

Este exemplar corresponde à redação final da
tese defendida pela candidata Maria Cristina
Orsini Tosi e aprovada pela comissão julgadora
Gilberto A. Fernandes

SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO

MARIA CRISTINA ORSINI TOSI

A INFLUÊNCIA DO COMPLEXO AMIGDALÓIDE
NA RESPOSTA IMUNE PRIMÁRIA DE RATOS.

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
da Universidade Estadual de Campinas para
obtenção do grau de Mestre em Ciências na
área de Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Gilberto D'Assunção Fernandes

CAMPINAS - SP

1990

T639i

12340/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Trabalho desenvolvido no Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental do Departamento de Patologia Clínica - FCM - UNICAMP, que contou com o apoio financeiro dos seguintes órgãos:

UNICAMP - Pró-Reitoria de Pós-Graduação - PRPG

FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior

Ao meu marido, não apenas pela constante compreensão e carinho nesta fase de minha vida mas também pelas inúmeras horas de trabalho na compilação do dados.

Obrigada ...

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Gilberto D'Assunção Fernandes, pela dedicação e orientação científica durante a execução deste trabalho, meu especial agradecimento.

Ao Prof. Dr. Renato M. E. Sabatini, Profª Dra. Leonilda M. Barbosa dos Santos, Profª Dra. Elenice A. de Moraes Ferrari e ao Prof. Dr. Paulo M. Ferreira Araújo, pela discussão prévia da tese e sugestões apresentadas.

Aos funcionários: Roberto César Stall, Tereza Carvalho Baptiston, William Adalberto Silva, David Antonio Oliveira e Laurione Cândido de Oliveira, obrigada pelo apoio técnico e solidariedade.

Aos colegas e amigos do Departamento de Microbiologia e Imunologia, em especial a Ana Lúcia Erbolato Catalan e Heloísa Helena Araújo Ferreira que colaboraram diretamente nos experimentos bem como o apoio e amizade sempre presentes.

A todos que indiretamente colaboraram para que esta tese chegasse a bom termo.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	14
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1 Animais e seu Tratamento	15
3.2 Procedimento Cirúrgico	15
3.3 Imunização	23
3.4 Coleta de Sangue	23
3.5 Peso das Glândulas	23
3.6 Resposta Imune Humoral	24
3.7 Celularidade	25
3.8 Determinação da Concentração de Hormônios	25
3.9 Diagnóstico da Lesão	26
3.10 Tratamento Estatístico	28
4. RESULTADOS	29
4.1 Grupo Controle	29
4.2 Grupo Simulado	37
4.3 Grupo Lesado	48
5. DISCUSSÃO	63
6. CONCLUSÕES	76
7. SUMÁRIO	78
8. BIBLIOGRAFIA	79

ABREVIACÕES

ACTH - hormônio adrenocorticotrófico ou corticotrofina

Con-A - concanavalina-A

CRF - fator liberador de corticotrofina

EPM - erro padrão da média

GC - grupo controle

GIF - fator liberador de glicocorticóides

GS - grupo simulado

Ia - antígeno associado a região I

IL-1 - interleucina 1

IL-2 - interleucina 2

L.F - lesão de fímbria hipocampal

L.M - lesão mista

L.ST - lesão de estria terminal

MIF - fator de inibição de macrófago

MME - meio mínimo essencial

NK - natural killer

PBS - salina tamponada com fosfato

PFC - célula formadora de placa

RIA - radioimunoensaio

SBF - soro bovino fetal

SRBC - hemácia de carneiro

ST - estria terminal

Th - linfócito T **helper**

TS - linfócito T supressor

TSH - hormônio estimulante da tiróide

1. INTRODUÇÃO

A existência de um organismo biológico está ligado ao curso de interações metabólicas apropriadas, condição básica para manter a homeostasia. Deste modo o sistema imune tal como acontece com os outros sistemas, tem mecanismos fisiológicos que podem ser encarados como sistemas biológicos adaptativos, que por meio de seu vasto repertório como as células imunocompetentes e seus produtos, sejam mediadores químicos liberados ou anticorpos produzidos contra determinantes específicos, o organismo tenta manter o equilíbrio entre o ambiente interno do organismo e o ambiente externo. Caso contrário, como consequência de alguma perturbação neste estado, podem surgir seqüelas indesejáveis, as doenças imunológicas, como manifestações clínicas deste desequilíbrio.

É entretanto claro, que a resposta imune depende não somente de propriedades anatômicas, fisiológicas e bioquímicas dos tecidos e células linfáticas, mas também de uma variedade de componentes celulares ou moleculares não linfáticos. Torna-se assim, necessária a exploração da resposta imune, em relação a outros sistemas, como o sistema nervoso central e o sistema endócrino (JANKOVIC & ISAKOVIC, 1973).

As interações imune neuroendócrinas

O alto grau de versatilidade do sistema imune e sistema nervoso central, é devido ao fato de que estes sistemas formam uma complexa rede envolvendo diferentes populações celulares e estruturas moleculares capazes de emitir e receber sinais, levando-os a agir de um modo integrado de maneira que a imunomodulação ocorra de um modo normal (BESEDOVSKY et al, 1985). Esta comunicação bidirecional entre os sistemas, foi demonstrada também por BLALOCK et al (1985), como ocorrendo por meio de moléculas (linfocinas e neuropeptídeos) e de estruturas (receptores) que são compartilhadas pelos dois sistemas. Estes fatos foram reforçados em decorrência de: as linfocinas apresentarem funções hormonais e vice-versa, os produtos de origem da pituitária ou de linfócitos estarem sob o mesmo controle, e as células imunes apresentarem receptores para os neuropeptídeos bem como a própria regulação neural direta nos órgãos linfóides (WEIGENT & BLALOCK, 1987).

A implicação desta correlação é que o sistema imune participaria como um órgão receptor, estrategicamente distribuído, capaz de detectar antígenos externos ou antígenos próprios modificados e, por meio do sistema nervoso central discriminar a informação sobre os diferentes tipos de estímulos, com mecanismos imunológicos autoregulatórios (rede

idiotípica, células auxiliadoras e supressoras, linfocinas, etc.) (BESEDOVSKY & SORKIN, 1977).

As investigações envolvendo hormônios e resposta imune são básicas para o entendimento desta comunicação. Geralmente envolvendo a administração de hormônios em animais experimentais ou bloqueio das glândulas endócrinas, tem demonstrado que mudanças nos níveis de vários hormônios podem influenciar consideravelmente a performance da resposta imune (BESEDOVSKY et al, 1975) que por proliferação, diferenciação, maturação ou desempenho do tecido linfático (BARONI et al, 1969).

A existência de uma família de hormônios os quais podem atuar sobre as respostas neuroendócrinas têm sido demonstrado pela existência de diferentes fatores. O GIF originado nas células linfóides e sua ação integrada a nível do eixo hipotálamo-pituitário (BESEDOVSKY et al, 1985b), o ACTH-ir produzido por linfócitos infectados com vírus, concomitantemente com interferon, que atuariam em mecanismos de retro-alimentação, controlando os níveis circulantes destes hormônios, ou ainda TSH funcionando como linfocina a qual poderia atuar via células T, aumentando a produção de anticorpos (KRUGER & BLALOCK, 1986), assim, contribuindo para uma completa alça regulatória entre os dois sistemas (BLALOCK & SMITH, 1985 ; BLALOCK & STANTON, 1980). Evidências indicam também a presença dos chamados neurohormônios, com papel

importante nas mais diversas funções imunes, entre as quais a β -endorfina, que através de receptores na superfície de linfócitos, pode aumentar a resposta proliferativa de células do baço frente a Con- A, estimular a atividade de células NK e a quimiotaxia dos mononucleares (MANDLER et al, 1986). Além disso ressalta-se a ação do ACTH na proliferação de células B *in vitro* (FAUCI et al, 1985; PLAUT, 1987), a α -endorfina que pode inibir a produção de anticorpos IgM específicos para ovalbumina a nível de linfócitos T humanos (HEIJNEN et al, 1986), a substância P e a somatostatina (SOM), neuropeptídeos presentes no sistema nervoso central com ações sobre linfócitos, macrófagos e polimorfonucleares (PAYAN & GOETZL, 1985) e ainda o peptídeo intestinal vasoativo (VIP) que inibe a resposta linfocitária frente a mitógenos (O'DORISIO et al, 1985).

A presença desses peptídeos (neurohormônios e imunohormônios), receptores e funções comuns sugerem o fundamento lógico para a ocorrência da interação imuno neuroendócrina.

Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

Embora muitos trabalhos mostrem a importância da pituitária na produção de anticorpos para antígenos timo dependentes (SRBC), como é visto através dos níveis de anticorpos altamente reduzidos em animais hipofisectomizados,

e a restauração com o transplante da glândula (BERCZI et al, 1981), outros hormônios regulados pelo eixo hipófise-adrenal parecem ser funcionalmente importantes na regulação da resposta imune.

Dentre os hormônios adrenocorticais, destacam-se os glicocorticóides como sendo os mais ativos. O ACTH produzido pela hipófise atua como regulador primário dos glicocorticóides (corticosterona) no córtex da adrenal, via fatores (CRF) sintetizados no núcleo paraventricular, e secretados na eminência média pelo hipotálamo, e atuando via sistema porta-hipofisário diretamente sobre a pituitária anterior (adenohipófise) (RIVIER & PLOTSKY, 1986). Outras substâncias oriundas da pituitária anterior podem regular a secreção de ACTH, entre elas: agonistas α adrenergicos, como norepinefrina, vasopressina, íons potássio e teofilina (aumentam AMPc) (VALE & RIVIER, 1977).

Este controle neuroendócrino da secreção de ACTH, é visto com muita ênfase, em casos de respostas a estímulos estressantes, onde é sabido que a liberação aumenta dentro de poucos minutos após iniciado o estímulo, tendo o mecanismo de retroalimentação dos glicocorticóides como componente principal neste controle (GANONG et al, 1974).

Além do ACTH, produzido pela adeno-hipófise, outros hormônios se destacam, tais como: hormônio do crescimento (GH)

com atividades timotrópicas (PIERPAOLI et al, 1969 ; SORKIN et al, 1972), que juntamente com a tiroxina acelera a regeneração de tecido linfóide e restaura a produção de anticorpos em camundongos com hipotireoidismo (PIERPAOLI et al, 1969) e a prolactina (PRL) a qual tem a propriedade de restaurar a resposta imune em ratos hipofisectomizados (BERCZI et al, 1981).

Uma grande variedade de microorganismos, produtos bacterianos, agentes inflamatórios, antígenos e linfocinas induzem a produção de IL-1 (SAPOLSKY et al, 1987), IL-2, linfocinas (MIF) (WAHL et al, 1975), e certas timosinas (HALL et al, 1985). Estas podem ser inibidas pela ação de esteróides adrenocorticais como por exemplo, os glicocorticóides que impedem a expressão de moléculas Ia na superfície de macrófagos além de inibir a produção de IL-1, portanto interferindo nos estágios iniciais da resposta imune como a proliferação de células T *in vivo* e *in vitro* (SNYDER & UNANUE, 1982). FAUCI (1975), demonstrou que a ação de corticosteróide em humanos induz profunda e transitória linfopenia T e B, sugerindo que estas células seriam redistribuídas para outros compartimentos, em particular para a medula óssea. A IL-1 estimularia a secreção de ACTH via eixo pituitária-adrenal ou agiria diretamente na pituitária (FEIN et al, 1987). Um dos mecanismos envolvidos no aumento de corticosterona detectado durante o curso da resposta imune observado por BESEDOVSKY et al, (1986), poderia ser explicado pela ação destes produtos de

linfócitos ativados imunologicamente, sob a regulação de retroalimentação.

