necessariamente, imunossupressor (Griffin, 1989).

Keller e cols. (1981) procederam usando uma série graduada de agentes estressores, por imobilização e choque elétrico de baixo e alto nível. Verificaram um aumento progressivo de supressão tanto no número de linfócitos circulantes como na estimulação destes pela PHA,

paralelamente ao grau de intensidade do estressor. Os autores demonstraram uma relação entre a intensidade do estressor e o grau de supressão da imunidade.

O tempo de exposição ao estressor também é determinante na resposta. A noção de que exposições repetidas resultam em uma aparente adaptação do animal ao estressor, foi sugerida inicialmente por Gisler (1974). Em seus experimentos com exposições repetidas ao estressor, ao invés de uma redução da produção de anticorpos verificada em exposições agudas, constataram um aumento de resposta humoral. Mojan e Collector (1977) verificaram que a resposta a Con A encontrava-se suprimida quando os animais eram expostos ao estressor (som) por pouco tempo e aumentada nas exposições prolongadas.

O período de aplicação do antígeno constitui um relevante fator quando se avalia o efeito do estresse na função imunológica. Okimura e Nigo (1986) encontraram uma supressão na RI primária à hemácia de carneiro (HC) no baço e de níveis de anticorpos circulantes em camundongos, quando estes eram submetidos à contenção, antes da injeção do antígeno. Nenhuma mudança foi verificada quando o estresse foi aplicado após a imunização.

Outros fatores determinam o resultado do estímulo estressante na RI. Landenslager e cols. (1983) mediram a imunocompetência de ratos submetidos a choque elétrico da mesma intensidade, porém em um grupo o choque era escapável e

no outro não. Os experimentos foram planejados de maneira que os animais do grupo de choque escapável aprendessem a interromper o choque, enquanto um outro grupo recebia choque equivalente, porém sem poder controlá-lo. A proliferação de linfócitos induzida por PHA in vitro foi suprimida somente no grupo de choque inescapável. Estes resultados são consistentes com a hipótese de que a habilidade de mobilizar processo de adaptação ao estressor atenua seus efeitos nocivos, sugerindo, portanto, que além do grau de severidade do estressor a condição psicológica também é responsável pelas alterações linfoproliferativas.

Em estudos sobre o efeito da separação e perda, Reite e cols. (1981) verificaram uma diminuição da proliferação de linfócitos em filhotes de macacos separados de suas mães durante 14 dias. Esta supressão de proliferação de linfócitos a PHA e Con A foi restaurada após a reunião. Fatores sociais, como agrupamento, também podem alterar a RI. Camundongos isolados em gaiolas individuais tiveram maior nível de anticorpo em resposta à albumina bovina do que animais que são mantidos em grupo (Edwards et al, 1980).

Dentre os estudos de respostas comportamentais, destaca-se a constatação por Ader e Cohen (1975) de que a RI humoral podia ser condicionada pela injeção de ciclofosfamida (estímulo condicionado), associada com a ingestão de sacarina (estímulo não condicionado). Após cessar o efeito da droga imunossupressora, a capacidade de resposta imune humoral à HC era restaurada, porém esta pôde ser

suprimida novamente pela ingestão de nova dose de sacarina. Estes resultados foram repetidos e confirmados mesmo usando outros agentes imunossupressores (Rogers et al, 1976 e Wayner et al, 1978).

A imunidade celular e a atividade da célula NK também é condicionável, sendo que a técnica, acima referida, tem sido usada para prolongar a vida de camundongos com lupus eritematoso (Bovbjerg et al, 1982; Ghanta et al, 1985; Ader e Cohen, 1982).

Para explicar a crescente evidência da influência do SNC no SI, tem sido dada relevância às secreções neuroendócrinas mediadas pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal (HHA), o qual é ativado por uma série de estressores ambientais e psicológicos como exercícios físicos, dor, medo e ansiedade (Axelrod e Reisine, 1984). Estes fatores estressantes causam, a nível primário, a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) secretado na hipófise. Este estimula a síntese de glicorticóides (corticosterona nos ratos e camundongos) no córtex da adrenal ("feedback" positivo). A elevação do nível de glicorticóides na periferia inibe a liberação do ACTH hipofisário e, via "feedback" negativo, a liberação de corticosterona (Keller-Wood e Dallman, 1984). A liberação do ACTH é regulada pelo fator liberador de corticotrofina (CRF) que é sintetizado no núcleo paraventricular do hipotálamo. Este fator, via sistema porta-hipofisário, exerce seu efeito estimulatório na

liberação de ACTH (Rivier e Plotsky, 1986). A produção de ACTH em resposta ao estresse pode ser influenciada por outros hormônios e neuropeptídeos, tais como a norepinefrina neural (Mains e Eipper, 1981), o peptídeo intestinal vasoativo - VIP (O'Dorisio, 1987) e a vasopressina (Gibbs, 1986), que agem diretamente na hipófise.

Diferentes estudos têm demonstrado importante função das catecolaminas cerebrais na reação de estresse (Axelrod e Reisine, 1984). Ratos submetidos a uma série de estressores mostram diminuição na concentração e aumento da biosíntese da norepinefrina cerebral (Kvetňansky et al, 1977). É de grande relevância a observação de que a depleção das catecolaminas ocorre no núcleo paraventricular, dentre outros, tendo em vista a presença de neurônios produtores de CRF nesta região (Makara, 1985). Considerando-se que altos níveis de norepinefrina cerebral alteram a produção de CRF (Ganong, 1974; Szafarczyk et al, 1988), evidencia-se a interação entre as catecolaminas e os neurônios contendo CRF, a qual indica papel importante na mediação de respostas relacionadas com o estresse.

Desde os estudos iniciais de Selye (1946) é conhecido que a produção aumentada de glicocorticóide em decorrência do estresse, em várias espécies de animais, está associado à hipertrofia da adrenal, à involução de timo e baço e às úlceras gástricas. Dentre seus efeitos na maioria dos sistemas homeostáticos do organismo, os glicocorticóides são

importantes moduladores da RI (Bateman et al, 1989).

A supressão provocada pelo estresse tem sido relacionada com o aumento dos níveis deste hormônio (Joasoo e Mckenzie, 1976). Em geral, os glicocorticóides possuem pelo menos três efeitos sobre as células do sistema imune: destruição, inibição da função e alteração na redistribuição dos linfócitos circulantes (Claman, 1975). A estimulação de linfócitos com os mitógenos Con A, PHA e PWM apresentou-se diminuída pelo uso de glicocorticóides (Fauci e Dale, 1974; Goodwin et al, 1979). Entretanto, pesquisas mostraram resultados conflitantes em relação aos efeitos sobre as células B. Enquanto em algumas observou-se uma redução na síntese de anticorpos (Roess et al, 1982; Pruett et al, 1987) na presença de glicocorticóides, outras evidenciaram aumento desta síntese (Fauci et al, 1977; Cooper et al, 1979). Contudo, um ponto de concordância entre as pesquisas citadas é a verificação de que os linfócitos não estimulados por antígenos são mais sensíveis à inibição pelos glicocorticóides do que os linfócitos estimulados (Bateman e cols., 1989).

Evidências sugerem que os efeitos dos glicocorticóides ocorra pela inibição de síntese de mediadores da cooperação celular, tais como interleucina 1 (IL-1) (Snyder e Unanue, 1982), interleucina 2 (IL-2) (Gillis et al, 1979), gama interferon (γ IFN) (Munck et al, 1984) e bloqueio de expressão de molécula do MHC classe II (Snyder e Unanue, 1982). É possível que estas interferências ocorram durante a ligação

dos glicocorticóides aos seus receptores presentes nas células imunocompetentes.

O efeito imunossupressor dos glicocorticóides representam, na verdade, um mecanismo de defesa do organismo, como parte da Síndrome Geral de Adaptação, enunciada por Selye (1936). Munck e cols. (1984) concluíram em seus estudos, que o aumento dos glicocorticóides pelo estresse tende a proteger o organismo da injúria aos próprios componentes (self injury), atenuando os mecanismos imunes potencialmente destrutivos e prevenindo contra doenças autoimunes, inflamação aguda e destruição de tecidos. Portanto, o aumento em seu nível indica capacidade de adaptação, mas a elevação crônica, ao contrário, indica descompensação no processo de adaptação e distúrbios de saúde.

Sapolsky e Donnelly (1985) mostraram que ratos velhos, mais susceptíveis ao crescimento de tumores, possuem uma hipersecreção de corticosterona devido ao enfraquecimento do controle do "feedback" negativo a nível cerebral. A redução da população de receptores de corticosterona localizados no hipocampo, decorrente nos ratos velhos da perda de neurônios (Landfield et al, 1981) ou no estresse de uma deleção transitória, é responsável pela manutenção dos níveis elevados de corticosterona. Devido a atenuação dos efeitos dos glicocorticoides periféricos no hipocampo, retarda-se, assim, a inibição da secreção de corticosterona no fim do estresse (Sapolsky et al, 1987).

Apesar da clara evidência da importância dos glicocorticóides, existem outros mecanismos envolvidos na ação do estressor sobre a resposta imune. As catecolaminas, as quais encontram-se em níveis aumentados em situações estressantes (Axelrod e Reisine, 1984), exercem um efeito modulador no processo de formação de anticorpo (Sanders e Munson, 1984), sobre a atividade dos macrófagos (Hadden, 1983; Koff e Dunegan, 1985 e 1986) e mastócitos (Bourne et al, 1974).

Os peptídeos opiáceos que atuam sobre as células NK (Mathews et al, 1983; Schavit et al, 1984) e neuropeptídeos como a substância P (SP) e o peptídeo intestinal vasoativo (VIP), representam outra categoria de agentes imunoreguladores potenciais (Payan et al, 1984; McGillis et al, 1987; O'Dorisio, 1987).

Os sinais provenientes do cérebro através do sistema nervoso autônomo podem influenciar a função imunológica. Este sistema inerva diretamente o tecido parenquimatoso do timo, do baço, de linfonodos, apêndice e dos tecidos linfóides associados com o intestino, medula óssea e outros órgãos. A observação de que a denervação do baço (Besedovsky et al, 1977) ou simpactectomia química (Felten et al, 1985) leva ao aumento da imunocompetência, sugere que a inervação simpática dos órgãos envolvidos na resposta imune possa ser funcional. Durante a RI foi detectada uma diminuição no conteúdo de norepinefrina no baço (Besedovsky et al, 1979; Del Rey et al,

1982), reforçando a evidência da participação do sistema nervoso simpático na regulação de mecanismos imunológicos.

Atualmente é reconhecido que o sistema neuroendócrino e o SI estão estreitamente ligados e que o SI não somente recebe como também transmite sinais para o cérebro. Os mediadores que informam ao cérebro que um evento imune foi iniciado não estão ainda identificados, mas progressos substanciais têm sido feitos para o entendimento destes mecanismos (Dantzer e Kelley, 1989).

Os trabalhos pioneiros de Besedovsky e cols. (1975) demonstraram que os estímulos antigênicos provocam respostas semelhantes ao estresse, como elevação dos níveis plasmáticos da corticosterona. Outros estudos mostraram no pico da resposta imune uma diminuição no conteúdo de norepinefrina no núcleo paraventricular (Carlson et al, 1985; Besedovsky et al, 1983) e um aumento da atividade elétrica dos neurônios deste núcleo (Besedovsky et al, 1979). Posteriormente, estes efeitos foram observados e validados em ratos injetados com sobrenadantes de cultura de células de baço ou de linfócitos de sangue periférico humano estimulados com Con A (Besedovsky et al, 1985). Encontrou-se nestes sobrenadantes, nos quais IL-1 ou α - e β IFN não foram detectados e γ IFN foi removido, um produto que foi denominado GIF (fator de aumento de glicocorticóide). Este parece preencher os requisitos de um sinal aferente que provoca o aumento de concentração de corticosterona, agindo via eixo HHA (Besedovsky et al, 1985).

Por outro lado, produtos solúveis do SI como o hormônio tímico, timosina α_1 , e as interleucinas também são vistas como possíveis mediadores entre o SI e o SNC (Hall et al, 1985; Del Rey et al, 1987). A interleucina 1 (IL-1), descrita como relacionada a mecanismos de hipertermia, é agora vista possuir um papel de maior relevância na ativação do eixo HHA durante infecções. Os resultados de Del Rey e cols. (1987) demonstraram que a IL-1 é capaz de provocar elevação dos níveis de ACTH e corticosterona. Apesar da falta de definição do mecanismo exato pelo qual é estimulada a liberação destes hormônios nesta condição, os autores sugerem o envolvimento da hipófise e dos neurônios hipotalâmicos produtores de CRF. Considerando que níveis elevados de corticosterona plasmática inibem a produção de IL-1 e IL-2 (Snyder e Unanue, 1979; Gillis et al, 1979), um sinergismo entre os produtos da células do SI e o sistema neuroendócrino representaria um mecanismo de regulação da RI.

Blalock e cols. (1985) sugerem que o sistema imune pode agir como um órgão sensorial para estímulos externos que não podem ser detectados pelo sistema nervoso. Assim, o sistema imune reconhece estímulos como microorganismos e tumores, enquanto o sistema nervoso detecta a presença dos clássicos estímulos cognitivos. Uma comunicação bidirecional entre o SI e o SNC, seria por meio de moléculas sinalizantes e de receptores que são compartilhados por ambos os sistemas. Esta visão se baseia, conforme Weigent e Blalock (1987), nas evidências de que: a) linfócitos quando estimulados pelo

antígeno podem sintetizar β endorfinas e hormônios peptídicos neuroendócrinos biologicamente ativos; b) as células imunes possuem receptores para estes peptídeos; c) estes hormônios podem influenciar a função imune e d) linfocinas podem influenciar os tecidos neuroendócrinos.