Deste modo, é definido o circuito imuno regulatório, ligando estruturas neuroendócrinas e o sistema imune, que via eixo hipotálamo-pituitária afetaria as funções de muitos aspectos imunológicos.

Hipotálamo e estruturas extra-hipotalâmicas na regulação imune neuroendócrina

Aspectos morfológicos e funcionais

O hipotálamo exerce influências sobre a resposta imune, provavelmente como resultado do envolvimento na regulação de processos secretórios neuroendócrinos, processos estes que sabidamente afetam a resposta imune (BESEDOVSKY et al, 1977).

Estudos anatômicos têm mostrado os componentes estruturais do hipotálamo e suas conexões aferentes e eferentes com outras partes do cérebro. Dentre os núcleos hipotalâmicos, localizados bilateralmente no cérebro, os núcleos paraventricular e supraóptico (hipotálamo anterior), os núcleos ventromedial e arqueado (hipotálamo medial) e os núcleos mamilares (hipotálamo posterior) são os de maior interesse para o nosso estudo.

A atividade reguladora endócrina do hipotálamo está sob influência de outras áreas extra-hipotalâmicas, como o hipocampo, septo, córtex piriforme e o complexo amigdalóide, os quais agem através de informações recebidas dos sistemas sensitivos como o sistema olfatório e regiões corticais, e desta forma regulam os vários eixos glandulares (RAISMAN, 1970; HAMILTON, 1976).

Basicamente, a ligação entre o complexo amigdalóide e o hipotálamo se dá por duas principais vias que são: a estria terminal e a via amigdalofugal ventral. Através da estria terminal as fibras de origem amigdalar com origem predominantemente nos núcleos central e medial da amígdala caminham para as regiões mais anteriores do cérebro, áreas ventromediais e preóptica do hipotálamo. A via amigdalofugal para o hipotálamo, tem origem em muitos núcleos, principalmente no córtex periamigdalóide que se projeta para as regiões dorsomedial do hipotálamo (RENALD, 1976; ISAACSON, 1982).

Dos três componentes que constituem a estria, o componente dorsal envia fibras para o núcleo intersticial da estria terminal ("bed" nucleos) e daí para a maioria dos núcleos hipotalâmicos, com exceção dos núcleos ventromedial e supraquiasmático, os quais têm importante papel em processos reprodutivos (BELTRAMINO & TALEISNIK, 1980). As evidências para ocorrência desta projeção são demonstradas através de lesões

da estria terminal e o aparecimento de degeneração terminal nos respectivos núcleos (RAISMAN, 1970).

Trabalhos com estimulação elétrica em diferentes porções do núcleo intersticial da estria terminal produzem respostas diferenciais quanto a corticosterona plasmática, mostrando que componentes inibitórios e excitatórios da atividade do eixo pituitária-adrenal fazem parte da constituição desta estrutura (DUNN, 1987).

Foi demonstrado que a estimulação elétrica de distintas áreas da amígdala resulta em respostas diferenciais de corticosterona plasmática. Segundo SHIMADA et al, (1989), estas alterações seriam decorrentes do núcleo intersticial da estria terminal, uma extensão dos núcleos amigdalóide, medial e central, com capacidade secretora de áreas facilitadoras de secreção de ACTH (núcleos basomedial e medial) ou inibidoras (núcleos central e basolateral) além do envolvimento na liberação de outros hormônios como o luteinizante e tireotrofina (YAMADA & GREER, 1960). Deste modo, dependendo da área amigdalóide estimulada e do **background** hormonal, o eixo pituitária-adrenal poderá ter comportamentos distintos (CARRILLO & DUNN, 1977; ALLEN & ALLEN, 1974; DUNN, 1987). Não podemos descartar a hipótese da existência de um controle neuroendócrino tanto intra como inter áreas límbicas, visto que a amígdala serviria como um agregado de núcleos com diferenças individuais em termos de afinidade hormonal e

conteúdo de peptídeos modulando diferencialmente a atividade do hipotálamo, e também pelo fato de um componente desse sistema se projetar para uma determinada área sob uma ou mais diferentes rotas, implicando em tipos de controles regulatórios diferenciais causados pela diversificação de grupos celulares envolvidos (DUNN & WHITENER, 1986; MASON, 1959).

De todas as estruturas límbicas, o hipocampo em condições fisiológicas é o que mais se relaciona com a modulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, através do trato córtico-hipotalâmico medial, (RAISMAN, 1970; MEIBACH & SIEGEL, 1977), mais precisamente do hipocampo anterior ventral (subículo ventral) que se projeta por meio da porção distal da fímbria para a região periventricular do hipotálamo, com extensão para os núcleos ventromedial e supraquiasmático, e se dirige para os corpos mamilares. A parte medial e central da fímbria, constituída de axônios provenientes de componentes da formação hipocampal posterior (coluna descendente do fórnix), vão diretamente para os corpos mamilares, os quais sabidamente têm importância em funções autônomas (WYSS et al, 1980).

As projeções vindas do córtex subicular ventral para o hipotálamo são de particular interesse, já que o trato cortico-hipotalâmico medial envolve áreas do hipotálamo intimamente ligadas com funções endócrinas (região

periventricular) que contém neurônios com funções neurosecretoras, onde tem sido demonstrado a influência inibitória do hipocampo na liberação de glicocorticóides e gonadotrofinas. Deste modo, o complexo subicular ventral hipocampal serviria como importante controle límbico da função da pituitária (MEIBACH & SIEGEL, 1977) podendo também ser mediado pela grande quantidade de receptores presentes nos neurônios hipocampais desta região (MCEWEN et al, 1986), que por mecanismos de retroalimentação controlam os níveis hormonais circulantes (DALLMAN et al, 1987).

Assim, o hipotálamo funciona como adjuvante dos demais sistemas, agindo de modo integrado com os outros centros de controle (complexo amigdalóide e complexo hipocampal) os quais contribuem para o refinamento e a sensibilidade dos processos envolvidos, sendo que a participação do hipotálamo é essencial para que o processo básico de integração ocorra.

Lesões eletrolíticas como modelo para o estudo da regulação imune neuroendócrina

Têm sido mostrado que lesões eletrolíticas de hipotálamo e da formação reticular alteram o desempenho da resposta imune tanto humoral quanto a mediada por células em ratos (JOVANOVA-NESIC et al, 1986). Doenças auto-imunes experimentais como a **miastenia gravis** podem ser desenvolvidas

por lesões do hipotálamo anterior (ABRAMSKY et al, 1987), assim como a diminuição da resposta parassimpática. Lesões na porção posterior estão associadas com a diminuição das respostas simpáticas, além de imuno modular linfócitos Th e Ts em camundongos (KATAYAMA et al, 1987). Lesões no hipotálamo anterior causam ainda alterações na resposta imune, via eixo hipófise-adrenal, resultando em inibição da produção de anticorpos anti ovalbumina em ratos (TYREY & NALBANDOV, 1977), mudanças na celularidade do tecido linfático de ratos com diminuição do número de timócitos após a lesão e diminuição da resposta das células de baço frente a Con-A (CROSS et al, 1980), diminuição da proteção contra os efeitos da anafilaxia em ratos, que segundo LUPARELLO et al, (1964), este efeito seria devido à redução de TSH ou aumento de ACTH decorrente dos processos neuroendócrinos provocados pela lesão.

Por outro lado, a estimulação do núcleo paraventricular do hipotálamo tem sido relacionada com a ativação do eixo adrenocortical, decorrente de mudanças de atividade deste núcleo, após a indução de resposta imune em ratos com SRBC ou estimulação com Con-A, vista a presença de neurônios produtores de CRF nesta região (SAPHIER et al, 1987).

A via anatômica exata responsável pelo efeito da estimulação da amígdala na liberação de ACTH, e por conseguinte, do controle da corticosterona, é questionada a

tempos por muitos autores. Com base nos trabalhos com secção da estria terminal, modelos para este estudo foram apresentados, desta forma oferecendo bases para avaliar a importância específica da conexão amigdaló-hipotalâmico mediando tais efeitos (MASON, 1959). Todas estas observações anatômicas, fornecem evidências e fundamentam a interpretação dos efeitos das lesões em estruturas extras e intra hipotalâmicas, sob os mecanismos endócrinos e imunes.

2. OBJETIVOS

As evidências apresentadas indicam que o modo integrado da regulação do sistema endócrino e imune não ocorre somente pela atividade do hipotálamo, mas também por estruturas extra-hipotalâmicas como o complexo amigdalóide. Pode-se, então, supor que o isolamento de componentes de tal estrutura através de lesões por eletrocoagulação, provoque modificações a nível de resposta imune primária frente a estímulos antigênicos T dependentes.

Deste modo, procuramos determinar o grau de importância do complexo amigdalóide, em particular da estria terminal, visto ser o principal elo de comunicação entre a maioria dos núcleos hipotalâmicos e amigdalóides na regulação dos mecanismos de interação imune neuroendócrinos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS E SEU TRATAMENTO

Foram utilizados ratos machos, (*Rattus norvegicus*), da linhagem Wistar, de 2 meses e meio de idade, pesando em média 200 gramas fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), onde em nosso biotério (Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental) eram deixados por um período de uma semana em gaiolas coletivas, com até cinco animais, para posterior manuseio experimental (período de adaptação). Após este período, os animais foram colocados em gaiolas individuais, providas de ração adequada e água à vontade. O biotério foi mantido com luz em ciclo claro/escuro de 12:12 horas e temperatura ($\pm 28^{\circ}\text{C}$) controlados diariamente.

Os animais, após os procedimentos cirúrgicos, receberam tratamento com Terramicina (Pfizer) adicionada à água do bebedouro por 10 dias (período de recuperação).

Tanto nos dias de cirurgia, como no dia do sacrifício, os animais após serem pesados eram transportados um a um do biotério para o laboratório e submetidos ao experimento.

A abordagem experimental que nos propusemos empregar, pode ser esquematizada em três grupos de animais logicamente ligados entre si.

GRUPO CONTROLE (GC) - Utilizados para a determinação do perfil da resposta imune primária de ratos normais.

Este grupo de ratos nos permitiu conhecer as características de resposta da linhagem a ser utilizada durante todo o decorrer do trabalho, detectada através da resposta imune primária (PFC-Igm), além das dosagens dos níveis de hormônios circulantes (tiroxina e corticosterona) e pesagem de suas glândulas 4 e 5 dias após imunização.

Os parâmetros acima determinados serviram como referencial para os procedimentos seguintes, sendo este grupo considerado grupo controle normal.

Um outro grupo denominado de basal, serviu como controle de níveis hormonais. Estes animais não sofreram nenhum tipo de manuseio ou procedimento experimental, sendo as dosagens feitas sob as mesmas condições dos demais grupos.

GRUPO COM LESÃO SIMULADA (GS) - Utilizado para determinar o efeito da lesão simulada do complexo amigdalóide na resposta imune primária de ratos.

Os animais deste grupo foram submetidos à lesão simulada para avaliar o efeito das manipulações cirúrgicas sobre os vários parâmetros experimentais que foram estudados. Deste modo, foi conduzido todo procedimento de uma cirurgia estereotáxica exceto a passagem de corrente elétrica através dos eletrodos, sendo que, após 25 a 30 dias, os animais foram imunizados e tiveram seus parâmetros avaliados.

GRUPO LESADO (GL) - Utilizado para determinar o efeito das lesões do complexo amigdalóide na resposta imune primária de ratos.

Através da comparação dos grupos controles, simulados e lesados investigamos o efeito das lesões por eletrocoagulação de diferentes regiões do complexo amigdalóide. Os animais foram lesados e após 25 a 30 dias da cirurgia foram imunizados e avaliados, no sentido de correlacionar os efeitos da lesão na resposta imune com os eixos hormonais possivelmente afetados.

Todos os três grupos experimentais, obedeceram uma seqüência de procedimentos os quais serão detalhados, seguindo o esquema da Figura 1:

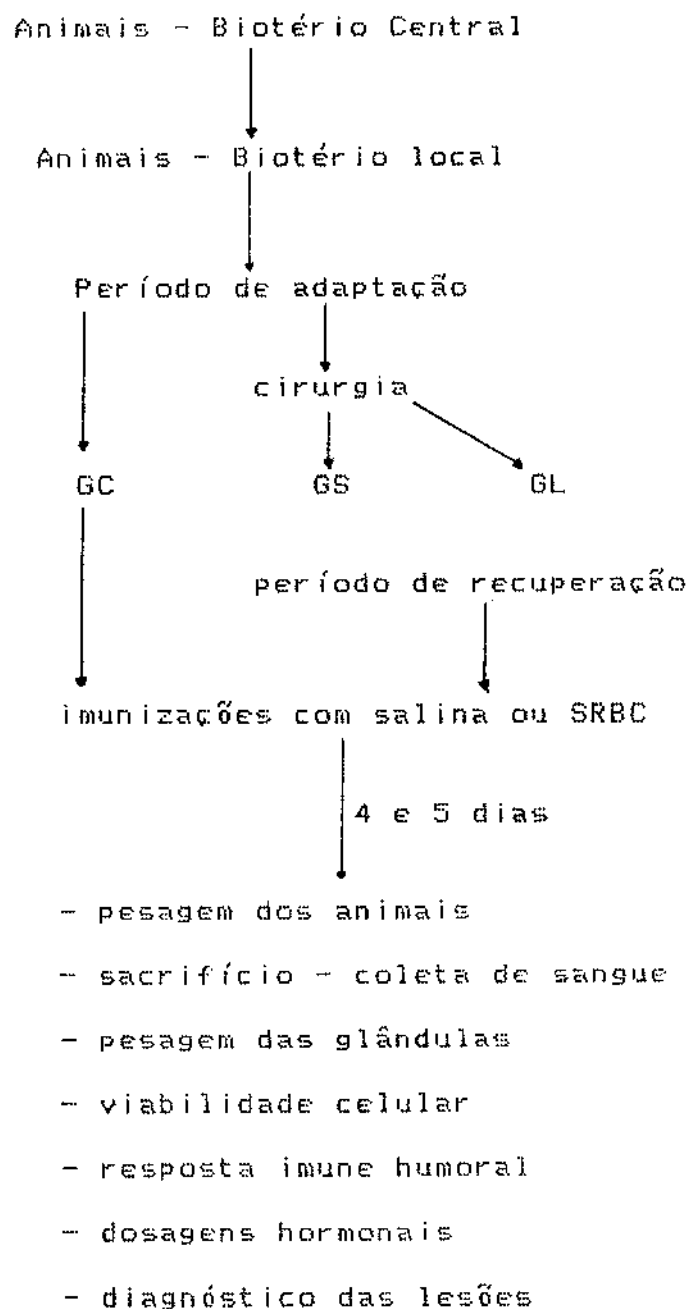


Figura 1- Esquema dos procedimentos utilizados com os animais.

3.2 PROCEDIMENTO CIRÚRGICO

Os animais foram anestesiados com éter etílico (Rhodia), e após assepsia adequada da região cerebral, foram devidamente colocados no aparelho estereotáxico do tipo Kriegh-Johnson, (Figura 2), onde após uma incisão longitudinal na pele e exposta a calota craniana, o bregma, dado pelo cruzamento entre as suturas coronal e sagital (Figura 3), foi tomado como ponto de referência para demarcar as coordenadas de acordo com o atlas estereotáxico de PELLEGRINO E CUSHMAN (1967), 1,2mm posterior do bregma e 3,5mm lateral à linha mediana bilateralmente, definindo o local dos orifícios a serem feitos com auxílio de uma broca de dentista, por onde o eletrodo de aço inox foi introduzido 5,5mm de profundidade à partir da calota craniana (Figura 4). Após a introdução do eletrodo, no grupo lesado, foi passada uma corrente elétrica de 2mA, gerada de um lesionador, durante 20 segundos. Os animais simulados, sofreram o mesmo procedimento exceto a passagem de corrente e a introdução do eletrodo no qual foi de apenas 2mm de profundidade. Após a retirada do eletrodo, a incisão foi suturada e os animais receberam o tratamento com antibiótico via oral por 10 dias. Os animais submetidos à cirurgia, apresentaram boa recuperação, sem nenhuma complicação neurológica aparente ou mudanças de comportamento quanto a ingestão de alimentos.

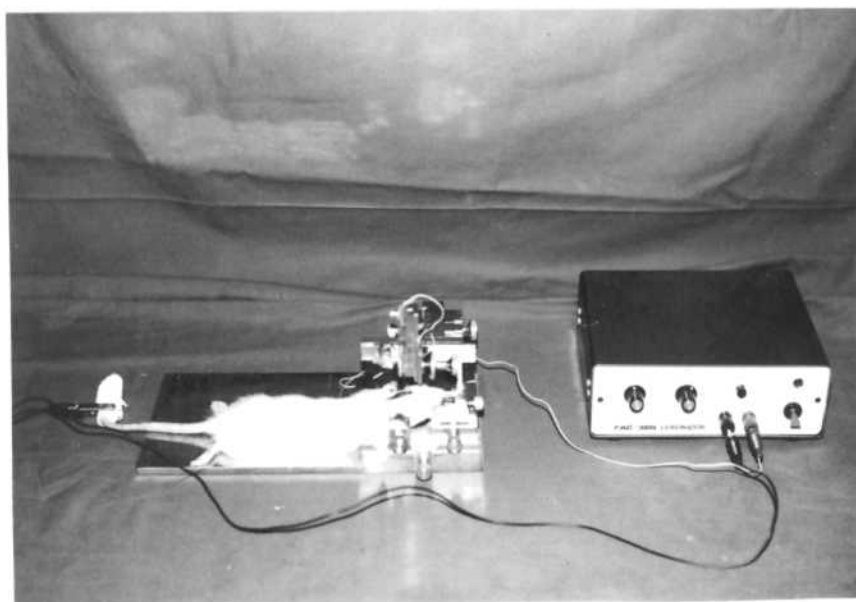


Figura 2 - Rato posicionado no aparelho estereotáxico para execução da lesão por eletrocoagulação, com os eletrodos ligados ao aparelho lesionador.



Figura 3 - Incisão longitudinal; o bregma (cruzamento das suturas coronal (C) e sagital (S)) tomado como referência para demarcar as coordenadas estereotáficas de acordo com PELLEGRINO e CUSHMAN para abertura dos orifícios.



Figura 4 - Eletrodo introduzido a partir da calota craniana nos locais demarcados, para lesão de estria terminal.

3.3 IMUNIZAÇÃO

Para avaliar a resposta imune primária foi utilizado como antígeno a papa de hemácias de carneiro, administrada por via intraperitoneal na dose de 5×10^9 hem/rato, após terem sido submetidas a três lavagens sucessivas em solução salina fisiológica 0,15 M. Seguindo o mesmo esquema da imunização feito com SRBC, foi administrado 1 ml de salina fisiológica 0,15 M ao grupo controle-salina.

3.4 COLETA DE SANGUE

Os animais foram sacrificados por decapitação em guilhotina, em tempo máximo de manuseio de 2 minutos, entre 9:00 e 11:00 horas da manhã. O sangue de cada animal colhido individualmente em tubos de centrifuga foi deixado coagular à temperatura ambiente, logo após, sendo centrifugado a 2.000 rpm por 10 minutos e o soro obtido foi acondicionado e mantido em freezer a -20°C até o momento das dosagens hormonais.

3.5 PESO DAS GLÂNDULAS

Todos os animais foram pesados antes do sacrifício, obtendo-se assim o peso corporal para o cálculo do peso relativo das diversas glândulas. Após a coleta de sangue, a adeno-hipófise, tiróide, adrenais, timo e testículos foram retirados, limpos de tecido adventício e mantidos em papel de

filtro umidecido com salina fisiológica até o momento da pesagem em balança de torsão de precisão de 0,01mg. Os pesos foram referidos em mg/100g do peso corporal (peso relativo).

O grupo de animais submetidos à cirurgia, além da retirada das glândulas, tiveram removidos também os cérebros, os quais foram mantidos em freezer a -20 °C, até o momento da análise histológica.

3.6 RESPOSTA IMUNE HUMORAL

A resposta imune primária anti hemácia de carneiro foi pesquisada pela técnica de Células Formadoras de Placas (PFC) direto, descrito por JERNE et al (1974) e modificado por DRESSER (1978). Resumidamente, foi determinado o número de células secretoras de anticorpos diretamente no baço removido e feito uma suspensão em MME adicionado de 1% de soro bovino fetal (Laborclin Ltda), numa diluição 1/40 e 1/80. A 50 µl destas diluições foi adicionado 50 µl de uma suspensão de SRBC 5%. Esta mistura foi mantida em banho-maria a 42 °C, adicionado 200 µl agarose 0,8% (Bio-Rad Laboratories) em MME e espalhadas em lâminas de microscópio, previamente seladas com agarose 1%. Após solidificação em temperatura ambiente, as lâminas foram incubadas por 2 horas em estufa umidecida a 37 °C. Foi acrescentado soro de cobaia como fonte de complemento, previamente absorvido com SRBC e diluído 1/10 em tampão barbital (pH=7.2/7.4), e novamente incubadas por 1 hora

nas mesmas condições anteriores. As lâminas, ao serem retiradas da incubação, foram fixadas em paraformaldeído 4% (Riedel-Dehaën Ag) em PBS por 20 minutos, e mantidas em temperatura ambiente até completa secagem. Após lavagem em água corrente, as lâminas foram deixadas para secar novamente à temperatura ambiente. Todos os esfregaços foram feitos em duplicata e examinados em lupa (Zeiss) onde foram contados os halos (placa) de hemólise. Os valores obtidos representam a média do número de placas contadas em função da viabilidade celular, sendo o resultado expresso em $\text{nº PFC} \times 10^{-6}$ células viáveis do baço.