A hipótese de que SNC e SI estejam funcionalmente ligados tem sido, portanto, sustentado por evidências relatadas em diversos trabalhos. Por outro lado, é postulado que alterações em um dos sistemas deve afetar o outro funcionalmente. Considerando estes aspectos, tem-se estudado as consequências imunológicas de lesões e estimulação elétrica provocadas em diferentes áreas do cérebro de modelos animais.

Existem evidências experimentais de que o hipotálamo, o principal centro de regulação do sistema endócrino e do sistema nervoso autônomo possa estar associado com a imunomodulação. A homeostase do organismo é mantida por mecanismos de controle tanto das funções endócrinas, ao regular a liberação de hormônios pela hipófise, assim como das funções do sistema nervoso autônomo. A influência hipotalâmica sobre diferentes funções da RI tem sido amplamente demonstrada. Assim, lesões eletrolíticas em diferentes áreas do hipotálamo causaram diminuição da mortalidade por anafilaxia (Luparello et al, 1964), diminuição nos níveis de anticorpos (Macris et al, 1970); Tyrey et al, 1972; Schiavi et al, 1975), alterações marcantes na arquitetura normal dos órgãos linfóides (Isakovic e

Jankovic, 1973), redução da atividade das células NK (Cross et al, 1980; Belluardo e cols., 1987) e diminuição da proliferação de células esplênicas à Con A (Cross et al, 1980). Estudos recentes indicam que a porção mediana do hipotálamo é o sítio de controle dos mecanismos de regulação de linfócitos T e B, sendo que porção mediana e a posterior parecem estar implicadas na modulação do linfócito T auxiliar (Katayama et al, 1987).

O hipotálamo tem conexões anatômicas com diferentes áreas do cérebro (Feldman et al, 1982). Através de projeções neurais aferentes para o hipotálamo, as estruturas extra-hipotalâmicas podem estimular ou inibir a secreção dos hormônios relacionados com o eixo HHA (Feldman et al, 1971; Krey et al, 1975). Dentre estas, tem-se demonstrado que vários componentes do sistema límbico como o hipocampo, o septo e o complexo amigdalóide, possuem papel importante nestas influências sobre o eixo (van Hartesveld, 1975; Dallman, 1979; McEwen, 1982). As influências inibitórias e estimulatórias interagem de uma maneira complexa para determinar os níveis de secreção de corticosterona, basal, no estresse e pós-estresse (Keller-Wood e Dallman, 1984).

Entretanto, pouco se tem investigado sobre a influência do hipocampo na RI. Os resultados relatados por Brooks e cols. (1982) mostraram que enquanto a lesão no hipotálamo produziu efeito inibitório na proliferação celular, lesões no hipocampo e no complexo amigdalóide resultaram em um aumento

da resposta linfoproliferativa de linfócitos de baço e de timócitos estimulados pela Con A. Estas observações são importantes no sentido de introduzir o conceito de que o sistema nervoso central é capaz tanto de facilitar como de inibir a resposta imunológica.

A função do hipocampo de inibir o eixo HHA tem sido demonstrada por estudos em que a destruição do hipocampo ou de seus eferentes levou a aumento da corticosterona tanto nos níveis basais como durante o estresse (Knigge, 1961; Feldman e Conforti, 1980; Wilson et al, 1980; Sapolsky et al, 1984b; Magariños et al, 1987). Entretanto, outros trabalhos contradizem os resultados encontrados por estes autores em relação aos níveis basais (Lanier et al, 1975; Iuvone e Hartesveldt, 1976). A estrutura da formação hipocampal é muito complexa e a natureza dos resultados depende da localização precisa da lesão. A análise detalhada por estimulação elétrica de sítios distintos do hipocampo demonstrou que o papel do hipocampo na função adrenocortical não é nem estruturalmente nem funcionalmente dominante nas suas diferentes regiões (Dunn e Orr, 1984).

O comprometimento do hipocampo na regulação do comportamento emocional foi demonstrado, inicialmente, pela observação de um aumento da reatividade emocional induzida por lesões causadas pelo vírus da raiva nesta estrutura (Papez, 1937). Admite-se atualmente sua participação não somente na elaboração do processo subjetivo central da emoção, como também na sua expressão (Vinogradova, 1975).

Observações como o paralelismo entre mudanças comportamentais resultantes de lesões hipocâmpais e variações nos níveis de corticosterona, evidenciaram o envolvimento desta estrutura na expressão do comportamento emocional, que ocorre pela resposta hipotalâmica-hipofisária-adrenal (Antelman e Brown, 1972; Pagano e Lovely, 1972).

Considerando a participação do hipocampo no comportamento emocional, utilizamos neste trabalho o modelo de contenção, que devido a imobilização forçada do animal, é uma combinação de um estímulo estressante tanto emocional (impedimento da reação de escape) como funcional, decorrente da interrupção do trabalho muscular ativo (Axelrod e Reisine, 1984).

Em conclusão, podemos verificar que a percepção do estímulo estressante provoca uma série de respostas neuroendócrinas que comprometem a função imunológica. Entretanto, os mecanismos destas interações não são inteiramente definidos e é provável que sejam intermediados por produtos comuns ao SNC e ao SI. Dentre estes, existem fortes sugestões da importância dos hormônios liberados pelo eixo HHA. Por outro lado, o hipocampo tem mostrado ter um papel relevante tanto na modulação deste eixo e na ação de "feedback" da secreção da corticosterona, como na percepção de estímulos estressantes. Por isso, acreditamos, que seria a estrutura chave para se entender os mecanismos pelos quais os estímulos psicológicos e ambientais adversos induzem

alterações na RI.

OBJETIVO: O presente trabalho teve como objetivo principal avaliar o papel do hipocampo na regulação da RI, pelas alterações desta resposta induzidas pelo estímulo estressante. Utilizamos como modelo experimental ratos com lesão no hipocampo dorsal e verificamos:

1 - Os níveis de corticosterona sérica - índice de alteração endócrina.

2 - A ocorrência de variação ponderal das adrenais e do timo - índice de atividade endócrina.

3 - A resposta imune primária à HC nas condições acima delineadas.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. MODELO EXPERIMENTAL

2.1.1. Animais: Ratos da linhagem Wistar, machos de 2 a 3 meses de idade, foram fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP. Estes animais foram mantidos por um período de adaptação de 15 dias no biotério do laboratório, sob condições ambientais controlados (fotoperíodo alterando cada 12 h = iluminação 6/18 h, e temperatura ao redor de 28°C). Após este período, os ratos eram mantidos em gaiolas individualmente, com ração e água de livre acesso.

2.1.2. Planejamento: Os animais foram utilizados em diferentes grupos:

GRUPO 1: animais normais submetidos ou não ao estresse por contenção.

GRUPO 2: animais submetidos à lesão cirúrgica simulada, os quais não sofreram lesão por eletrocoagulação no hipocampo e, posteriormente, expostos ou não ao estresse por contenção.

GRUPO 3: Animais submetidos à lesão cirúrgica estereotáxica por eletrocoagulação na área hipocampal, e, posteriormente, expostos ou não ao estresse por contenção.

A representação esquemática está ilustrada na Figura 1, onde utilizamos a seguinte simbologia:

GRUPO 1

- A) GN - grupo normal
- B) GNC - grupo normal submetido à contenção.

GRUPO 2

- A) GS - grupo submetido à lesão cirúrgica simulada
- B) GSC - grupo submetido à lesão cirúrgica simulada e à contenção.

GRUPO 3

- A) GL - grupo submetido à lesão cirúrgica no hipocampo.
- B) GLC - grupo submetido à lesão cirúrgica no hipocampo e à contenção.

2.2 LESÃO DO HIPOCAMPO

2.2.1 Procedimento Cirúrgico: Depois de anestesiado com éter, o rato foi colocado em Aparelho Estereotáxico do tipo Kriegh-Jonhson na posição mostrada na Figura 2. Com bisturi foi feita uma incisão longitudinal na pele e no tecido subcutâneo. Após a retirada do periósteo e com a calota craniana exposta o eletrodo de aço inoxidável foi centralizado no Bregma (cruzamento entre as suturas coronal e

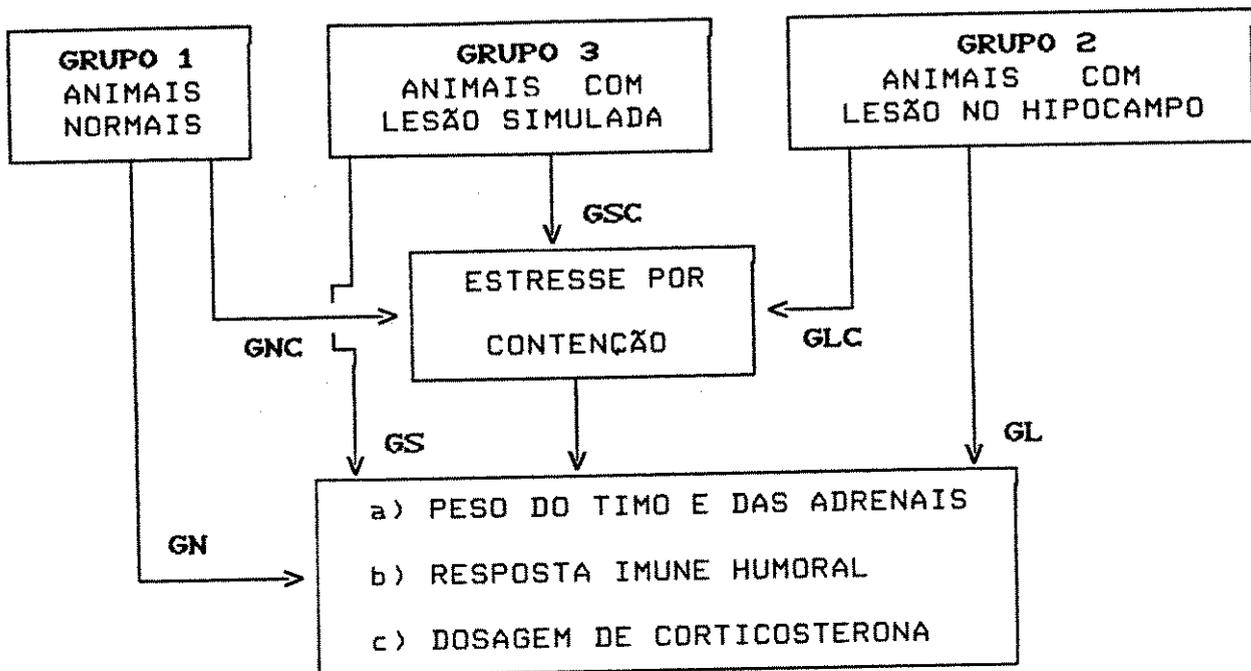


FIGURA 1 - Esquema do planejamento experimental.

GRUPO 1 - animais normais submetidos ou não estresse por contenção.

GN - grupo normal

GNC - grupo normal submetido à contenção

GRUPO 2 - animais submetidos à lesão cirúrgica simulada

GS - grupo submetido à lesão cirúrgica simulada

GSC - grupo submetido à lesão cirúrgica simulada e à contenção

GRUPO 3 - animais submetidos à lesão cirúrgica do tipo eletrocoagulação no hipocampo e, posteriormente expostos ou não ao estresse por contenção.

GL - grupo submetido à lesão cirúrgica no hipocampo

GLC - grupo submetido à lesão cirúrgica no hipocampo e à contenção

sagital), o qual foi considerado ponto de referência zero (Figura 3). Utilizando-se as escalas milimétricas do aparelho e seguindo-se as coordenadas dadas pelo Atlas de Pellegrino e Cushman (1967) foram determinadas as posições de perfuração bilateral para a introdução do eletrodo. Nestes locais a calota craniana foi perfurada com o auxílio de uma broca de dentista (Figura 4). De acordo com as coordenadas estereotáxicas (1,0mm posterior ao bregma e 2,5mm lateral à linha mediana) o eletrodo foi introduzido nos orifícios mostrados na Figura 4, a uma profundidade de 4,0 mm a partir da superfície da calota craniana (Figura 5). As lesões foram produzidas por eletrocoagulação, induzida por corrente de 2 mA durante 20 segundos, com o eletrodo ligado ao lesionador. A pele foi suturada e durante 10 dias os ratos receberam tratamento com antibiótico (Terramicina para animais - Pfizer), por via oral. Os animais foram utilizados nos experimentos após 30 dias.

Os ratos com lesão cirúrgica simulada (GS) foram submetidos ao mesmo procedimento cirúrgico do grupo com lesão cirúrgica no hipocampo (GL), com exceção da eletrocoagulação.

2.2.2 Controle da lesão: A extensão da lesão foi verificada histologicamente nos cérebros dos ratos, por seccionamento no plano coronal em Histocriótomo. Depois de corados com azul de toluidina 0,025%, os cortes histológicos de 50 micras de espessura foram observados em lupa estereoscópica.