3.7 CELULARIDADE

O número total de células nucleadas do baço foi determinado através da diluição v/v da suspensão de cada baço em MME suplementado com SBF, em ácido acético 1% (Carlo Erba) e contadas em câmara de Neubauer. Os resultados foram expressos como número total de células nucleadas por baço, e a partir deste número a viabilidade celular pelo método de exclusão do Azul de Tripan 0,25% (Merck) foi obtida.

3.8 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HORMÔNIOS

Após o descongelamento dos soros, foram realizadas as dosagens de tiroxina total ($\mu\text{g}\%$) e corticosterona circulante (ng/ml), determinada por radioimunoensaio

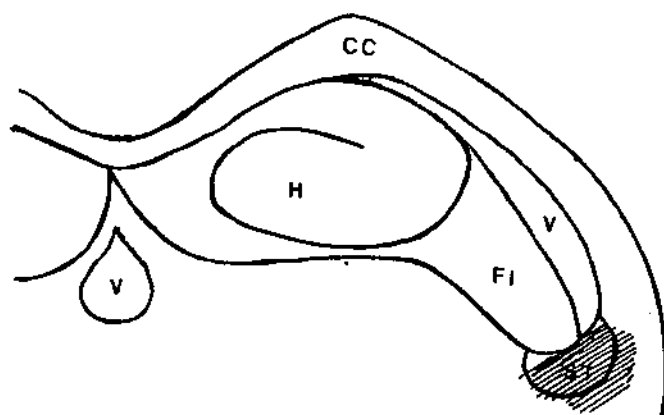
utilizando-se "kits" específicos para hormônio de ratos e camundongos (RSL - 125 I Corticosterone Kit - Radiossay Systems Laboratories, INC - Carson, CA, USA e Trilab - RR - São Paulo, para tiroxina).

3.9 DIAGNÓSTICO DA LESÃO

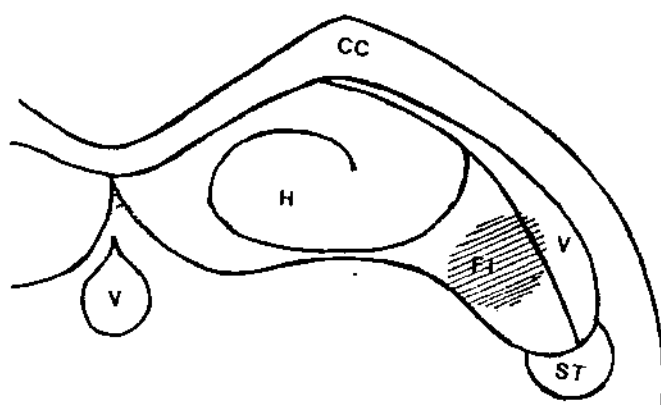
Foram realizados cortes seriados de 50 micras de espessura em criostato (Leitz Wetzlar) dos cérebros congelados, em plano coronal, estendidos em lâminas de microscópio, sendo corados com Azul de Toluidina 0,025% (Merck) e lavados em água. Os cortes depois de enxugados, foram protegidos com glicerina tamponada sob lamínula e observados em microscópio estereoscópio (Zeiss), com câmara lúcida e classificados de acordo com as estruturas lesadas, seguindo a orientação do atlas de PELLEGRINO E CUSHMAN (1967).

Após a classificação mostrada esquematicamente na Figura 5, os animais foram agrupados conforme a estrutura do complexo amigdalóide lesada bilateralmente, permitindo a determinação dos seguintes grupos de animais:

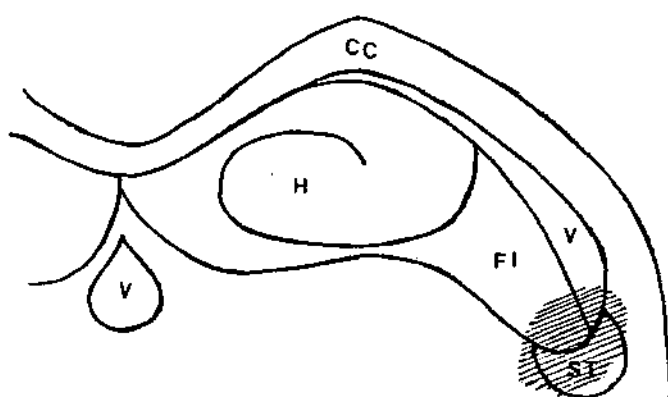
- 1 - Lesão de estria terminal - (L.ST)
- 2 - Lesão de fímbria hipocampal - (L.F)
- 3 - Lesão mista, a qual atingiu parte da fímbria e parte da estria terminal - (L.M)



LESÃO DE ESTRIA TERMINAL - L.ST



LESÃO DE FÍMBRIA HIPOCAMPAL - L.F



LESÃO MISTA - L.M

Figura 5 - Plano 4.2 do atlas de PELLEGRINO e CUSHMAN representando esquematicamente a localização da extensão das lesões na estria terminal (L.ST), fíbria hipocampal (L.F) e lesão mista (L.M). Abreviações: V- ventrículo; CC- corpo caloso; H- hipocampo; FI- fíbria hipocampal; ST- estria terminal.

Os animais cujas lesões se estenderam além das regiões propostas foram excluídos do estudo.

3.10 TRATAMENTO ESTATÍSTICO

O teste "t" de Student foi utilizado para comparações entre os grupos, a fim de se determinar o nível de significância entre suas médias. Tomou-se como diferença estatisticamente significativa o valor de $p \leq 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1 GRUPO CONTROLE - Determinação do perfil da resposta imune primária em ratos normais.

Com base nos dados adquiridos de nosso laboratório sobre a cinética da resposta imune primária anti-SRBC, por meio da análise do nº de PFC $\times 10^{-4}$ céls. viáveis do baço, sabe-se ser esta elevada em ratos normais no 4º e 5º dias após a imunização (CATALAN, 1990). Assim, os grupos de animais experimentais propostos aqui foram analisados somente nestes dois dias, pois acreditamos que as possíveis alterações dos parâmetros imunológicos (nº PFC, celularidade, peso das glândulas e dosagens hormonais) a serem analisados, estariam melhor caracterizados nestes dias.

RESPOSTA IMUNE PRIMÁRIA

Na Figura 6, encontra-se representado os valores obtidos do nº de PFC $\times 10^{-4}$ cél. viáveis do baço, frente ao antígeno SRBC, 4 e 5 dias após a imunização. Os valores de 4º e 5º dias se encontram dentro de uma mesma média de resposta, representando com isto, o padrão de resposta imune dos animais (linhagem Wistar) a serem utilizados ao longo do trabalho.

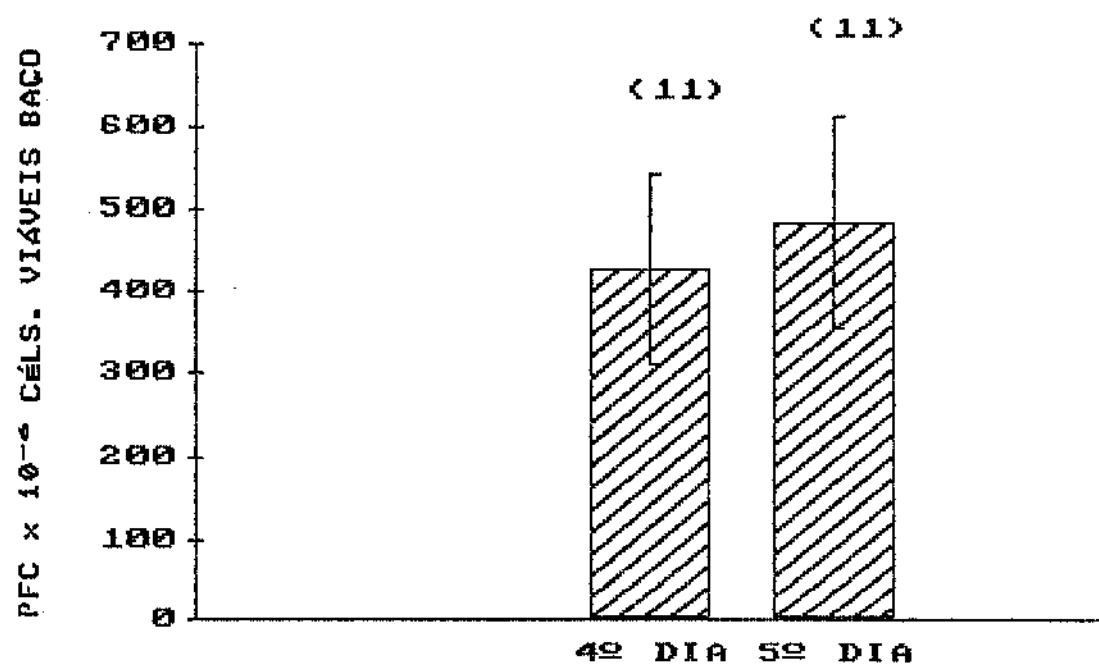


FIGURA 6 - Valores das médias $\pm$ EPM do número de células formadoras de placas $\times 10^{-4}$ células viáveis do baço, do grupo controle, 4 e 5 dias após a imunização com SRBC.

() indica número de animais

Os animais inoculados com solução salina fisiológica não foram representados, visto a resposta ser considerada nula, ou seja o número de placas inferior a 2 por baço.

DOSAGENS HORMONAIS

Foram dosados corticosterona e tiroxina sérica dos animais controles 4 e 5 dias após a inoculação com SRBC ou solução salina fisiológica, comparados entre si e com os animais do grupo basal.

DOSAGEM DE CORTICOSTERONA

Os níveis de corticosterona representado na Figura 7 expressos em ng/ml, mostram um aumento significativo ($p < 0,05$) do grupo de animais inoculados com SRBC no 5º dia de resposta comparado ao valor obtido no 4º dia. Os demais grupos não apresentaram alterações significativas, mantendo-se com valores próximos ao basal.

DOSAGEM DE TIROXINA

A Figura 8 mostra os valores referentes aos níveis de tiroxina sérica ($\mu\text{g}/\%$), após as imunizações. Os animais do grupo basal apresentaram valores significativamente aumentados ($p < 0,05$) quando comparados com os animais

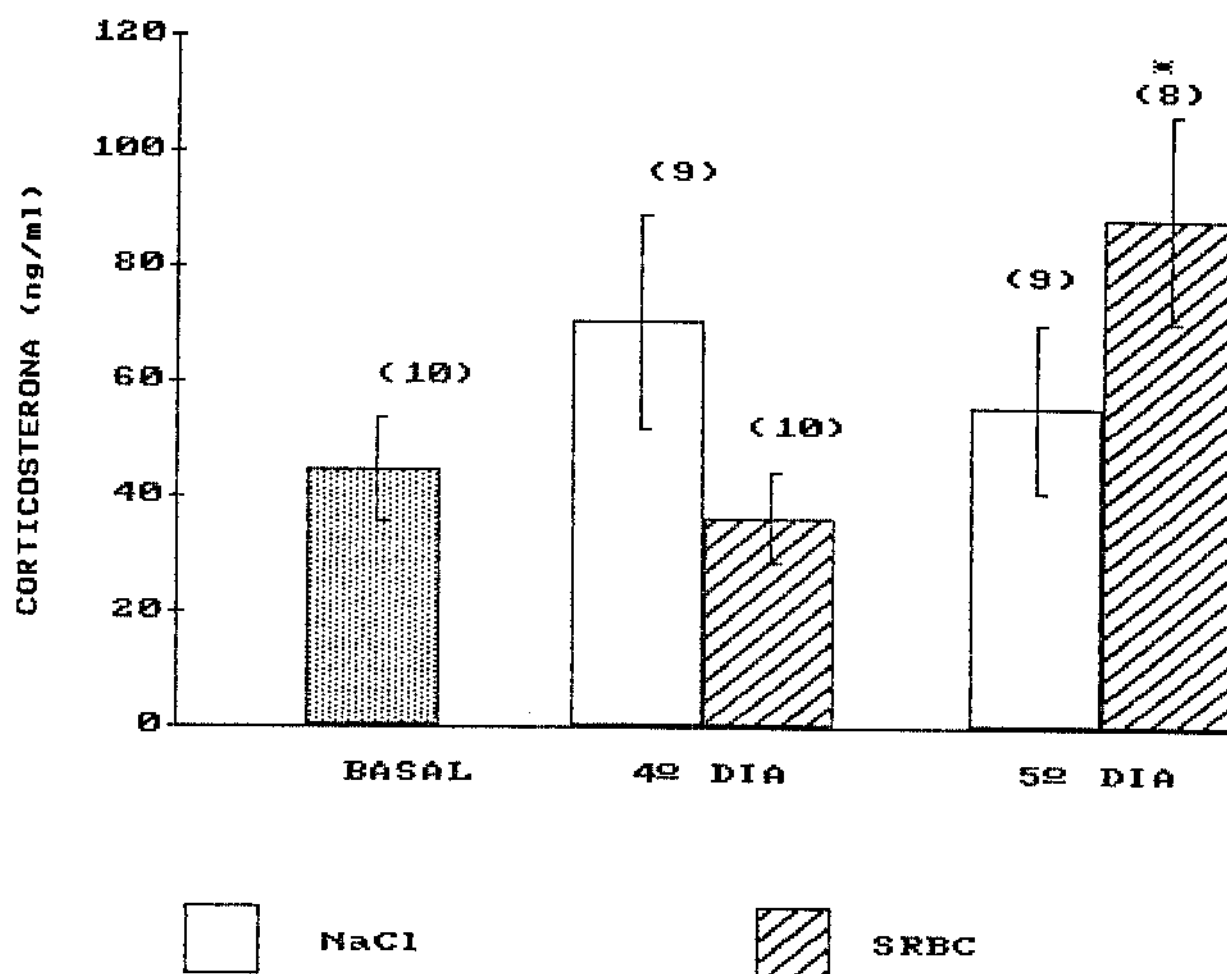


FIGURA 7 - Valores das médias $\pm$ EPM dos níveis de corticosterona sérica (ng/ml) dos grupos basal e controles 4 e 5 dias após imunização com NaCl ou SRBC.

() indica número de animais

* $p < 0,05$ em relação ao 49 dia

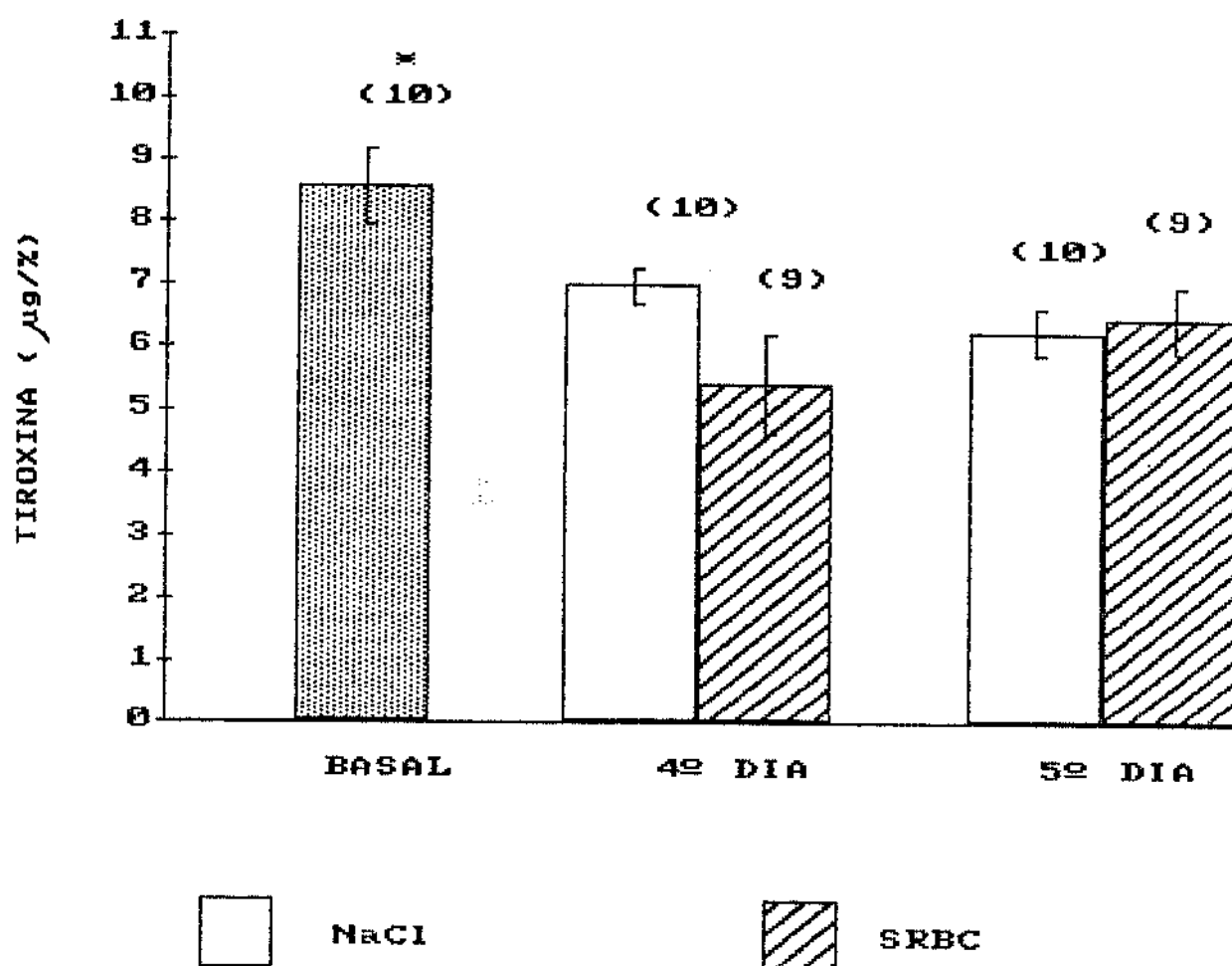


FIGURA 8 - Valores das médias $\pm$ EPM dos níveis de tiroxina sérica ($\mu\text{g}/\%$) dos grupos basal e controles 4 e 5 dias após imunização com NaCl ou SRBC.

* $p < 0,05$ em relação aos controles

() indica número de animais

controles de 40 e 50 dia após imunização. Nos demais grupos nenhuma alteração foi observada.

Observa-se nos resultados que houve um significativo aumento dos níveis de corticosterona sérica 5 dias após os animais terem sido imunizados com hemácia de carneiro, e diminuição de tiroxina à partir do 40 dia, coincidente com o pico de resposta de PFC $\times 10^{-4}$ céls. viáveis do baço.

PESO DAS GLÂNDULAS

A Tabela 1 mostra os valores dos pesos, expressos em mg/100g de peso corporal, das glândulas adeno-hipófise, tiróide, adrenais, timo e testículos dos grupos experimentais controles imunizados com hemácia de carneiro ou solução salina fisiológica, e sacrificados 4 e 5 dias após a imunização. Os animais sacrificados 4 dias após receberem SRBC, apresentaram os valores dos pesos de seus timos significativamente superiores ($p < 0,05$) aos animais sacrificados no 50 dia.

CELULARIDADE

A celularidade representada pelo número total de células nucleadas por baço $\times 10^4$ dos animais controles, 4 e 5 dias após receberem hemácia de carneiro ou solução salina fisiológica para imunização. A Tabela 2, expressa que a celularidade permaneceu inalterada, sendo que os estudos de

TABELA 1 - Valores médios $\pm$ EPM do peso relativo das glândulas adeno-hipófise, tiróide, adrenais, timo e testículos dos grupos controles, inoculados com hemácia de carneiro (SRBC) ou solução salina fisiológica (NaCl) e sacrificados 4 e 5 dias após a imunização.

PESOS (mg/100g de peso corporal)						
	ADENO-HIPÓFISE	TIRÓIDE	ADRENAIS	TIMO	TESTÍCULOS	
4 DIAS	NaCl	2.16 $\pm$ 0.14 (11)	5.24 $\pm$ 0.21 (10)	16.76 $\pm$ 0.64 (11)	107.10 $\pm$ 10.22 (11)	1060.29 $\pm$ 43.84 (11)
	SRBC	2.11 $\pm$ 0.07 (9)	5.73 $\pm$ 0.27 (9)	16.31 $\pm$ 0.57 (9)	*109.74 $\pm$ 7.82 (9)	1011.93 $\pm$ 38.90 (9)
5 DIAS	NaCl	1.99 $\pm$ 0.08 (9)	5.69 $\pm$ 0.44 (9)	14.55 $\pm$ 0.48 (9)	82.81 $\pm$ 4.96 (9)	937.12 $\pm$ 32.31 (9)
	SRBC	1.88 $\pm$ 0.09 (7)	5.75 $\pm$ 0.27 (8)	14.76 $\pm$ 0.60 (8)	87.86 $\pm$ 4.12 (8)	999.74 $\pm$ 47.23 (7)

() indica número de animais

* $p < 0,05$ em relação ao 5º dia

TABELA 2 - valores médios $\pm$ EPM da celularidade (célis. totais $\times 10^6$ conc.) do grupo controle, inoculado com hemácia de carneiro (SRBC) ou solução salina fisiológica (NaCl) e sacrificados 4 e 5 dias após a imunização.

número de células totais $\times 10^6$ conc.		

4 DIAS	NaCl	456.65 $\pm$ 19.71 (11)
	SRBC	525.50 $\pm$ 81.12 (9)

5 DIAS	NaCl	596.00 $\pm$ 55.00 (9)
	SRBC	549.26 $\pm$ 52.14 (7)

() indica número de animais

viabilidade celular comprovaram que 80% a 90% das células estavam viáveis.

4.2 GRUPO SIMULADO - Efeito da lesão simulada do complexo amigdalóide na resposta imune primária de ratos.

A análise dos resultados obtidos neste grupo experimental, serviu para validar os resultados dos grupos subsequentes com lesões eletrolíticas em diferentes áreas do complexo amigdalóide.