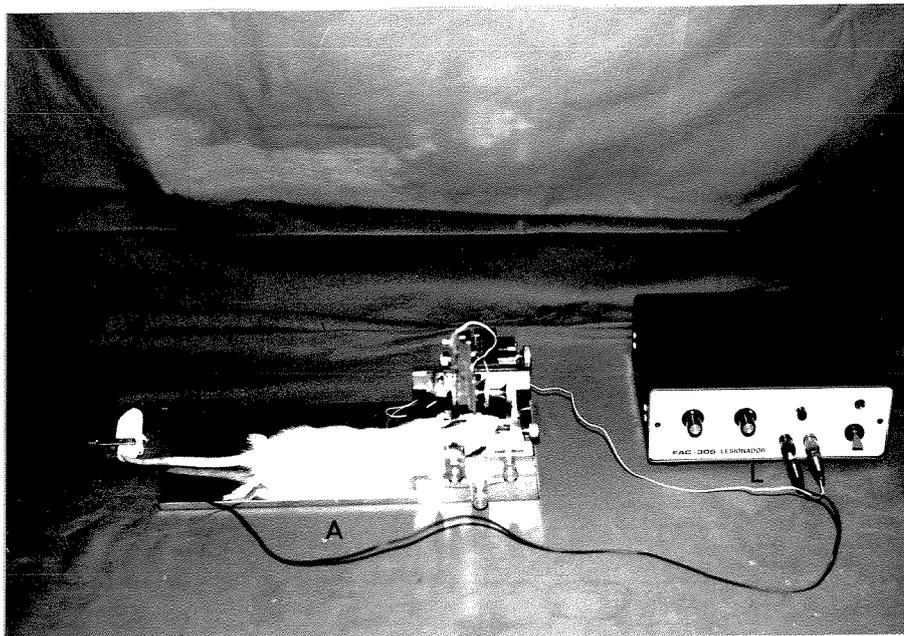


FIGURA 2 - Disposição do rato no aparelho estereotáxico de Kriegh-Johnson (A) para execução da lesão por eletrocoagulação, usando-se eletrodo ligado ao aparelho lesionador (L).



FIGURA 3 - Localização do bregma (mostrado com a seta), cruzamento das suturas coronal (C) e sagital (S) e ponto de referência zero para as medidas estereotáxicas.



FIGURA 4 - Perfurações bilaterais (mostradas com as setas) da calota craniana para introdução do eletrodo.



FIGURA 5 - Eletrodo introduzido, através da calota craniana, para lesão do hipocampo dorsal por eletrocoagulação. O posicionamento do eletrodo foi definido por medidas estereotáxicas.

A localização das lesões é mostrada esquematicamente na Figura 6, onde estão delineados conjuntamente, as áreas atingidas pela eletrocoagulação nos ratos de todos os grupos, desde a mínima até a máxima extensão. As regiões atingidas foram, de modo geral, a CA₁ e a porção adjacente da CA₂ do hipocampo dorsal e da fímbria. Entretanto, uma pequena porção do córtex pode ser destruída durante a perfuração e, ocasionalmente, o corpo caloso é atingido pela eletrocoagulação. Os resultados obtidos com animais cujas lesões tenham excedido a regiões determinada no hipocampo, foram excluídos dos grupos. Nenhum dano foi constatado nos cérebros dos ratos do grupo GS, a não ser destruição superficial do córtex, provocada pela broca.

2.3 PROCEDIMENTO DE ESTRESSE

Os ratos eram mantidos em caixa de contenção por 15 horas, no período noturno, à temperatura ambiente, em dois dias consecutivos. As caixas de contenção consistem de tubos cilíndricos perfurados e fechados nas extremidades, cujas dimensões impossibilitam qualquer movimento dos animais. Portanto, durante a contenção os animais permaneceram imobilizados e sem água e alimentação. No intervalo entre cada período, estes voltavam às suas gaiolas individuais e recebiam ração e água normalmente. Depois de submetidos ao primeiro período de contenção, os ratos eram mantidos em sala

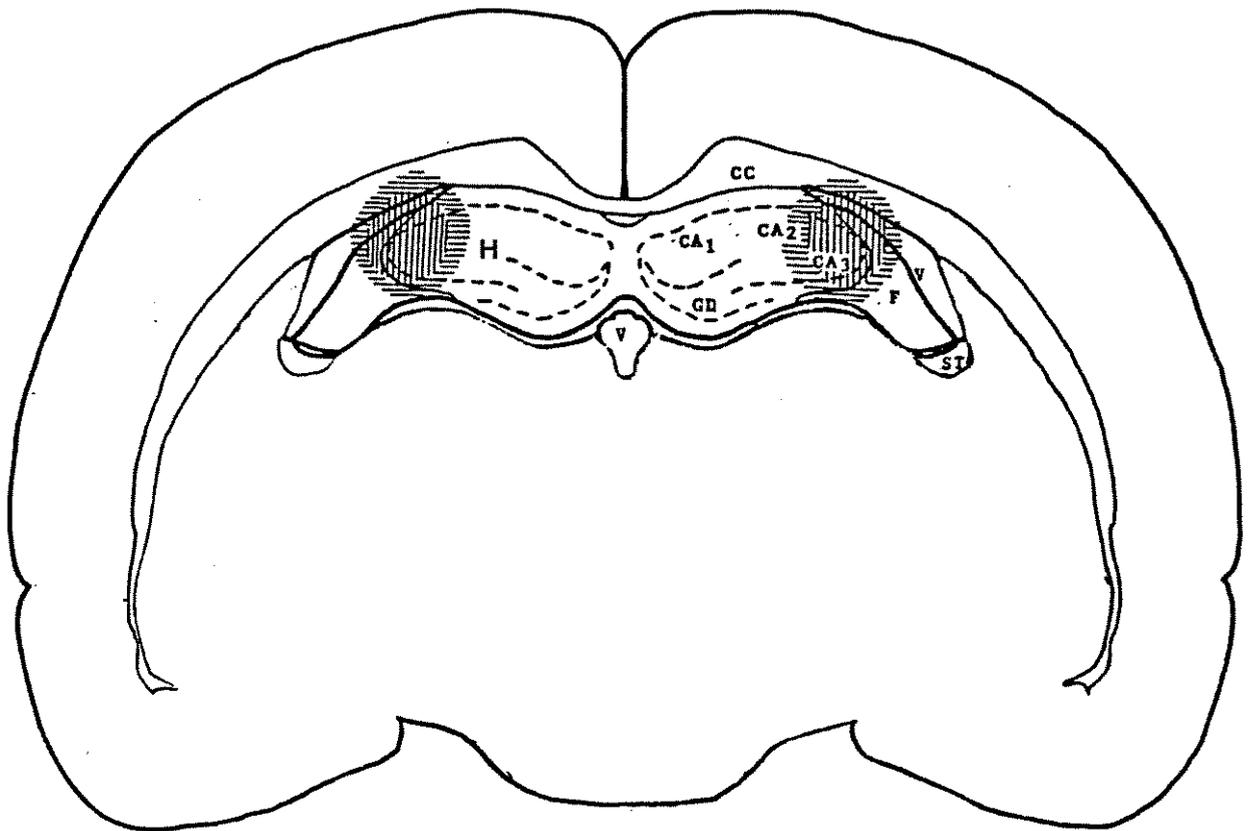


FIGURA 6 - Reconstrução esquemática do Complexo Hipocampal e localização da extensão máxima  e mínima  da lesão no hipocampo dorsal. Plano 4.2 do Atlas de Pellegrino e Cushman. Abreviações: CC, corpo caloso; H, hipocampo; GD, giro denteado; F, fímbria; V, ventrículo; ET, estria terminal; CA1 - CA2 - CA3, áreas do hipocampo.

separada daquela em que se encontravam os animais que não foram assim tratados. Desta forma tentou-se evitar que os ratos, já então estressados, pudessem afetar o comportamento dos animais normais e dos controles não estressados.

2.4 PESOS DOS ÓRGÃOS

O timo e as adrenais, removidos no sacrifício, eram limpos dos tecido adventícios e pesados em balança de precisão de 0,01 mg. Os pesos foram expressos em miligrama do órgão por grama do peso corporal do rato (peso relativo).

2.5 SACRIFÍCIO: Os ratos foram submetidos à decapitação por guilhotina, no laboratório experimental, no intervalo de 2 minutos pós retirada do Biotério anexo, para evitar a alteração do nível hormonal provocados por procedimentos potencialmente estressantes para os mesmos, tais como, manipulação, mudança de ambiente e pressentimento de perigo. A variação do nível de corticosterona devido ao ritmo circadiano, foi eliminada sacrificando-se os animais sempre no período matinal, entre 9 e 10 horas.

Depois da decapitação o sangue foi recolhido para a obtenção do soro. Os cérebros dos ratos operados foram removidos e congelados a -20°C para análise histológica da extensão da lesão. O timo e as adrenais foram removidos e determinados seus pesos. O baço dos ratos imunizados com hemácia de carneiro foram retirados para a determinação do

número de CFP.

2.6 DOSAGEM DE CORTICOSTERONA

O sangue recolhido no sacrifício era centrifugado por 10 minutos a 1.500 rpm, separando-se o soro que foi conservado a -20°C até o momento da dosagem hormonal. A concentração da corticosterona foi determinada por radioimunoensaio utilizando-se "Kit" específico para a dosagem deste hormônio em ratos e camundongos (RSL - ^{125}I Corticosterone Kit - Radiossay Systems Laboratories, INC - Carson, CA, USA). Este ensaio baseia-se na reação de competição entre o hormônio presente no soro e o hormônio marcado com isótopo de iodo (^{125}I), pelo sítio de combinação de um anticorpo específico para corticosterona. O complexo antígeno-anticorpo é precipitado e a radioatividade medida em contador de radiação gama. Os valores das dosagens são obtidos pela comparação a um curva padrão, que atingiu uma sensibilidade de 10 ng/ml, sendo o coeficiente de variação intra-ensaio de 4,6% e o inter-ensaio de 20%, obtido a partir de 10 ensaios. Esta curva foi preparada com padrões (de 25 a 500 ng) que acompanham o "kit". Os níveis circulatórios estão expressos em ng/ml e foram transformados em logarítmo para se obter uma distribuição simétrica e, portanto, mais próxima da distribuição normal.

2.7 RESPOSTA IMUNE HUMORAL

A resposta de anticorpos contra hemácia de carneiro foi avaliada nos diferentes grupos de animais, pelo método de células formadoras de placas (CFP) direto, descrito por Jerne e cols. (1974) e modificada por Dresser (1978).

2.7.1 Imunização: Cada rato foi imunizado com 5×10^8 hemácias de carneiro em um mililitro de solução fisiológica, por via intraperitoneal. As hemácias foram colhidas, assepticamente, em solução de Alsever e mantidas em geladeira por não mais de 10 dias. Depois de lavadas por três vezes em solução fisiológica preparou-se a suspensão a ser inoculada. Quando submetidos à contenção, os animais foram imunizados imediatamente após o segundo período da contenção.

2.7.2 Determinação do número de células formadoras de placas: Os animais foram sacrificados de 4 a 6 dias após a inoculação de hemácias de carneiro e seus baços foram removidos. As células esplênicas foram liberadas em meio mínimo essencial de Eagle (MME) contendo 1% de soro bovino fetal (SBF), utilizando-se homogeinizador manual de vidro. As células, após serem lavadas 3 vezes, foram ressuspensas em 3 ml do meio e a partir desta suspensão foram feitas diluições de 1/40 e 1/80. Em tubos de vidro de 30 x 5 mm foram pipetadas 50 μ l destas diluições, em duplicata, juntamente com 50 μ l de suspensão de hemácia de carneiro. Estes tubos foram transferidos para banho-maria a 42°C, adicionando-se 200 μ l

de agarose a 0,8% em MME sem SBF. O conteúdo do tubo foi homogeneizado e disposto em lâminas de vidro colocadas sobre placa aquecida à temperatura de 42°C. Após solidificação as lâminas foram colocadas invertidas em câmaras acrílicas apropriadas e incubadas em estufa úmida a 37°C por 2 horas. As câmaras foram então preenchidas com soro de cobaio (complemento) absorvido com hemácia de carneiro e diluído de 1:10 em tampão barbital. As câmaras foram incubadas novamente em estufa a 37°C pelo período de 1 hora e depois fixadas com paraformaldeído 4% em solução balanceada de fosfato (PBS), durante 20 minutos. Pela observação em lupa, foram contadas nas lâminas as regiões de halo ou placa de hemólise, correspondente à localização de um linfócito secretando anticorpo.

Os valores obtidos representam as médias aritméticas das contagens de cada diluição em duplicata, porém com os valores dobrados para as diluições de 1/80. Os resultados foram expressos como número de CFP por 10^6 células esplênicas viáveis.

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação da diferença estatística entre as médias das variáveis foi determinada usando ANOVA e o teste Duncan com nível de significância máximo de 5% (Zar, 1984).

A análise dos efeitos do estresse, da lesão e da interação entre estresse e lesão foi feita usando-se Análise Fatorial ("General Linear Models Procedure").

3. RESULTADOS

3.1 PESOS DOS TIMOS E DAS ADRENAIS

De acordo com diferentes modelos experimentais de indução de estresse em ratos, as modificações mais evidentes são variações no peso de órgãos, tais como, aumento das adrenais e, simultaneamente, diminuição do timo (Selye 1946; Hara et al, 1981)

Em nossos experimentos, estas variações foram verificadas nos 3 grupos de animais, quando submetidos ao estresse, imediatamente (dia 0) ou após 5 dias (dia 5) de contenção, sendo este último, o momento em que as alterações da resposta imunológica foram estudadas.

3.1.1 EFEITOS DA CIRURGIA NOS GRUPOS GS E GL

Para obtenção de animais com lesão no hipocampo dorsal e com lesão cirúrgica simulada são necessários procedimentos cirúrgicos, que podem causar modificações importantes nos indicadores de estresse utilizados neste trabalho, ou seja, os pesos dos órgãos e os níveis hormonais. Por isso,

verificamos, após trinta dias da cirurgia, os pesos das adrenais e do timo dos grupos de animais GS e GL.

Conforme Tabela 1, comparando-se os pesos das adrenais dos grupos GS e GL com os do grupo GN, observa-se que tanto a cirurgia simulada como a cirurgia com lesão no hipocampo não provocaram modificações no peso destes órgãos. Todavia, o grupo GL evidenciou diminuição significativa do peso do timo, em relação ao grupo GN.

3.1.2 ANIMAIS DO GRUPO 1

Comparando-se os resultados do grupo GN mostrados na Tabela 1 (adrenal = $0,1475 \pm 0,01$ e timo = $1,161 \pm 0,15$) com os resultados do grupo GNC, no dia 0, da Tabela 2 (adrenal = $0,222 \pm 0,01$ e timo = $0,924 \pm 0,06$), verificamos diferenças significativas no aumento do peso das adrenais e na diminuição de peso do timo, no grupo GNC.