Os animais com lesão simulada, tiveram seus parâmetros analisados, 4 e 5 dias após terem sido inoculados com solução salina fisiológica ou SRBC, os quais foram comparados entre si e com os respectivos grupos controles.

RESPOSTA IMUNE PRIMÁRIA

A Figura 9 mostra os valores de PFC-Igm do grupo simulado após imunização, comparados com seus respectivos grupos controles de 42 e 52 dias. Os grupos em questão, apresentaram o mesmo padrão de resposta dos animais controles, sendo as diferenças não significativas.

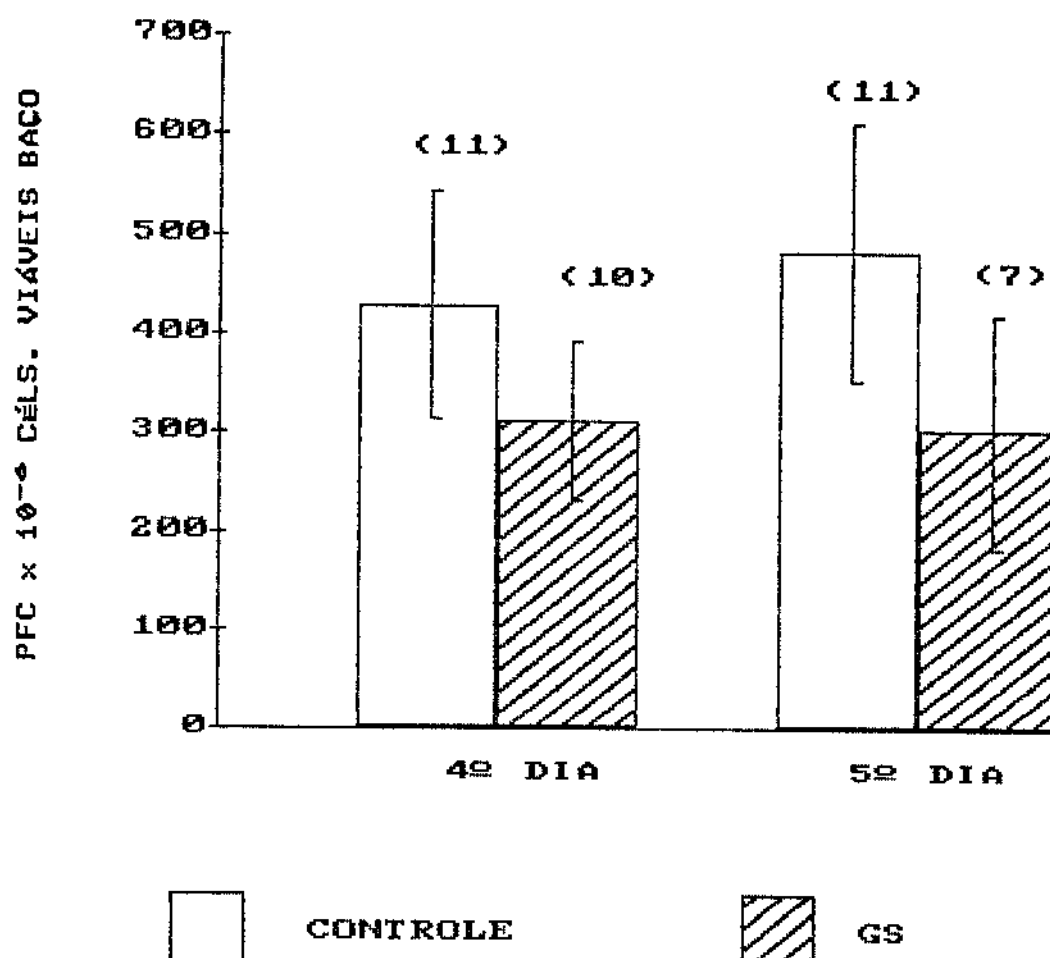


FIGURA 9 - Valores das médias $\pm$ EPM do número de células formadoras de placas $\times 10^{-6}$ céls. viáveis do baço, dos grupos controle e simulado, 4 e 5 dias após a imunização com SRBC. () indica número de animais

DOSAGENS HORMONAIS

Os hormônios corticosterona e tiroxina foram dosados 4 e 5 dias após os animais simulados terem recebido solução salina fisiológica ou SRBC. Os valores foram comparados com os grupos controles.

DOSAGEM DE CORTICOSTERONA

Os níveis de corticosterona sérica (ng/ml) de 40 e 50 dias, representados nas Figuras 10 e 11, mostram que não houve diferença significativa entre os grupos no 40 dia de resposta, sendo que no 50 dia os animais simulados e imunizados com SRBC tiveram seus valores diminuídos significativamente ($p < 0,05$) em relação ao controle deste dia.

DOSAGEM DE TIROXINA

As Figuras 12 e 13 mostram que não houve diferença significativa quanto aos níveis de tiroxina sérica dos grupos simulados comparados com seus controles tanto no 40 quanto no 50 dia após as imunizações.

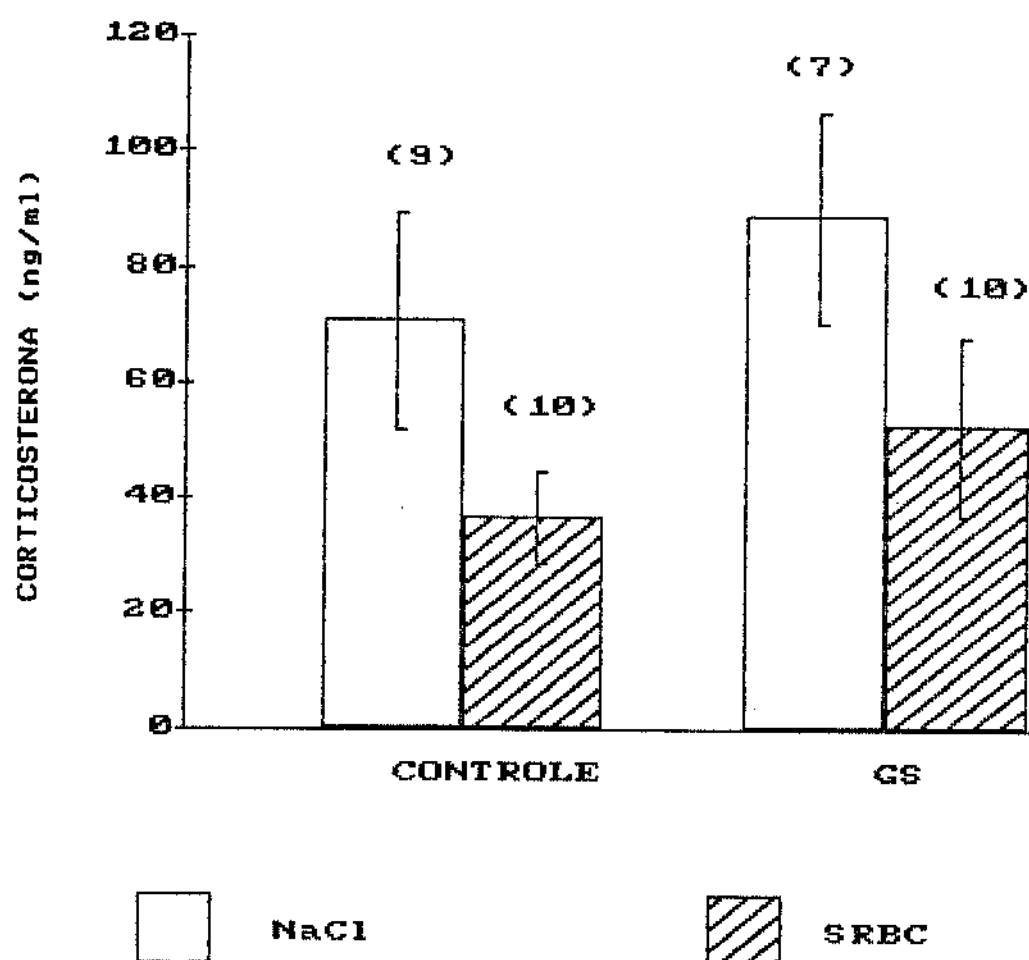


FIGURA 10 - Valores das médias $\pm$ EPM dos níveis de corticosterona sérica (ng/ml) dos grupos controle e simulado, 4 dias após a imunização com NaCl ou SRBC.
() indica número de animais

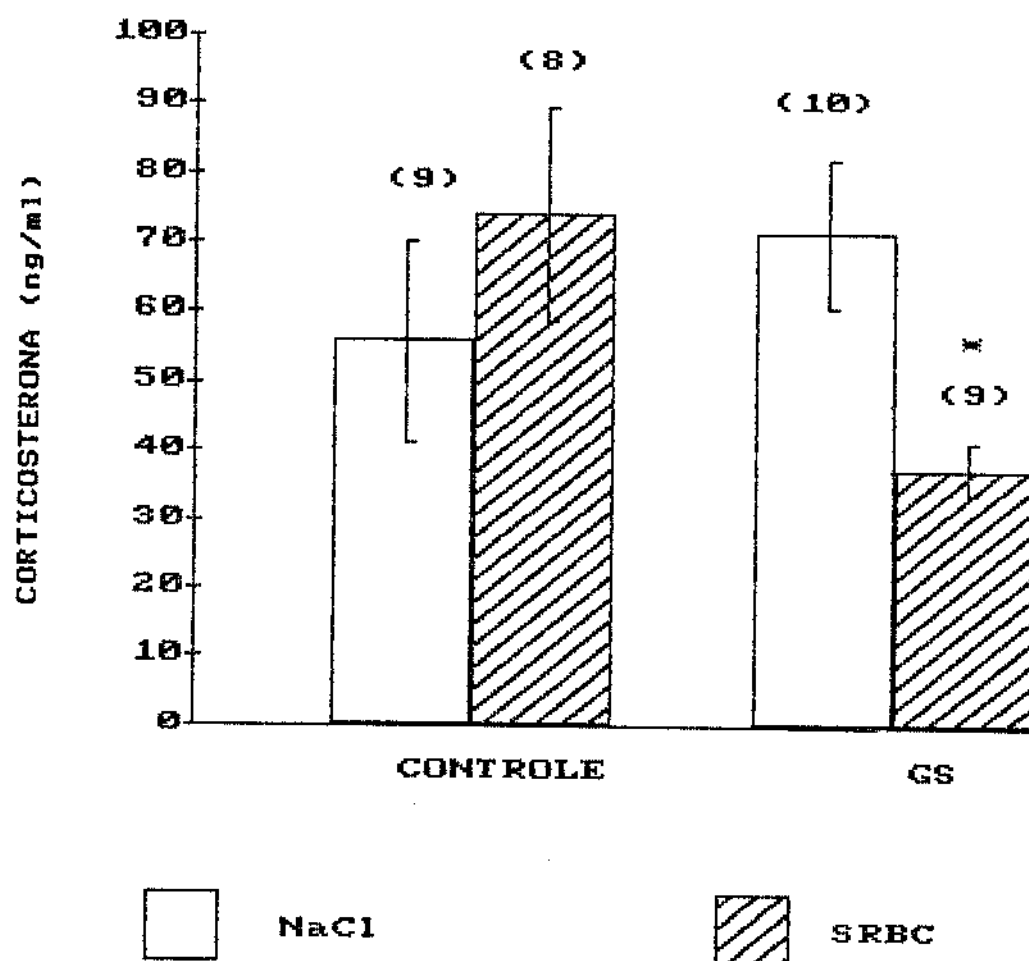


FIGURA 11 - Valores das médias $\pm$ EPM dos níveis de corticosterona sérica (ng/ml) dos grupos controle e simulado, 5 dias após a imunização com NaCl ou SRBC.