A Tabela 2 evidencia que cinco dias após o período de contenção (dia 5), o peso das adrenais do grupo GNC está significativamente diminuído em relação ao dia 0 ($0,187 \pm 0,01$), que pode ser comparado ao peso do grupo GN ($0,1475 \pm 0,01$ - Tabela 1).

Após 5 dias o grupo GNC, apresenta tendência a uma involução do timo, porém os valores analisados não revelaram diferenças significativas em relação aos valores obtidos no

dia 0.

3.1.3 ANIMAIS DO GRUPO 2

O grupo de animais GSC apresenta logo após o período de contenção (Tabela 2 - dia 0) aumento significativo do peso das adrenais ($0,190 \pm 0,01$), quando comparados com o peso do grupo GS da Tabela 1 ($0,1481 \pm 0,01$). Porém, as diferenças dos pesos de timo entre os 2 grupos, não são significativas (GSC = $1,097 \pm 0,07$ vs $0,987 \pm 0,06$).

Conforme mostrado na Tabela 2, cinco dias após o período da contenção o peso das adrenais do grupo GSC não está significativamente diminuído em relação aos valores do mesmo grupo no dia 0. Contudo, existe uma tendência de declínio deste valor.

O timo do grupo GSC, no dia 5, também não apresenta alteração significativa de peso.

3.1.4 ANIMAIS DO GRUPO 3

Comparando-se o peso das adrenais do grupo GLC no dia 0 ($0,218 \pm 0,01$) mostrado na Tabela 2 com o peso do grupo GL ($0,1403 \pm 0,01$) da Tabela 1, verifica-se um aumento após a contenção dos animais. Contudo, em relação a atrofia do timo

no grupo GLC, nesta condição, não existe diferença significativa em relação ao grupo GL ($0,694 \pm 0,06$ vs $0,889 \pm 0,07$).

A comprovação do peso das adrenais no grupo GLC revela perda no período de 5 dias (Tabela 2).

A diferença nos pesos do timo entre o dia 0 e dia 5, não é de valor significativo.

3.2 AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE PRIMÁRIA À HEMÁCIA DE CARNEIRO

Está amplamente aceito que o estresse provoca alterações no SI, mas que estas são dependentes do modelo e metodologia usada (Griffin, 1989). Considerando esta variável, verificamos a eficácia do estímulo estressante utilizado em nossas pesquisas (contenção) sobre a RI primária de ratos normais.

3.2.1 ANIMAIS DO GRUPO 1

Os animais do grupo GN e GNC foram imunizados com 5×10^9 HC e a RI primária à HC avaliada, pela contagem de CFP nos dias 4, 5 e 6.

TABELA 1 - Pesos relativos das adrenais e dos timos de grupos de animais não submetidos à contenção: normais (GN); com lesão cirúrgica simulada (GS); com lesão cirúrgica (GL).

Animais	Pesos dos órgãos (mg/g peso corporal)	
	Adrenais	Timo
GN (8)	0,1475 ± 0,01	1,161 ± 0,15
GS (10)	0,1481 ± 0,01	0,987 ± 0,06
GL (8)	0,1403 ± 0,01	0,889 ± 0,07 ¹

Os resultados estão representados em média ± EPM do número de ratos que estão entre parênteses. O valor assinalado com 1 representa diferença em relação à comparação com o grupo GN, com nível de significância $p < 0,05$ (Teste de Duncan).

TABELA 2 - Pesos relativos das adrenais e dos timos de grupos de animais submetidos à contenção: Normais (GNC); com lesão cirúrgica simulada (GSC); com lesão cirúrgica (GLC).

Animais	Dias após imob.	Pesos dos órgãos (mg/g peso corp)	
		Adrenais	Timo
GNC (9)	0	0,222 ± 0,01	0,924 ± 0,06
(10)	5	0,187 ± 0,01 ¹	0,809 ± 0,06
GSC (9)	0	0,190 ± 0,01	1,097 ± 0,07
(9)	5	0,168 ± 0,01	1,088 ± 0,05
GLC (9)	0	0,218 ± 0,01	0,694 ± 0,06
(7)	5	0,164 ± 0,01 ¹	0,578 ± 0,05

Os resultados estão representados em média ± EPM do número de ratos que estão entre parênteses. Os valores assinalados com ¹ representam diferenças nos valores do mesmo grupo em relação ao dia 0, com nível de significância $p < 0,05$ (Teste de Duncan).

Verifica-se na Figura 7, que não existe diferença significativa nas respostas do grupo GN entre os dias 4 e 5, enquanto o grupo GNC apresenta diminuição significativa no dia 5, em relação à resposta do dia 4.

Comparando-se os valores obtidos no grupo GN nos dias 4, 5 e 6 com os valores do grupo GNC nestes mesmos dias, verifica-se somente no dia 5 uma diferença da resposta entre os 2 grupos. O grupo GNC apresenta uma diminuição significativa da resposta em relação ao grupo GN.

A resposta imune nos grupos GS e GL foram verificadas no dia 5.

3.2.2 ANIMAIS DO GRUPO 2

O número de CFP/ 10^6 células viáveis do baço está diminuído no grupo GSC, em relação à contagem do grupo GS (Figura 8).

Entretanto, a resposta do grupo GSC pode ser resultado de outros efeitos adicionais ao estresse. Por isto, para a interpretação da RI do grupo GSC foi usada a análise fatorial.

A avaliação dos resultados da contagem de CFP/ 10^6 células viáveis do baço obtidos nos grupos GN, GNC, GS e GSC

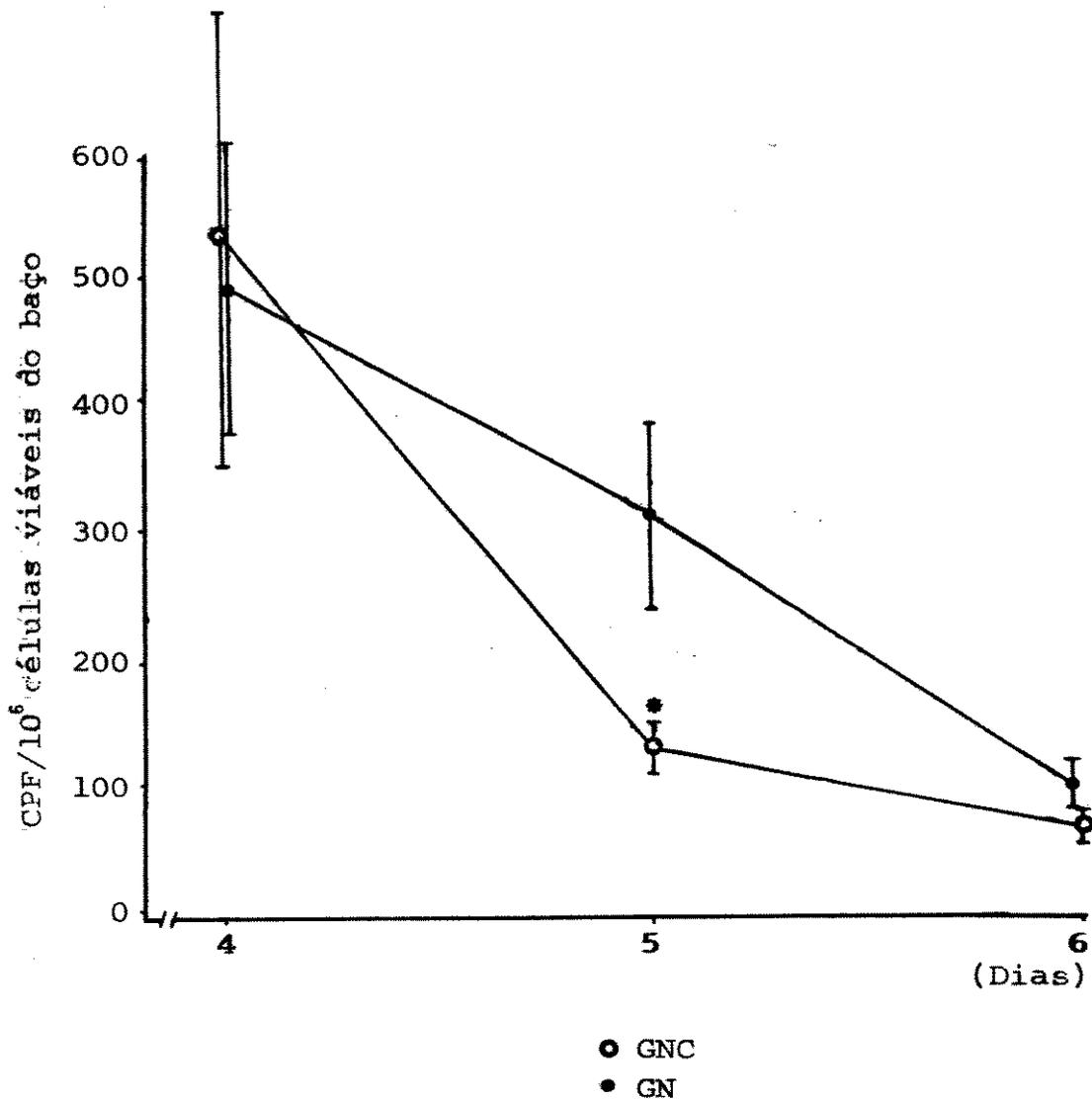


FIGURA 7 - Avaliação do número de CPF/10⁶ células viáveis do baço determinados nos diferentes dias em grupo de animais normais não submetidos à contenção (GN) ou que sofreram contenção (GNC), os quais foram imunizados com 5x10⁵ HC. Os resultados representam a média ± EPM das respostas.
 *p<0,05 em relação ao dia 4 do grupo GNC e ao dia 5 do grupo GN.

(Tabela 3), permite a análise do efeito global do estresse, da cirurgia simulada e da interação entre o estresse e a cirurgia no grupo GSC.

A estimativa destes efeitos mostra que a contenção no grupo GSC diminui a resposta imune primária, verificando-se somente a influência do estresse. Os demais efeitos não são significativos para um $p < 0,05$ (Tabela 4).

3.2.3 ANIMAIS DO GRUPO 3

De acordo com a Figura 8, os grupos GL e GLC apresentam, no dia 5, resposta imune primária à HC superior aos grupos GS e GSC. Portanto, a lesão no hipocampo provoca um aumento desta resposta, mas a diminuição consequente à contenção, observada nos grupos GNC e GSC, não ocorre no grupo GLC.

Em decorrência do exposto acima, avaliamos, por análise fatorial, a influência do efeito individual do estresse, da lesão e da interação entre o estresse e a lesão na RI primária do grupo GLC. Foram utilizados os resultados das contagens de CFP obtidas nos grupos GS, GSC, GL e GLC (Tabela 5).

A estimativa dos efeitos de cada um destes fatores é mostrada na Tabela 6. A lesão e a interação entre o estresse e a lesão mostram ter influência significativa na RI do grupo

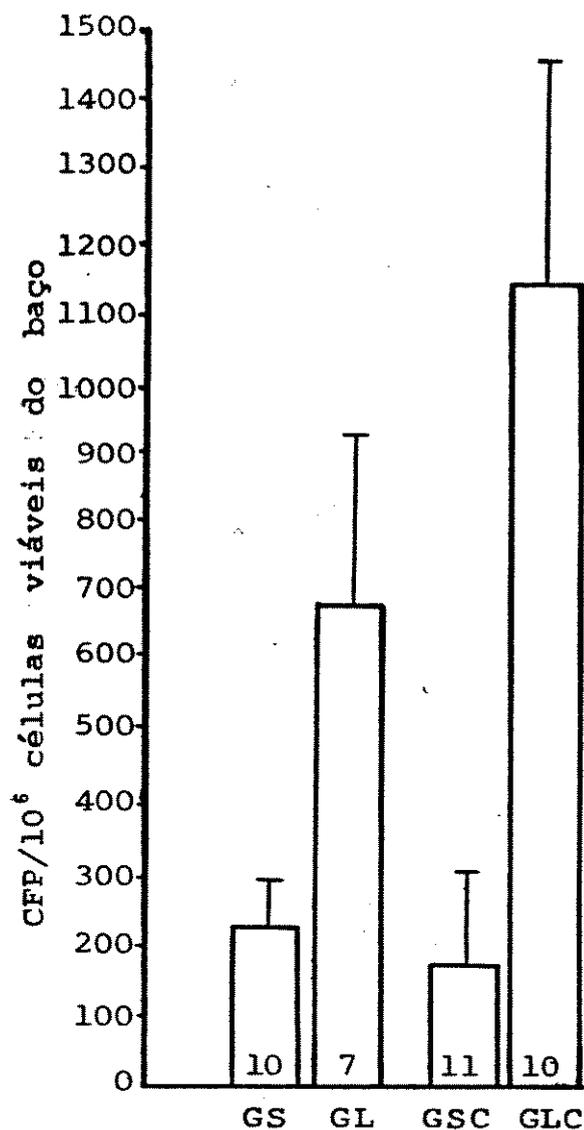


FIGURA 8 - Avaliação do número de CFP/10⁶ células viáveis do baço, determinadas no dia 5, nos grupos de animais com lesão cirúrgica simulada (GS) ou com lesão cirúrgica no hipocampo (GL) e animais destes grupos quando submetidos a contenção (GSC e GLC), os quais foram imunizados com 5.10⁸ HC. Os resultados representam a média ± EPM do número de animais mostrado na base da coluna.

TABELA 3 - Análise do número de CFP/10⁶ células viáveis do baço em grupo de animais com (GS) ou sem (GN) lesão cirúrgica simulada ou quando submetidos à contenção (GSC e GNC).