() indica o número de animais

* $p < 0,05$ em relação ao controle

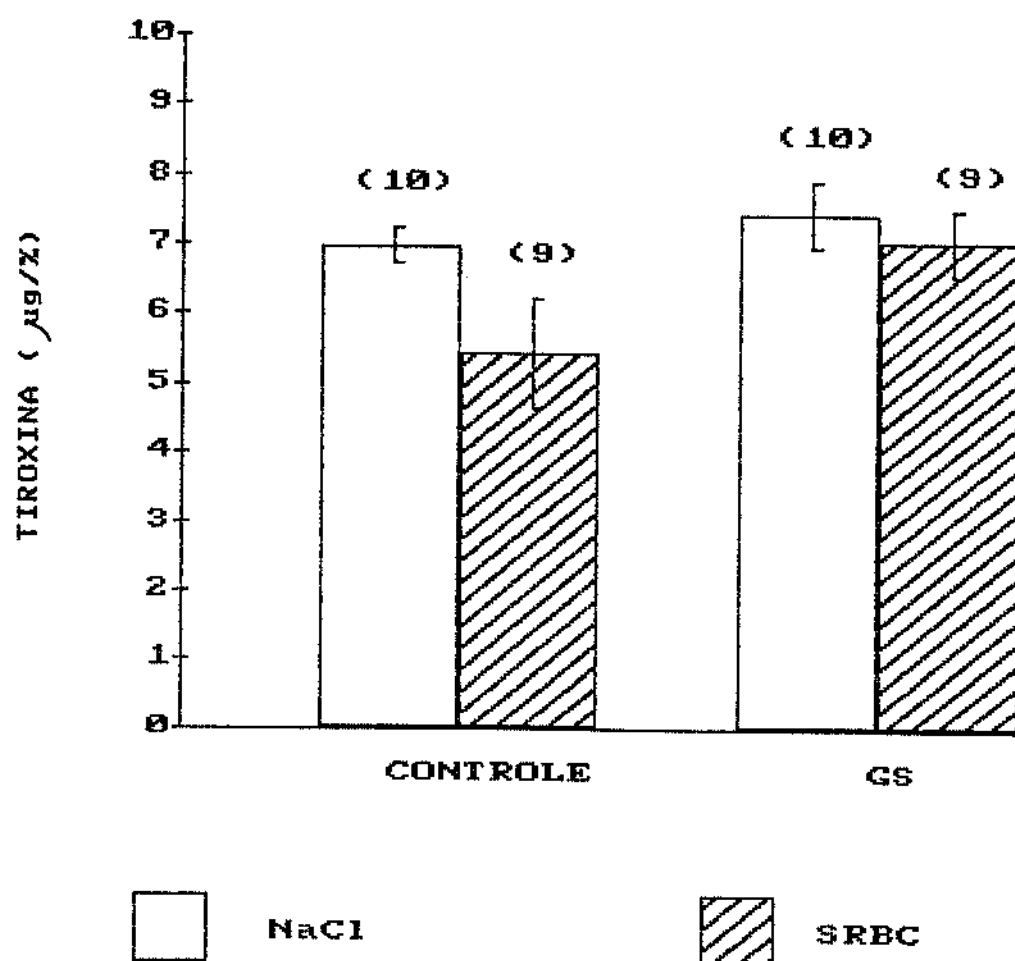


FIGURA 12 - Valores das médias $\pm$ EPM dos níveis de tiroxina sérica ($\mu\text{g}/\%$) dos grupos controle e simulado 4 dias após a imunização com NaCl ou SRBC.

() indica o número de animais

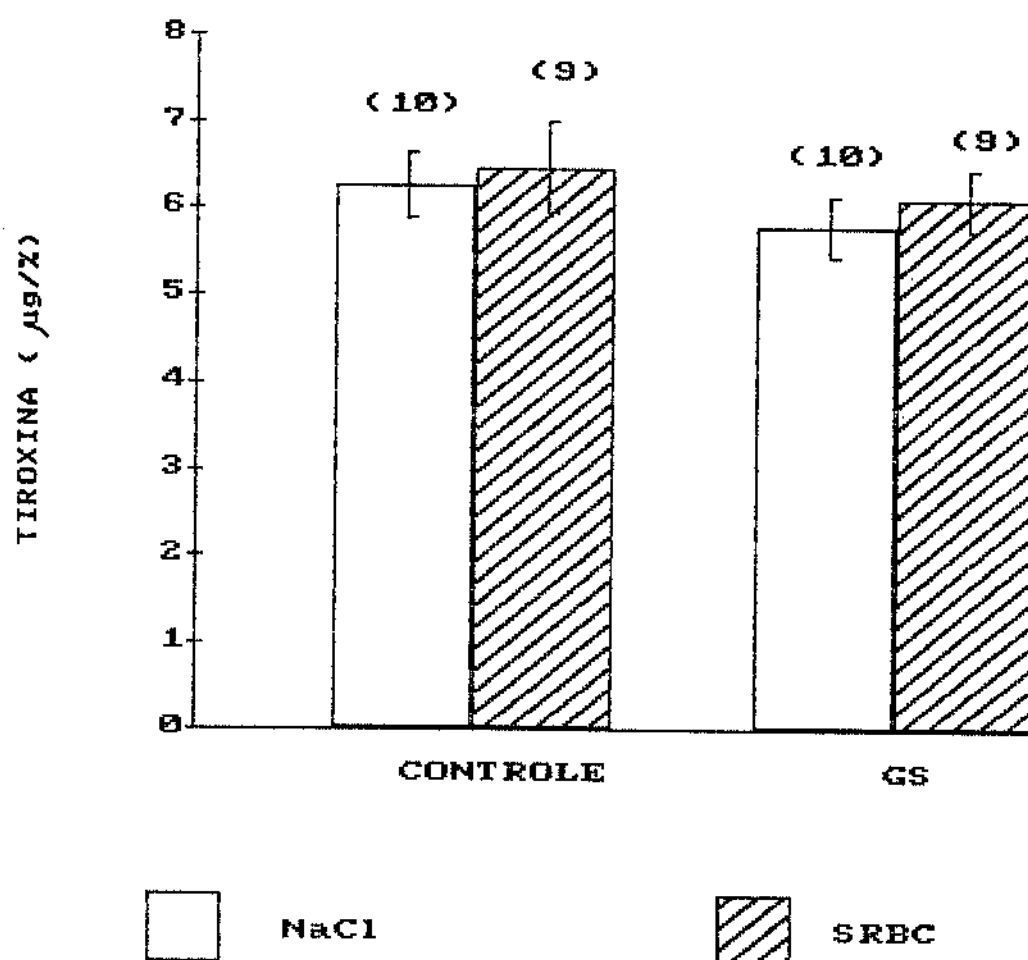


FIGURA 13 - Valores das médias $\pm$ EPM dos níveis de tiroxina sérica ($\mu\text{g}/\%$) dos grupos controle e simulado, 5 dias após imunização com NaCl ou SRBC.

() indica número de animais

PESO DAS GLÂNDULAS.

As Tabelas 3 e 4 apresentam os pesos das diferentes glândulas (mg/100g de peso corporal do rato) dos grupos simulado e controle, 4 e 5 dias após as imunizações.

Os animais simulados, inoculados com SRBC, tiveram os valores dos pesos do timo, significativamente inferiores ($p < 0,05$) e testículos com os pesos superiores ($p < 0,05$), comparados aos inoculados com solução salina fisiológica no 4º dia de resposta sendo que, em relação ao controle, todas as glândulas permaneceram sem diferenças significativas. No 5º dia após a imunização, somente os pesos da tiróide dos animais simulados, imunizados com SRBC, apresentaram-se com valores inferiores ao controle ($p < 0,05$).

CELULARIDADE

Quanto ao número de células totais $\times 10^6$ céls. do baço, os animais simulados, apresentaram valores superiores ($p < 0,05$) no 4º dia quando comparados aos valores de 5º dia, sendo que a celularidade do 5º dia, se mostrou significativamente inferior também em relação ao controle (Tabela 5).

A viabilidade celular demonstrou que 80% das células nucleadas permaneceram viáveis durante todo o experimento.

TABELA 3 - Valores médios $\pm$ EPM do peso relativo das glândulas adeno-hipófise, tiróide, adrenais, timo e testículos dos grupos controle e simulado, inoculados com hemácia de carneiro (SRBC) ou solução salina fisiológica (NaCl) e sacrificados 4 dias após a imunização.

PESOS (mg/100g de peso corporal)						
	ADENO-HIPÓFISE	TIRÓIDE	ADRENAIS	TIMO	TESTÍCULOS	
GC	NaCl	2.16 $\pm$ 0.14 (11)	5.24 $\pm$ 0.21 (10)	16.76 $\pm$ 0.64 (11)	107.10 $\pm$ 10.22 (11)	1060.29 $\pm$ 43.84 (11)
	SRBC	2.11 $\pm$ 0.07 (9)	5.73 $\pm$ 0.27 (9)	16.31 $\pm$ 0.57 (9)	109.74 $\pm$ 7.82 (9)	1011.93 $\pm$ 39.90 (9)
GS	NaCl	2.17 $\pm$ 0.09 (8)	5.76 $\pm$ 0.14 (8)	17.62 $\pm$ 0.40 (8)	119.01 $\pm$ 4.98 (8)	987.12 $\pm$ 41.51 (8)
	SRBC	2.02 $\pm$ 0.10 (10)	5.68 $\pm$ 0.29 (10)	17.68 $\pm$ 0.70 (10)	*98.77 $\pm$ 2.29 (9)	*1099.44 $\pm$ 49.22 (10)

() indica o número de animais

* $p < 0,05$ em relação ao GS-NaCl

TABELA 4 - Valores médios $\pm$ EPM do peso relativo das glândulas adeno-hipófise, tiróide, adrenais, timo e testículos dos grupos controle e simulado, inoculados com hemácia de carneiro (SRBC) ou solução salina fisiológica (NaCl) e sacrificados 5 dias após a imunização.