		CONTENÇÃO	
		NÃO	SIM
LESÃO CIRÚRGICA SIMULADA	NÃO	311,63 ± 71,67	125,36 ± 19,52
	SIM	224,03 ± 46,03	175,10 ± 38,96

Os resultados representam a média ± EPM.

TABELA 4 - Análise do efeito individual de diferentes fatores na resposta imune primária à HC em grupo de animais com lesão cirúrgica simulada submetidos à contenção (GSC).

EFEITO	ESTIMATIVA	P
ESTRESSE	-117,60	0,0208 ¹
CIRURGIA	-18,92	0,6995
ESTRESSE*CIRURGIA	-68,67	0,1666

A estimativa do efeito de cada fator foi obtida por análise fatorial, comparando-se os números de CFP/10⁶ células viáveis do baço dos grupos de animais: normais (GN), com lesão cirúrgica simulada (GS) e destes grupos submetidos à contenção (GNC e GSC). O valor assinalado com 1 representa efeito significativo para um $p < 0,05$.

TABELA 5 - Análise do número de CPF/10⁶ células viáveis do baço em grupos de animais com (GL) ou sem lesão cirúrgica (GS) ou quando submetidos à contenção (GLC e GSC).

		CONTENÇÃO	
		NÃO	SIM
LESÃO	NÃO	224,03 ± 46,03	175,10 ± 38,96
	SIM	671,06 ± 154,19	1140,91 ± 199,21

Os resultados representam a média ± EPM.

TABELA 6 - Análise do efeito individual de diferentes fatores na resposta imune primária à HC em grupo de animais com lesão cirúrgica no hipocampo submetidos à contenção.

EFEITO	ESTIMATIVA	P
ESTRESSE	210,46	0,1024
LESÃO	706,42	0,0010 ¹
ESTRESSE*LESÃO	259,40	0,0462 ¹

A estimativa do efeito de cada fator foi obtida por análise fatorial, comparando-se os números de CFP/10⁶ células viáveis do baço dos grupos de animais: com lesão cirúrgica (GL), com lesão cirúrgica simulada (GS) e destes grupos submetidos à contenção (GLC e GSC). Os valores assinalados com 1 representam efeitos significantes para um $p < 0,05$.

GLC. Entretanto, tendo-se em conta que o valor de significância do efeito da interação está muito próximo ao limiar do nível de significância de 5%, consideramo-la como tendo influência de menor importância biológica do que a lesão. O efeito do estresse não é significativo, indicando uma ausência da influência deste na RI primária dos animais do grupo GLC.

3.3 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE CORTICOSTERONA SÉRICA

Os títulos de corticosterona foram dosados, em nossos grupos experimentais, com os objetivos de: a) verificar se o animal encontrava-se estressado; b) pesquisar possíveis alterações na interação hipofisária-adrenal, causadas pela lesão no hipocampo dorsal; e, c) pesquisar alterações dos níveis deste hormônio durante a RI primária à HC.

Foram realizadas dosagens de corticosterona nos soros dos animais dos grupos 1, 2 e 3 na ausência do estímulo estressante (nível basal), no término do período de contenção (dia 0) e 5 dias após este procedimento (dia 5), em animais imunizados com HC e em animais não imunizados. Neste último grupo a intenção foi a de verificar a duração do efeito do estímulo estressante, ou seja, da contenção.

3.3.1 ANIMAIS DO GRUPO 1 NÃO IMUNIZADOS

Verifica-se no grupo GNC (Tabela 7) uma elevação do

nível de corticosterona no dia 0, em relação ao nível do grupo GN (nível basal).

O grupo de animais GNC mostra, após o período de 5 dias, níveis de corticosterona aumentados em relação ao nível basal. Não existe diferença significativa entre os valores do dia 0 e do dia 5 nos animais do grupo GNC.

3.3.2 ANIMAIS DO GRUPO 2 NÃO IMUNIZADOS

Os títulos de corticosterona no grupo GSC logo após a contenção, dia 0 (Tabela 7) não apresenta diferença significativa em relação ao nível basal (grupo GS).

Cinco dias depois do período de contenção os níveis tendem elevados, com diferença significativa em relação ao nível basal.

3.3.3 ANIMAIS DO GRUPO 3 NÃO IMUNIZADOS

Pelos valores de corticosterona dos grupos GL e GLC mostrados na Tabela 7, podemos observar que logo após o período de contenção (dia 0) o grupo GLC apresenta nível significativamente superior ao do grupo GL (nível basal).

TABELA 7 - Nível basal de corticosterona sérica, no término da contencão (dia 0) e 5 dias após, em grupos de animais dos grupos 1, 2 e 3 não imunizados: não submetidos à contencão (GN, GS e GL) ou grupos submetidos à contencão (GNC, GSC e GLC).

ANIMAIS	Corticosterona sérica (ng/ml)		
	Basal	Dia 5	
GRUPO 1	3,78±0,2 (8)-GN	4,73±0,2 (9) ² -GNC	4,84±0,1 (10) ² -GNC
GRUPO 2	4,50±0,3 (9)-GS	4,94±0,2 (10)-GSC	5,02±0,1 (9) ² -GSC
GRUPO 3	3,84±0,3 (8)-GL	5,30±0,2 (9) ² -GLC	4,06±0,3 (7) ^{1,2} -GLC

Os resultados estão representados em média ± EPM do número total ratos que estão entre parênteses. O valor assinalado com 1 representa diferença com nível de significância p<0,05 em relação à comparação dos grupos em função do dia 5; os assinalados com 2 representam p<0,05 em relação ao nível basal de cada grupo e o assinalado com 3 representa p<0,05 em relação ao dia 0 do mesmo grupo (Teste de Duncan).

No dia 5, o grupo GLC apresenta valor significativamente diminuído em relação ao dia 0, equivalente ao basal.

A comparação entre os valores do dia 5 nos grupos GNC, GSC e GLC, mostra que o nível de corticosterona do grupo GLC é significativamente inferior aos demais grupos.

Não existe diferença, de valor significante, entre os níveis basais dos 3 grupos de animais.

3.3.4 ANIMAIS IMUNIZADOS COM HEMACIA DE CARNEIRO

Na Tabela 8 estão mostrados os níveis de corticosterona sérica nos grupos de animais GN e GNC, nos dias 4, 5 e 6 após imunização com $5 \cdot 10^5$ HC. Verificou-se que na evolução temporal o grupo GN apresenta uma elevação de nível de corticosterona no dia 5, com diferença significativa em relação ao dia 4, que não persistiu no dia 6.

No grupo GNC não existe diferença significativa nos dias 4, 5 e 6.

Os resultados mostrados na Figura 9 (dia 5), ocasião da verificação do RI, não mostram diferença nos níveis de corticosterona sérica entre os grupos GN e GNC; GS e GSC e entre GL e GLC.

No entanto, os grupos GL e GLC apresentaram níveis de corticosterona significativamente diminuído em relação aos níveis dos grupos GN e GNC.

TABELA 8 - Determinação da corticosterona sérica em grupos de animais não submetidos à contenção (GN) ou submetidos à contenção (GNC), em diferentes dias de verificação da resposta imune.

ANIMAIS	Corticosterona sérica (ng/ml)		
	Dia 4	Dia 5	Dia 6
GN	4,18±0,2 (10)	5,06±0,3 (10) ²	4,69±0,2 (9)
GNC	5,19±0,2 (9) ¹	5,07±0,2 (9)	4,99±0,2 (10)

Os resultados estão representados em média ± EPM do número total ratos que estão entre parênteses. O valor assinalado com 1 representa diferença com nível de significância $p < 0,05$ em relação à comparação entre os grupos em função dos dias e o assinalado com 2 representa $p < 0,05$ em relação a cada grupo na evolução temporal de 4, 5 e 6 dias.

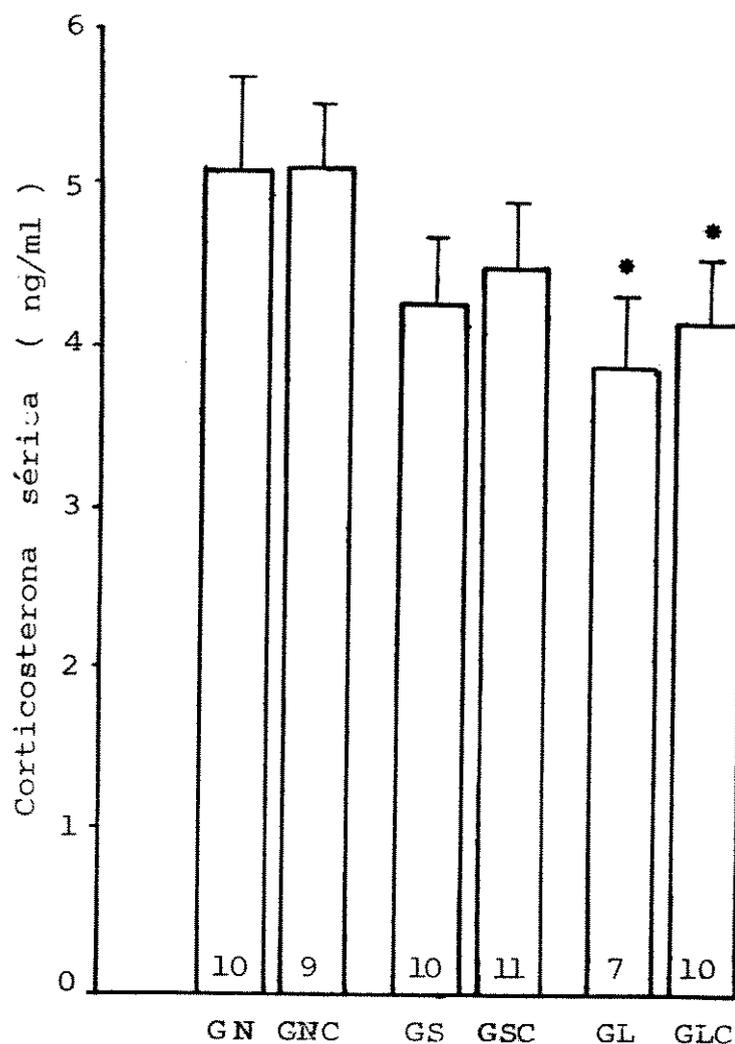


FIGURA 9 - Níveis de corticosterona sérica no dia da verificação da resposta imune (dia 5). Grupos de animais normais (GN), com lesão cirúrgica simulada (GS) ou com lesão cirúrgica no hipocampo (GL) ou estes grupos quando submetidos à contenção (GNC, GSC e GLC), foram sacrificados para verificação da RI e o sangue foi recolhido para dosagem de corticosterona sérica. Os resultados representam a média \pm EPM do número de ratos mostrados na base da coluna.

* $p < 0,05$ em relação ao grupo GN e GNC.

4. DISCUSSÃO

A literatura referente aos efeitos do estresse sobre as principais atividades biológicas, mostra que o agente estressor manifesta-se, principalmente, por meio do sistema endócrino, cujas funções são controladas pelo eixo HHA (Bateman et al, 1989). Estudos realizados com ratos demonstraram que a ativação deste eixo resulta, dentre outros eventos, no aumento dos níveis plasmáticos/séricos da corticosterona, hipertrofia da adrenal e involução do timo (Selye, 1946). O modelo de estresse por contenção tem mostrado ser efetivo em provocar estas manifestações típicas do estresse, além de exercer influências na RI (Okimura e Nigo, 1986).

Em nossa pesquisa, utilizamos os parâmetros peso das adrenais e do timo e títulos séricos de corticosterona com o objetivo de comprovar se a imobilização, segundo modelo descrito por Okimura e Nigo (1986), estava agindo como causadora de estresse em ratos. Após o período de contenção observou-se nos grupos de animais normais (GNC), uma elevação

dos níveis de corticosterona (Tabela 7), aumento de peso da adrenal e, simultaneamente, atrofia do timo (Tabelas 1 e 2), estando, portanto, em concordância com os dados da literatura (Selye, 1946; Hara et al, 1981). Com estes resultados adotamos este modelo experimental de indução de estresse para os demais experimentos de nosso trabalho.

O hipocampo tem sido descrito como a estrutura límbica mais diretamente relacionada com o eixo HHA (Feldman et al, 1982; Dunn e Orr, 1984). Sua característica principal está associada, modo geral, a uma função inibitória na secreção e liberação do ACTH, resultando, conseqüentemente, em diminuição dos níveis circulantes de corticosterona (Feldman et al, 1971; Krey et al, 1975; Wilson et al, 1980). Deste modo, pesquisamos se a lesão no hipocampo provocaria a liberação deste efeito inibitório sobre o eixo HHA, utilizando como medida os níveis de corticosterona.

Verificamos em nossos experimentos, como mostrado na Tabela 7, que os níveis basais de corticosterona em grupos com lesão cirúrgica no hipocampo (GL) não foram significativamente diferentes dos obtidos nos grupos normais (GN) ou com lesão cirúrgica simulada (GS). Portanto, a lesão não introduziu nenhuma alteração nos níveis basais de corticosterona. Resultados semelhantes foram também relatados por Lanier e cols., 1975; Iuvone e Hartesveldt, 1976, sugerindo a necessidade de uma reinterpretação dos efeitos regulatórios do hipocampo sobre o eixo HHA.

As observações de Dunn e Orr (1984) trouxeram importantes esclarecimentos na interpretação dos nossos resultados. Usando estimulação elétrica das regiões CA₃ e CA₄ (localizada no giro denteado) do hipocampo dorsal, os autores demonstraram que estas regiões possuem uma influência inibitória na produção de corticosterona, enquanto nenhuma variação do hormônio foi causada pela estimulação elétrica do córtex, do corpo caloso e da fímbria. Em contraste, a estimulação da região CA₁ provocou aumento de níveis de corticosterona.

Como podemos observar na Figura 6, a eletrocoagulação utilizada em nossos animais para causar lesão, atingiu não somente a região CA₃, como também porções da região CA₂, da fímbria, do corpo caloso e do córtex. Portanto, a heterogeneidade funcional destas áreas pode ter contribuído para a ausência de modificações de níveis basais, devido à extensão da lesão nos ratos, em nossos experimentos. Por isso, acreditamos que a lesão em uma das regiões tidas como inibitórias, ou seja, a CA₃, não foi capaz de causar a liberação do eixo HHA devido à destruição das outras áreas, que possuem diferentes influências na liberação de corticosterona.

A verificação dos pesos dos órgãos no grupo GL trinta e dois dias após a cirurgia (Tabela 1) mostra que a lesão no hipocampo não causou variações nos pesos das adrenais. Contudo, o mesmo não aconteceu com o timo o qual apresentou

diminuição de peso.

Isakovic e Jankovic (1973) encontraram uma considerável involução do timo, em ratos, trinta e dois dias após lesão no hipotálamo. Estes autores sugeriram que a atrofia do timo pode ser consequência de alterações a nível dos fatores neurosecretores, resultando em hipersecreção dos hormônios adrenocorticais. Por outro lado, a estimulação de regiões hipotalâmicas, relacionadas tanto com o sistema nervoso simpático como parassimpático (Shiotani e Ban, 1969), e a administração de noradrenalina (Wilkes e cols., 1964) induzem involução marcante do timo, proporcionando evidências do envolvimento das catecolaminas nos mecanismos que levam à atrofia deste órgão.

Em nossos experimentos, a lesão não modificou os níveis de corticosterona. Considerando-se as evidências acima descritas sugerimos o envolvimento de outros fatores, possivelmente, as catecolaminas.

O hipocampo está estreitamente relacionado com a regulação da secreção de corticosterona, influenciando sua liberação adrenocortical e sendo influenciado pelos níveis circulantes deste hormônio. Existem evidências de que o efeito de feedback dos glicocorticoides circulantes sejam mediados por receptores presentes em neurônios hipocampais (Sapolsky et al, 1984 b). A diminuição destes receptores resulta em uma potencialização na expressão do eixo HHA. Este

efeito é reversível, porquanto estes receptores se autoregulam (Sapolsky et al, 1984a). Com a posterior reexpressão destes normaliza-se, então, o processo de feedback da corticosterona, resultando em um retorno aos níveis basais (Sapolsky et al, 1984b). Este processo é importante para a elucidação de um dos componentes críticos do estresse que é a capacidade de inibir a resposta ao estressor, resultando na diminuição dos níveis circulantes da corticosterona (Munck et al, 1984).

Sapolsky e cols. (1984b) e Magariños e cols. (1987) mostraram que, apesar da integridade dos receptores em outras áreas (hipófise e hipotálamo), os ratos com lesão de hipocampo, com destruição de 60% dos receptores para corticosterona ou ablação total desta estrutura, possuem elevação sérica da corticosterona durante e após quinze a sessenta minutos da exposição ao agente estressor. Tais evidências indicam, segundo os autores, a relevância do envolvimento dos receptores para corticosterona localizados nos neurônios que foram destruídos pela lesão, neste mecanismo de regulação (Sapolsky et al, 1984b; Magariños et al, 1987).

Os experimentos conduzidos para verificar o efeito do estresse de contenção, apresentados na Tabela 7 (dia 0), demonstraram que a contenção nos animais lesados (grupo GLC) aumentou significativamente os níveis de corticosterona logo após a exposição, de modo semelhante aos resultados obtidos

por Magariños e cols., (1987). No entanto, no intervalo de 5 dias pós contenção, o grupo GLC apresentou títulos de corticosterona semelhante ao nível basal. Isto nos leva a inferir que em nossos experimentos, devido à sua natureza, a lesão não foi eficiente em destruir um número de neurônios capaz de produzir uma deleção permanente de receptores e a consequente hipersecreção de corticosterona. Como discutiremos posteriormente neste trabalho, outros mecanismos podem estar atuando na secreção de corticosterona no grupo GLC, nesta condição.

Os pesos dos órgãos do grupo GLC, logo após a contenção, não confirmaram as evidências da hipersecreção de corticosterona no estresse. Os resultados do grupo GLC da Tabela 2 (dia 0) comparados com os do grupo GL da Tabela 1, mostram que neste grupo de animais a hipertrofia das adrenais não foi acompanhada pela involução do timo. Como a lesão por se induz uma diminuição significativa do peso do timo, concluímos que, por já terem seus pesos alterados antes da contenção, as modificações causadas pelo agente estressor no timo não foram de valor significativo no grupo GLC.

A modulação da resposta imune pelo estresse consiste de um dos mais fortes argumentos para demonstrar a relação entre o sistema nervoso central e o sistema imune. O estresse está associado com o aparecimento de uma variedade de doenças, por provocar alterações no mecanismo de imunidade humoral e celular (Dantzer e Kelley, 1989). Estas alterações podem ser

decorrentes das modificações de níveis hormonais e/ou mediadas por neuropeptídeos e por neurotransmissores (Payan et al, 1984).

Em diferentes modelos experimentais, têm-se observado que vários fatores determinam os efeitos do estresse no sistema imune, tais como, o tempo de exposição (Mojan et al, 1977), a intensidade do estressor (Keller et al, 1981) e a tolerância individual ao estímulo (Landenslager et al, 1983).

Baseados nestas noções verificamos, inicialmente, a possibilidade de o estresse de contenção ser efetivo em modular a resposta imune nos animais normais (GN), em nossas condições experimentais. Concordando com os dados de Okimura e Nigo (1986), a contenção provocou uma diminuição significativa na produção de anticorpos à hemácia de carneiro no grupo GNC, no dia 5 após imunização (Figura 7).

Considerando a influência do sistema nervoso central sobre o sistema imune, também tem sido pesquisada a resposta imune em animais com lesão ou ablação de diferentes núcleos cerebrais. Enquanto lesões no hipotálamo suprimem uma variedade de atividades imunológicas (Schiavi et al, 1975; Cross et al, 1980; Belluardo et al, 1987), Brooks e cols. (1982) mostraram que lesão no hipocampo, amígdala e corpos mamilares aumentam a resposta de células esplênicas à Con A. Apesar destes valores retornarem a níveis normais dentro de quatorze dias, existe uma indicação, nestes experimentos, de uma influência potencializadora do hipocampo no sistema

imune.

 Avaliando os resultados expressos na Figura 8, observamos em nossos experimentos, aumento da resposta de anticorpo à HC em ratos com lesão cirúrgica no hipocampo (GL), confirmando a hipótese da ocorrência de um efeito facilitador da RI resultante desta lesão (Brooks et al, 1981). Entretanto, podemos verificar, pela mesma figura, que os ratos com lesão cirúrgica no hipocampo e expostos à contenção (grupo GLC) também apresentaram um aumento da RI, diferentemente do grupo GNC cuja resposta foi suprimida pelo estresse. Este fato nos sugeriu que a lesão interferiu nos mecanismos da resposta ao estresse mediados pelo hipocampo e, conseqüentemente, nos mecanismos de imunossupressão induzidos pelo estresse.

 Uma análise estatística baseada na significância da diferença na resposta imune não foi possível porque os grupos GS, GSC, GL e GLC apresentaram uma grande variância em relação a esta resposta. Em adição, os ratos dos grupos GSC e GLC estavam sujeitos a diferentes fatores, ou seja, o estresse e a cirurgia simulada ou a lesão cirúrgica no hipocampo, os quais poderiam ter influenciado estes resultados. Portanto, usamos a análise fatorial que, além de nos propiciar uma melhor interpretação dos resultados como o efeito isolado do estresse, da cirurgia com lesão simulada no grupo GSC e da lesão cirúrgica no grupo GLC e interação entre ambos na RI, viabilizava a junção de dois grupos.

Em conclusão, esta análise (Tabela 4) demonstrou que o estresse teve influência na RI primária do grupo GSC. Entretanto, a RI primária no grupo GLC não foi influenciada pelo estresse (Tabela 6). Um possível efeito da interação estresse*lesão necessita melhores confirmações. Contudo, como o efeito da lesão é superior ao da interação, consideramos o primeiro de maior relevância em relação à influência destes fatores na RI.

O estudo da relação entre a RI à HC e a corticosterona foi conduzido por determinação dos níveis deste hormônio no momento do sacrifício dos animais para a verificação da produção de anticorpos, em todos os grupos experimentais.

No grupo GN observamos um incremento dos valores em média da corticosterona no quinto dia após a imunização com HC (Tabela 8). Besedovsky e cols. (1985) demonstraram que esta resposta hormonal é devida à produção e liberação de fator (BIF) pelas células imunocompetentes, que induzem a elevação dos níveis de corticosterona após estímulos antigênicos (Besedovsky et al, 1983)

No grupo GNC encontramos uma relação positiva entre o estímulo estressante, a elevação dos níveis de corticosterona e a diminuição de RI (Tabela 7 e Figura 7). Como os níveis hormonais detectados logo após a contenção (dia 0) foram mantidos até o dia 5 (Tabela 7), podemos concluir que os animais do grupo GNC estiveram submetidos a estímulos

estressantes de alta intensidade, por um período efetivo para induzir os mecanismos pelos quais a corticosterona pode suprimir a RI.

A constatação de que os níveis séricos de corticosterona podem ser aumentados não somente pelo estímulo estressante, mas também pelo estímulo antigênico, é uma indicação de que ambos ativam o eixo hipófise-adrenal. De acordo com Besedovsky e cols. (1985), o efeito da hipercorticosterolemia pelo GIF exige uma ativação a nível hipofisário. Por outro lado, foi observada uma diminuição na concentração de noradrenalina no núcleo paraventricular do hipotálamo no quarto dia após a imunização (Del Rey et al, 1982) e duas horas após administração de GIF pré-sintetizado (Besedovsky et al, 1983). Estas comprovações sugerem que a ativação das células imunológicas e a subsequente liberação de fatores, levam a uma diminuição na velocidade de síntese de norepinefrina hipotalâmica (Besedovsky et al, 1983). De modo semelhante ao observado no estresse (Kvetňansky et al, 1978), é possível que os efeitos da depleção da norepinefrina central relacionem-se com o aumento de liberação de ACTH na hipófise e com o incremento de corticosterona circulante a níveis potencialmente imunossupressores (Rozsman et al, 1985).

Quando comparamos a RI no dia 5 entre os grupos GN e GNC (Figura 7), verificamos resposta suprimida no GNC em relação ao GN e, paradoxalmente, valores similares de corticosterona

sérica (Figura 9). Nossa interpretação para este achado é que quando o grupo GNC recebeu o estímulo antigênico, através da imunização com HC, os níveis de corticosterona já se encontravam elevados pelo estresse, potencializando os efeitos imunossupressivos. Estes podem ser detectados na RI deste grupo verificada no dia 5. No entanto, no grupo GN o processo de síntese e/ou liberação dos produtos das células imune e a conseqüente elevação do nível de corticosterona evoluiu no período de 4 a 5 dias até atingir o "steady state". Por isso, o aumento do nível do hormônio no grupo GN no dia 5 é paralelo ao aumento da RI verificada entre o 4^o e 5^o dia. Besedovsky e cols. (1985), mostraram que a administração em ratos de GIF preformado, resulta em uma resposta endócrina no intervalo de 30 a 60 minutos. Portanto, a diferença na RI entre os grupos GN e GNC relaciona-se provavelmente a uma alteração na liberação sequencial da corticosterona e também de sua ação, decorrentes das situações experimentais.

Os glicocorticóides constituem-se de produtos finais do eixo HHA e um dos principais mediadores da interação imune-neuro-endócrina, considerando seu papel no controle da expansão clonal de linfócitos relacionados com o antígeno ou da proliferação de clones de baixa afinidade para o antígeno (Besedovsky et al, 1985). Portanto, a ativação deste eixo pode ter como objetivo a modulação da própria RI. Isto seria uma conseqüência da ação dos fatores liberados pelas células imunes, como transmissores de informações a nível central,

sobre alterações no balanço homeostático provocados pela presença do antígeno. Logo, a ação dos produtos das células imunes nos processos cerebrais e a consequente intermediação do sistema nervoso central na resposta imune, por produtos neuroendócrinos, situa o sistema imune no contexto amplo e integrante dos vários mecanismos homeostáticos do organismo. O sistema imune, através dos linfócitos, e o sistema nervoso central, por meio da modulação exercida pelas estruturas do sistema límbico, poderiam funcionar como órgãos sensoriais a estímulos cognitivos/não cognitivos no desencadeamento de processos fisiológicos que visam proteger o organismo de estímulos nocivos externos ou internos, que levam ao desequilíbrio dos mecanismos homeostáticos.

Os animais com lesão cirúrgica no hipocampo (grupo GL) revelaram no dia da verificação da RI (Figura 9) níveis de corticosterona semelhantes ao nível basal do grupo GL não imunizados (Tabela 7). Portanto, a resposta hormonal do eixo HHA não foi alterada pela imunização com HC, ao contrário da variação observada no grupo GN (Tabela 8).

Consideramos a possibilidade de que a lesão tenha provocado um bloqueio na comunicação bidirecional entre o SI e o SNC ao impedir a ativação do eixo HHA por produtos liberados pelas células imunes e, portanto, a modulação da RI pela corticosterona.

Tais interpretações foram reforçadas pelos resultados

encontrados no grupo GLC, nos quais a contenção não foi capaz de induzir supressão da RI (Figura 8). Como determinado no grupo GN, o grupo GNC também apresentou níveis baixos de corticosterona, no dia da verificação da RI (Figura 9). O estudo feito pela análise fatorial confirmou que nesta ocasião os animais do grupo GLC não se encontravam estressados (Tabela 6).

Tendo-se em conta que logo após a exposição à contenção o grupo GNC apresentou níveis aumentados de corticosterona (Tabela 7 - dia 0), concluimos que a lesão tenha provocado modificações funcionais em diferentes áreas do hipocampo ou de outros sistemas do cérebro.

A adaptação ao estresse é um dos fatores que determina a influência deste no sistema imune. Gisler (1974) e Mojan e Collector (1977) observaram que a exposição prolongada ou repetida ao estressor leva a um aumento da produção de anticorpos e da resposta de linfócitos a Con A. Estes resultados sugeriram aos investigadores que após a imunossupressão inicial os animais se adaptaram ao efeito agudo do agente estressante, não respondendo mais a este estímulo.

Contudo, a prolongada elevação dos níveis de corticosterona no grupo GNC persistente até o 5^o dia pós contenção, comprova que nossos animais não se adaptaram ao estímulo estressante. Ressaltamos a possibilidade de não se

descartar a intervenção da lesão no hipocampo nos complexos mecanismos que levam à adaptação (Stone e Platt, 1982; Meyer, 1985).

Experimentos provenientes de estudos comportamentais demonstram que a lesão no hipocampo torna os ratos menos temerosos, isto é, menos ansiosos frente a uma situação aversiva. Isto foi constatado tanto pela ocorrência de diminuição dos níveis de corticosterona, como pela observação de suas reações comportamentais (Iuvone e Hartesveldt, 1976). Sobretudo consideramos que o hipocampo participa do fenômeno de memória. Lesões bilaterais no hipocampo e de outras estruturas límbicas alteram a capacidade de registrar novas informações (amnésia anterógrada) e, portanto, a capacidade de se recorrer prontamente à estas informações (Barbizet et al, 1963; Luria et al, 1971; Vinogradova, 1975).

Deste modo, deduzimos que pelo fato de não considerar a memória do estímulo nocivo, o rato lesado no hipocampo não manteve os mecanismos neuroendócrinos de resposta de defesa, dentre eles a elevação dos níveis de corticosterona, os quais seriam atuantes logo após a contenção. De modo geral, podemos concluir que em decorrência da perda da percepção da imobilização como um estímulo nocivo e, portanto, estressante, a normalização do nível de corticosterona propiciou um aumento da resposta imune.

A participação do hipocampo como estrutura modeladora do comportamento emocional somada aos resultados do presente

trabalho, indicam o envolvimento desta estrutura nos mecanismos centrais que determinam a supressão da resposta imune na presença de estímulos estressantes emocionais, contribuindo de maneira efetiva para o aparecimento e/ou agudização de doenças em situações de vida consideradas como desencadeadoras e/ou mantedoras de estresse.

5. RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho compreende o estudo de alterações na resposta imune decorrentes de modificações neuroendócrinas e endócrinas causadas pelo estresse e por lesão no hipocampo dorsal.

O objetivo desta pesquisa foi a investigação da importância do hipocampo na modulação do SI pelo SNC, tendo-se em consideração sua estreita relação com os mecanismos endócrinos que modulam a RI e que são desencadeados pelo estresse.

Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

1 - A lesão na região do hipocampo processada em nossos experimentos não foi efetiva em causar modificações nos níveis basais de corticosterona plasmática, pelo fato de ter destruído áreas inespecíficas para determinação de influências diferenciadas no eixo HHA.

2 - A diminuição do peso do timo decorrente da lesão no hipocampo não foi em consequência do mecanismo de ação da

corticosterona e estudos pormenorizados são necessários para identificar outros fatores envolvidos neste mecanismo.

3 - A lesão no hipocampo não influenciou os níveis de corticosterona plasmática logo após o estresse e sim na manutenção destes até o quinto dia, sugerindo, nesta ocasião, uma ausência de percepção ao estímulo estressante.

4 - O hipocampo dorsal exerce papel importante na modulação do SI pelo SNC desde que a lesão desta estrutura causou um aumento da resposta imune.

5 - A lesão no hipocampo e a alteração da resposta imunológica ao estresse, confirma os dados da literatura baseados em estudos neuroendócrinos de que o hipocampo é via moduladora para expressão de resposta aos estímulos estressantes.

6 - O aumento de resposta imune nos ratos lesados no hipocampo, submetidos ou não à contenção, pode ser atribuído, dentre outros fatores, à diminuição dos níveis de corticosterona e, portanto, de seus efeitos imunossupressivos. A ausência de percepção do estímulo estressante após cinco dias nestes ratos, evidenciado por baixos níveis de corticosterona e aumento da RI, reforça esta noção.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADER, R. and COHEN, N. (1975) Behaviorally conditioned immunosuppression. *Psychosom. Med.*, 37:333
- ADER, R. (1981) *Psychoneuroimmunology*, Academic Press, New York.
- ADER, R. and COHEN, N. (1982) Behaviorally conditioned immunosuppression and murine systemic lupus erythematosus. *Science*, 215:1534.
- ANTELMAN, S.M. and BROWN, T.S. (1972) Hippocampal lesion and shuttlebox avoidance behaviour: A fear hypothesis. *Physiol. Behav.*, 9:15.
- AXELROD, J. and REISINE, T.D. (1984) Stress hormones: their interaction and regulation. *Science*, 224:452.
- BARBIZET, J. (1963) Defect of memorizing of hippocampal-mamillary origin. *J. Neurol., Neurosurg. and Psychiat.*, 26:127.

- BARTROP, R.W.; LAZARIUS, L.; LUCKHURST, E. and KILOH, L.G.
(1977) Depressed lymphocyte function after bereavement.
Lancet, 1:834.
- BATEMAN, A.; SINGH, A.; KRAL, T. and SOLOMON, S. (1989) The
immune-hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Endocr. Rev.*,
10:92.
- BAKER, G.H.B. and BREWERTON, D.A. (1981) Reumatoid arthritis:
a psychiatric assessment. *Br. Med. J.*, 282:2014.
- BELLUARDO, N.; MUDO, G.; CELLA, S.; SANTONI, A.; FORNI, G.
and BINDONI, M. (1987) Hypothalamic control of certain
aspects of natural immunity in the mouse. *Immunology*,
62:321.
- BERNARD, C. (1878) Les Phenomenes de la Vie, *Librairie J-B.
Bailliere et Fils*, Paris, vol. 1:879.
- BESEDOVSKY, H.O.; SORKIN, E.; KELLER, M. and MÜLLER, J.
(1975) Changes in blood hormone levels during the immune
response. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 150:466.
- BESEDOVSKY, H.O.; SORKIN, E.; FELIX, D. and HAAS, H. (1977)
Hypothalamic changes during the immune response. *Europ. J.
Immunol.*, 7:323.
- BESEDOVSKY, H.O.; DEL REY, A.; SORKIN, E.; DA PRADA, M. and
KELLER, H.H. (1979) Immunoregulation mediated by the

- sympathetic nervous system. *Cell Immunol.*, 48:340..
- BESEDOVSKY, H.O., DEL REY, A.; SORKIN, E.; Da PRADA, M.; BURRI, R. and HONEGGER, C. (1983) The immune response evokes changes in brain noradrenergic neurons. *Science*, 221:564.
- BESEDOVSKY, H.O.; DEL REY, A.; SORKIN, E.; LOTZ, W. and SCHWULERA, V. (1985) Lymphoid cells produce an immunoregulatory glucocorticoid increasing factor (GIF) acting through the pituitary gland. *Clin. Exp. Immunol.*, 59:622.
- BLACK, S.; HUMPHREY, J.H. and NIVEN, J. (1963) Inhibition of the Mantoux Reaction by direct suggestion under hypnosis. *Br. Med. J.*, 346:1649.
- BLALOCK, J.E. and SMITH, E.M. (1985) A complete regulatory loop between the immune and neuroendocrine systems. *Fed. Proc.*, 44:108.
- BOURNE, H.; LICHTENSTEIN, L.; MELMON, K.; HENNEY, C.; WEINSTEIN, Y. and SHEARER, G. (1974) Modulation of inflammation and immunity by cyclic AMP. *Science*, 184:19.
- BOUBJERG, D.; ADER, R. and COHEN, N. (1982) Behaviorally conditioned suppression of a graft-versus-host response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:583..
- BROOKS, W.H., CROSS, R.J.; ROSZMAN, T.L. and MARKESBERY, W.R.

(1982) Neuroimmunomodulation: Neural anatomical basis for impairment and facilitation. *Ann. Neurol.*, 12:56.

CANNON, W.B. (1929) Organization for physiological homeostasis. *Physiol. Rev.*, 9:399.

CARLSON, S.L.; FELTEN, S.Y.; LIVNAT, S. and FELTEN, D.L. (1985) Immunization selectively decrease norepinephrine in the paraventricular nucleus of the hypothalamus at the time of the peak splenic plaque-forming cell response in adult CH3H mice. *Soc. Neurosc. Abstr.*, 11:663.

COPPER, D. A.; DUCKETT, M.; PETTS, V. and PENNY, P. (1979) Corticosteroid enhancement of immunoglobulin synthesis by pokeweed mitogen stimulated human lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.*, 37:145

CLAMAN, H.N. (1975) How Corticosteroids works. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 55(3):145..

CROSS, R.J.; MARKESBERY, W.R.; BROOKS, W.H. and ROSZMAN, T.L. (1980) Hypothalamic-immune interactions. I. The acute effect of anterior hypothalamic lesion on the immune response. *Brain Res.*, 196:79.

DALLMAN, M. (1979) *Interaction within the Brain-Pituitary-Adrenal System*, eds. Jones, M.; Gilliam, B.; Dallman, M.C.; Chattopadhyay, S., Academic, London pp. 149-162.

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

DEBERDT, R.; van HOOREN, J.; BIESBRONCK, M. and AVERY, W. (1976) Antinuclear factor positive mental depression: a single disease entity. *Biol. Psychiatry*, 11:69.

DEL REY, A.; BESEDOVSKY, H.O.; SORKIN, E.; Da PRADA, M. and BONDIOLOTTI, G.P. (1982) Immunoregulation mediated by the sympathetic nervous system, difference between immunological high and low responder animals. *Am. J. Physiol.*, 242:R30.

DEL REY, A.; BESEDOVSKY, H.O.; SORKIN, E. and DINARELLO, C.A. (1987) Interleukin 1 and glucocorticoids hormones integrate an immunoregulatory feedback circuit. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 496:85..

DRESSER, D.W. (1978) Assays for immunoglobulin secreting cells. In. Weir, D.M., ed. *Handbook of experimental immunology*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp. 28..

DUNN, J.D. and ORR, S.E. (1984) Differential plasma corticosterone responses to hippocampal stimulation. *Exp. Brain Res.*, 54:1.

- EDWARDS, E.A.; RAHE, R.H.; STEPHENS, P.M. and HENRY, J.P.
(1980) Antibody response to bovine serum albumin in mice:
the effects of psychosocial environmental change. *Proc.
Soc. Exp. Biol. Med.*, 164:478..
- FAUCI, A.S. and DALE, D.C. (1974) The effects of in vivo
hydrocortisone on subpopulations of human lymphocytes. *J.
Clin. Invest.*, 53:240
- FELDMAN, S.; CONFORTI, N. and CHOWERS, I. (1971) The role of
the medial forebrain bundle in mediating adrenocortical
responses to neurogenic stimuli. *J. Endocr.*, 51:745.
- FELDMAN, S. and CONFORTI, N. (1980) Participation of dorsal
hippocampus in the glucocorticoid feedback effect on
adrenocortical activity. *Neuroendocrinology*, 30:52.
- FELDMAN, S.; CONFORTI, N. and SIEGEL, R.A. (1982)
Adrenocortical responses following limbic stimulation in
rats with hypothalamic deafferentations.
Neuroendocrinology, 35:205..
- FELTEN, D.L.; FELTEN, S.Y.; CARLSON, S.L.; OLSCHOWKA, J.A.
and LIVNAT, S. (1985) Noradrenergic and peptidergic
innervation of lymphoid tissue. *J. Immunol.*, 135:755.
- GANONG, W.F. (1974) The role of catecholamines and
acetylcholine in the regulation of endocrine function.
Life Sci., 15:1401..

- GHANTA, V.K.; HIRAMOTO, R.N.; SALVASON, H.B. and SPECTOR, N.H. (1985) Neural and environmental influences on neoplasia and conditioning NK activity. *J. Immunol.*, 135:848.
- GIBBS, D.M. (1986) Vasopressin and oxytocin hypothalamic modulators of the stress response. *Psychoneuroendocrinology*, 11:131..
- GILLIS, S.; CRABTREE, G.R. and SMITH, K.A. (1979) Glucocorticoid induced inhibition of T-cell growth factor production. I. The effect on nitrogen-induced lymphocyte proliferation. *J. Immunol.*, 123:1624.
- GISLER, R.H. (1974) Stress and the hormonal regulation of the immune response in mice. *Psychother. Psychosom.*, 23:197.
- GLASSER, L.; HICKS, M.J.; LINDBERG, R.E. and JONES, J.F. (1981) The effect of in vivo dexamethasone on lymphocyte subpopulations: differential response of EA hu rosette-forming cells. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 18:22.
- GOODWIN, J.S.; MESSNER, R.P. and WILLIAM, R.C. (1979) Inhibitors of T-cell mitogenesis: effect of mitogen dose. *Cell Immunol.*, 45:303.
- GRIFFIN, J.F. (1989) Stress and immunity: a unifying concept. *Vet. Immunol.*, 20:263..

- HADDEN, J.W. (1983) Cyclic nucleotides and related mechanism in immune regulation: a minireview. In N. Fabris, E. Caraci, J. Hadden and N.A. Mitchinson (Editors), *Immunoregulation*, Plenum, New York, NY, pp. 201.
- HALL, N.R.; MCGILLIS, J.P., SPANGELO, B.L. and GOLDSTEIN, A.L. (1985) Evidence that thymosins and other biologic response modifiers can function as neuroactive immunotransmitters. *J. Immunol.*, 135:806.
- HARA, C., MANABE, K. and OGAWA, N. (1981) Influence of activity-stress on thymus, spleen and adrenal weights of rats: possibility for an immunodeficiency model. *Physiol. Behav.*, 27:243.
- ISAKOVIC, K. and JANKOVIC, B.D. (1973) Neuroendocrine correlates of immune response. II. Changes in the lymphatic organs of brain-lesioned rats. *Int. Arch. Allergy*, 45:385.
- IUVONE, P.M. and HARTESVELDT, C. (1976) Locomotor activity and plasma corticosterone in rats with hippocampal lesions. *Beh. Biol.*, 16:515..
- JERNE, N.K.; NORDIN, A.A.; FUJI, H.; KOROS, A.M.C. and LEFKOVITS, I. (1974) Plaque forming cells: methodology and theory. *Transpl. Rev.*, 19:130.
- JOASOO, A. and MCKENZIE, J.M. (1976) Stress and the immune

response in rats. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*,
50:659.

KATAYAMA, M.; KOBAYASHI, S.; KURAMOTO, N. and YOKOYAMA, M.M.
(1987) Effects of hypothalamic lesion on lymphocyte subsets
in mice. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 496:366..

KELLER, S.E.; WEISS, J.M.; SCHLEIFER, S.J.; MILLER, N.E. and
STEIN, M. (1981) Suppression of immunity by stress: effect
of a graded series of stresses on lymphocyte stimulation
in rat. *Science*, 213:1397..

KELLER-WOOD, M.E. and DALLMAN, M.F. (1984) Corticosteroid
inhibition of ACTH secretion. *Endocr. Rev.*, 5:1.

KNIGGE, K. (1961) Adrenocortical response to stress in rats
with lesions in hippocampus and amygdala. *Proc. Soc. Exp.
Biol. Med.*, 180:18.

KOFF, W.C. and DUNEGAN, M.A. (1985) Modulation of macrophage-
mediated tumoricidal activity by neuropeptides and
neurohormones. *J. Immunol.*, 135:350.

KOFF, W.C. and DUNEGAN, M.A. (1986) Neuroendocrine hormones
suppress macrophage-mediated lysis of herpes simplex
virus-infected cells. *J. Immunol.*, 136:705..

KREY, L.; LU, K.; BUTLER, W.; HOTCHKISS, J.; PIVA, F. and
KNOBIL, E. (1975) Surgical disconnections of the medial
basal hypothalamus and pituitary function in the rhesus

monkey. II GH and cortical secretion. *Endocrinology*, 96:1088.

KVETŇANSKY, R.; PALKOVITS, M.; MITRO, A.; TORDA, T. and MIKULAS, L. (1977) Catecholamines in individual hypothalamic nuclei of acutely and repeatedly stressed rats. *Neuroendocrinology*, 23:257.

KVETŇANSKY, R.; KOPIN, I.J.; SAAVEDRA, J.M. (1978) Changes in epinephrine in individual hypothalamic nuclei after immobilization stress. *Brain Res.*, 155:387.

LANDENSLAGER, M.L.; RYAN, S.M.; DRUNGAN, R.C.; HYSON, E.L. and MAYER, S.F. (1983) Coping and immunosuppression: inescapable but not escapable shock suppress lymphocyte proliferation. *Science*, 221:568.

LANDFIELD, P.; BASKIN, R. and PITLER, T. (1981) Brain-aging correlates: Retardation by hormonal-pharmacological treatments. *Science*, 214:581..

LANIER, L.P.; van HARTESVELDT, C.; WEIS, B.J. and ISAACSON, R.L. (1975) Effects of differential hippocampal damage upon rhythmic and stress-induced corticosterone secretion in the rat. *Neuroendocrinology*, 18:154.

LOCKE, S.E.; KRAUS, L.; LESERMAN, J.; HURST, N.W.; HEISEL, J.S. and WILLIAM, R.M. (1984) Life change stress, psychiatric symptoms and natural killer cell activities.

Psychosom. Med. , 46:441.

LUPARELLO, T.J.; STEIN, M. and PARK, C.D. (1964) Effect of hypothalamic lesion on rat anaphylaxis. *Am. J. Physiol.* , 207:911.

LURIA, A. R. (1971) Memory disturbances in local brain lesion. *Neurophysiology* 9:367.

MACRIS, N.T.; SCHIAVI, R.C.; CAMERINO, M.S.; STEIN, M. (1970) Effect of hypothalamic lesion on immune process in the guinea pig. *Am. J. Physiol.* , 219:1205..

MAGARIÑOS, A.M.; SOMOZA, G. and De NICOLA, A.F. (1987) Glucocorticoid negative feedback and glucocorticoid receptors after hippocompectomy in rats. *Horm. Metabol. Res.* , 19:105.

MAINS, R. and EIPPER, B. (1981) Coordinate equimolar secretion of smaller peptide products derived from pro-ACTH/endorphm by mouse pituitary tumor cells. *J. Cell. Biol.* , 89:21.

MAKARA, G. B. (1985) Mechanism by wich stressful stimuli activate the pituitary-adrenal system. *Fed. Proc.* , 44:149.

MATHEWS, P.M.; FROELICH, C.; SIBBIT, W.L. Jr. and BANKHURST, A.D. (1983) Enhancement of natural cytotoxicity by β -endorphin. *J. Immunol.* , 130:1658.

- McEWEN, B. (1982) in *Current Topics in Neuroendocrinology*, eds. Ganten, G. and Pfaff, D., Springer-Verlag, Berlin, vol. 2, pp. 1..
- McGILLIS, J. P.; ORGANIST, M. L. and PAYAN, D. G. (1987) Substance P and immunoregulation. *Fed. Proc.*, 46:196.
- MENA-BARRETO, L. S. and MARQUES, . (1988) Cronobiologia e Homeostasia. In *Introdução ao Estudo da Cronobiologia*. eds. Cippola-Neto, J.; Marques, N. and Menna-Barreto L. S. Ed. ícone, São Paulo, pp 253.
- MEYER, J.S. (1985) Biochemical effects of corticosteroids on neural tissues. *Physiol. Rev.*, 65:946.
- MOJAN, A.A. and COLLECTOR, M.I. (1977) Stress-induced modulation of the immune response. *Science*, 196:307..
- MUNCK, A.; GUYRE, P.M. and HOLBROOK, N.J. (1984) Physiological functions of glucocorticoides in stress and their relationship to pharmacological action. *Endocr. Rev.*, 5:25..
- O'DORISIO, M.S. (1987) Biochemical characteristics of receptors for vasoactive intestinal poly-peptides in nervous, endocrine and immune system. *Fed. Proc.*, 46:192.
- OKIMURA, T. and NIGO, Y. (1986) Stress and immune responses. I. Suppression of T cell function in restraint stressed

- mice. *Jpn. J. Pharmacol.*, 40:505..
- PAGANO, R. R. and LOVELY, R. H. (1972) Diurnal cycle and ACTH facilitation of shuttlebox avoidance. *Physiol. Behav.* 9:72.
- PAPEZ, J. (1937) A proposed mechanism for emotion. *Archs. of Neurol. Psychiat.*, 38:725
- PAYAN, D.G.; LEVINE, J.D. and GOETZL, E.J. (1984) Modulation of immunity and hypersensitivity by sensory neuropeptides. *J. Immunol.*, 132:1601.
- PELLEGRINO, L.J. and CUSHMAN, A.J. (1967) *Atlas of Rat brain* Meredith Publishing Company, New York..
- PRUETT, J. H.; FISHER, W. F.; DE LOACH, J. R. (1987) Effects dexamethasone on selected parameters of the bovine immune system. *Vet. Res. Commun.*, 11:305.
- REITE, M.; HARBECK, R. and HOFFMAN, A. (1981) Altered cellular immune response following peer separation. *Life Sci.*, 29:1133.
- RIVIER, C. L.; PLOTSKY, P. M. (1968) Mediation by corticotropin releasing factor (CRF) of adenohipophysial hormone secretion. *Annu. Rev. Physiol.*, 48:475.
- ROESS, D. A.; BELLONE, C. J.; RUTH, M. F. and RUTH, T. S. (1982) The effect of glucorticoids on mitogen stimulated B lymphocytes: Thymidine incorporation and antibody

- secretion. *Endocrinology*, 110:169.
- ROGERS, M.P.; REICH, P.; STROM, T.B. and CARPENTER, C. (1976) Behaviorally conditioned immunosuppression: replication of a recent study. *Psychosom. Med.*, 38:447..
- ROSZMAN, T. L.; JACKSON, J. C.; CROSS, R. J.; TITUS, M.J.; MARKESBERY, W.R. and BROOKS, W. H. (1985) Neuroanatomic and neurotransmitter influences on immune function. *J. Immunol.*, 135:769.
- SANDERS, V.M. and MUNSON, E.A. (1984) Beta adrenoreceptor mediation of the enhancing effect of norepinephrine on the murine primary antibody response in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 230:183..
- SAPOLSKY, R.M.; KREY, L.C. and McEWEN, B.S. (1984a) Stress down-regulates corticosterone receptors in a site-specific manner in the brain. *Endocrinology*, 114:287.
- SAPOLSKY, R.M.; KREY, L.C. and McEWEN, B.S. (1984b) Glucocorticoid-sensitive hippocampal neurons are involved in terminating the adrenocortical stress response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6174.
- SAPOLSKY, R.M. and DONNELLY, T.M. (1985) Vulnerability to stress-induced tumor growth increases with age in the rat: role of glucocorticoid hypersecretion. *Endocrinology*, 117:662.

- SAPOLSKY, R.M.; ARMANINI, M.; PACKAN, D. and TOMBAUGH, G.
(1987) Stress and glucocorticoids in aging. *Endocrinol. Metab. Clin.*, 16:965.
- SCHIAVI, R.C.; MACRIS, N.T.; CAMERINO, M.S. and STEIN, M.
(1975) Effect of hypothalamic lesion on immediate hypersensitivity *Am. J. Physiol.*, 228:596..
- SCHLEIFER, S.J.; KELLER, S.E.; CAMERINO, M.; THORTON, J.C. and STEIN, M. (1983) Suppression of lymphocyte stimulation following bereavement. *JAMA*, 250:374.
- SCHLEIFER, S.J.; KELLER, S.E.; MYERSON, A.T.; RASKIN, M.J.; DAVIS, K.L. and STEIN, M. (1984) Lymphocyte function in major depressive disorder. *Arch. Gen. Psychiatry*, 4:484.
- SELYE, H. (1936) A syndrome produced by Diverse Nocuous Agents. *Nature*, 138:32..
- SELYE, H. (1946) The general adaptative syndrome and diseases of adaptation. *J. Clin. Endocrinol.*, 6:117..
- SHAVIT, Y.; LEWIS, J.W.; TERMAN, G.W.; GALE, R.P. and LIEBESKIND, J.C. (1984) Opioid peptides mediate the suppressive effect of stress on Natural Killer cell cytotoxicity. *Science*, 223:188.
- SHIOTANI, Y. and BAN, T. (1969) Effect of a long-term electrical stimulations of the hypothalamus on

pituitary-target gland system in rabbits. *Med. J. Osaka Univ.*, 20:119.

SMITH, R.G. and McDANIEL, S.M. (1983) Psychological mediated effects on the delayed hypersensitivity reactions in humans. *Psychosom. Med.*, 45:65..

SNYDER, D.S. and UNANUE, E.R. (1982) Corticosteroids inhibit murine macrophage Ia expression and interlenkin I production. *J. Immunol.*, 129:1803..

STOCKDALE, P.H.G. and NIILLO, L. (1976) Production of bovine coccidiosis with Eimeria zuervii. *Can. Vet. J.*, 17:235.

STONE, E.A. and PLATT, J.E. (1982) Brain adrenergic receptors and resistance to stress. *Brain Res.*, 237:405.

SZAFARCZYK, A.; GUILLAUME, V.; CONTE-DEVOLX, B.; ALONSO, G.; MALAVAL, F.; PARES-HERBUTÉ, N.; OLIVER C. and ASSENMACHER, I. (1988) Central catecholaminergic system stimulates secretion of CRH at different sites. *Am. J. Physiol.*, 255:468.

TYREY, L. and NARBANDOV, A.V. (1972) Influence of anterior hypothalamic lesion on circulating antibody in rat. *Am. J. Physiol.*, 211:1269.

Van HARTESVELD, C. (1975) in *The Hippocampus*. An Comprehensive Treatise, eds. Isaacson, R. and Pbribam, K.,

Plenum, New York, vol. 2, pp. 375.

VINOGRADOVA, O. S. (1975) in *The Hippocampus*. Functional organization of the limbic system in the process of registration of information: facts and hypothesis. eds. Isaacson, R. and Pribram, K., Plenum Press, New York, vol. 1 pp 3.

WAYNER, E.A.; FLANNERY, G.R. and SINGER, G. (1978) The effects of taste aversion conditioning on the primary antibody response to sheep red blood cells and Brucella abortus in the albino rat. *Physiol. Behav.*, 21:995.

WEIGENT, D.A. and BLALOCK, J.D. (1987) Interactions between the neuroendocrine and immune systems: common hormones and receptors. *Immunol. Rev.*, 100:79.

WILKES, T.E.; IMRIE, S.T. and BRUNSON, M.D. (1964) Effects of epinephrine on newborn rabbits. *Am. J. Pathol.*, 43:825.

WILSON, M.M.; GREER, S.E. and ROBERTS, L. (1980) Hippocampal inhibition of pituitary adrenocortical function in female rats. *Brain Res.*, 197:433..

ZARR, J. H. (1984) in *Biostatistical Analysis*. Prendice-Hall, Englewood Cliffs, N. J. USA.