PESOS (mg/100g de peso corporal)						
	ADENO-HIPÓFISE	TIRÓIDE	ADRENAIS	TIMO	TESTÍCULOS	
GC	NaCl 2.00 $\pm$ 0.09 (9)	5.69 $\pm$ 0.45 (9)	14.55 $\pm$ 0.49 (9)	82.81 $\pm$ 4.96 (9)	937.12 $\pm$ 32.31 (9)	
	SRBC 1.98 $\pm$ 0.09 (7)	5.76 $\pm$ 0.27 (8)	14.76 $\pm$ 0.60 (8)	87.86 $\pm$ 4.12 (8)	999.74 $\pm$ 47.23 (7)	
GS	NaCl 1.87 $\pm$ 0.12 (10)	4.84 $\pm$ 0.21 (10)	14.64 $\pm$ 0.46 (10)	88.01 $\pm$ 4.24 (10)	992.74 $\pm$ 31.59 (9)	
	SRBC 1.98 $\pm$ 0.05 (10)	*4.41 $\pm$ 0.02 (10)	15.38 $\pm$ 0.45 (10)	91.71 $\pm$ 6.11 (10)	919.25 $\pm$ 35.93 (10)	

() indica o número de animais

* $p < 0,05$ em relação ao GC

TABELA 5 - Valores médios $\pm$ EPM da celularidade (cél.s. totais $\times 10^6$ conc.) dos grupos controle e lesão simulada operados, inoculados com hemácia de carneiro (SRBC) ou solução salina fisiológica (NaCl) e sacrificados 4 e 5 dias após a imunização.

		número de células totais $\times 10^6$ conc.	
		GC	GS
4 DIAS	NaCl	456.65 $\pm$ 19.71 (11)	540.60 $\pm$ 27.01 (8)
	SRBC	525.50 $\pm$ 81.12 (9)	*487.92 $\pm$ 30.92 (10)
5 DIAS	NaCl	596.00 $\pm$ 55.00 (9)	355.44 $\pm$ 23.79 (10)
	SRBC	549.26 $\pm$ 52.14 (7)	**355.44 $\pm$ 17.63 (10)

() indica número de animais

* $p < 0,05$ em relação ao 5º dia

** $p < 0,05$ em relação ao GC

4.3 GRUPO LESADO - Efeito das lesões do complexo amigdalóide na resposta imune primária de ratos.

Os resultados obtidos neste experimento, pretendem demonstrar a importância do complexo amigdalóide, estrutura do sistema nervoso central e parte do sistema límbico, na modulação do sistema imune, através das possíveis alterações dos parâmetros propostos a serem analisados. Os grupos em questão foram: animais com lesões eletrolíticas na estria terminal (L.ST), na fímbria hipocampal (L.F) e lesões mista atingindo a parte distal da fímbria e parte da estria (L.M), sendo que estes grupos foram comparados com o grupo simulado, 4 e 5 dias após a imunização com hemácia de carneiro.

RESPOSTA IMUNE PRIMÁRIA

A Figura 14 representa os valores do nº de $PFC \times 10^{-4}$ céls. viáveis do baço dos diferentes grupos com lesões, comparados com seu controle (grupo simulado) no 4º dia de resposta anti-SRBC. Os animais com lesão de estria (L.ST) e lesão mista (L.M) apresentaram valores significativamente superiores ($p < 0,05$) ao grupo simulado, sendo que a lesão de fímbria (L.F) nenhuma alteração foi observada.

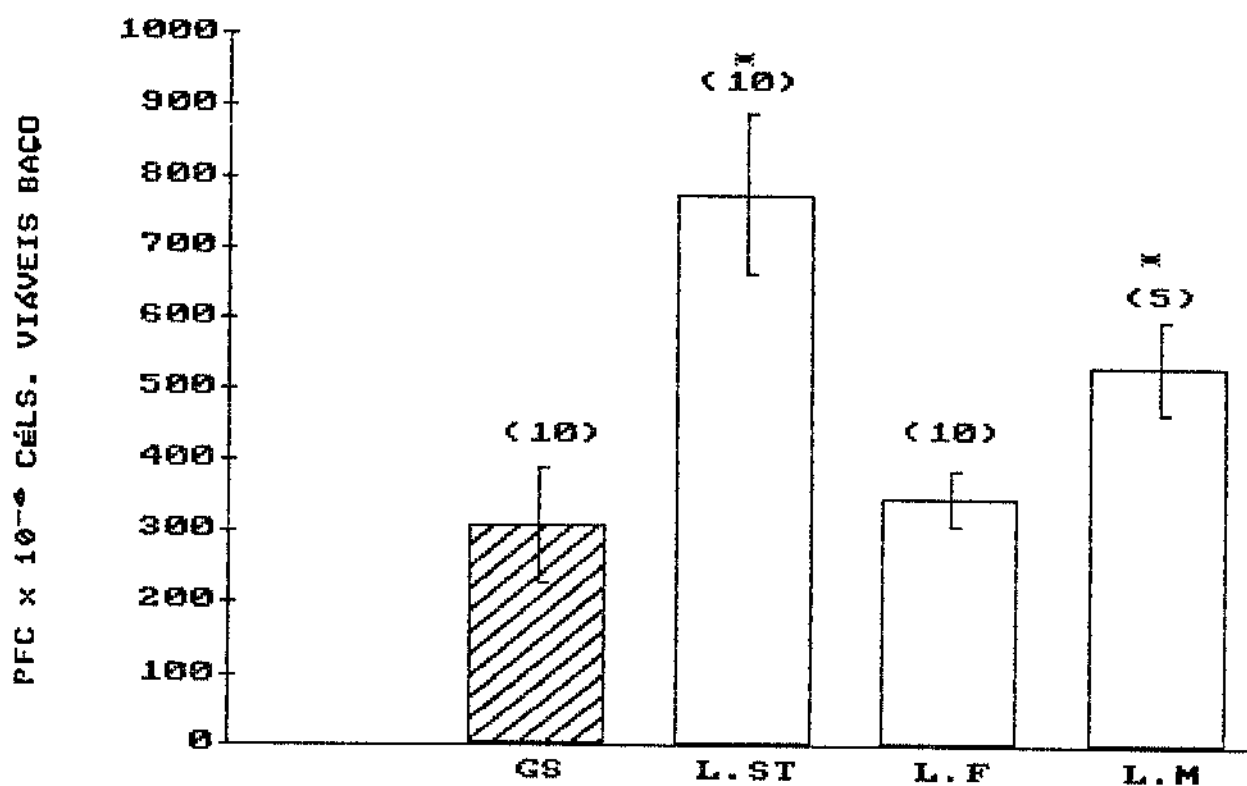


FIGURA 14 - Valores das médias $\pm$ EPM do número de PFC $\times 10^{-4}$ cels. viáveis do baço dos grupos simulado (GS) e lesados na estria terminal (L.ST), fímbria hipocampal (L.F) e lesão mista (L.M), 4 dias após a imunização com SRBC.

() indica o número de animais

* $p < 0,05$ em relação ao GS

A resposta obtida após 5 dias da imunização, representada na Figura 15, nos mostra uma redução significativa ($p < 0,05$) da resposta do PFC dos animais lesados na região da fímbria (L.F), enquanto que no grupo com lesão mista (L.M) estes valores permaneceram elevados ($p < 0,05$).

DOSAGENS HORMONAIS

Foram dosados corticosterona e tiroxina dos animais com lesões e comparados com o grupo simulado após 4 e 5 dias da imunização com hemácia de carneiro.

DOSAGEM DE CORTICOSTERONA

A Figura 16 representa os valores das dosagens de corticosterona 4 dias após a imunização com SRBC. O grupo de animais com lesão mista (L.M), apresentou valores significativamente superiores ($p < 0,05$) aos demais grupos. Ao analisarmos o 5º dia de resposta (Figura 17), os níveis de corticosterona dos animais com lesão não se diferenciaram do grupo simulado.

A lesão mista (L.M), foi a que demonstrou comportamento mais relevante, visto pelo aumento de PFC mantido no 4º e 5º dia simultaneamente ao aumento de corticosterona no 4º dia, se diferenciando das demais lesões (Figuras 18 e 19).

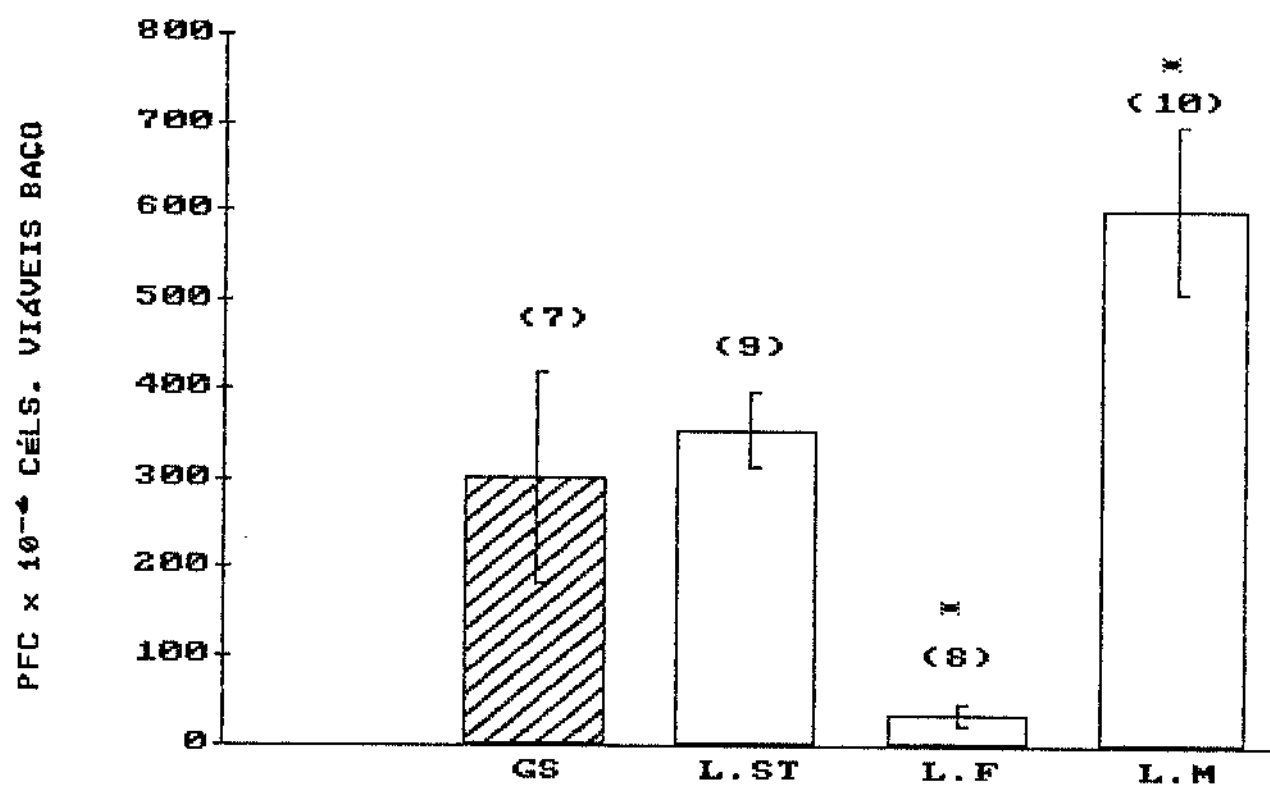


FIGURA 15 - Valores das médias $\pm$ EPM do número de PFC $\times 10^{-4}$ cels. viáveis do baço dos grupos simulado (GS) e lesados na estria terminal (L.ST), fímbria hipocampal (L.F) e lesão mista (L.M), 5 dias após a imunização com SRBC.

() indica o número de animais

* $p < 0,05$ em relação ao GS

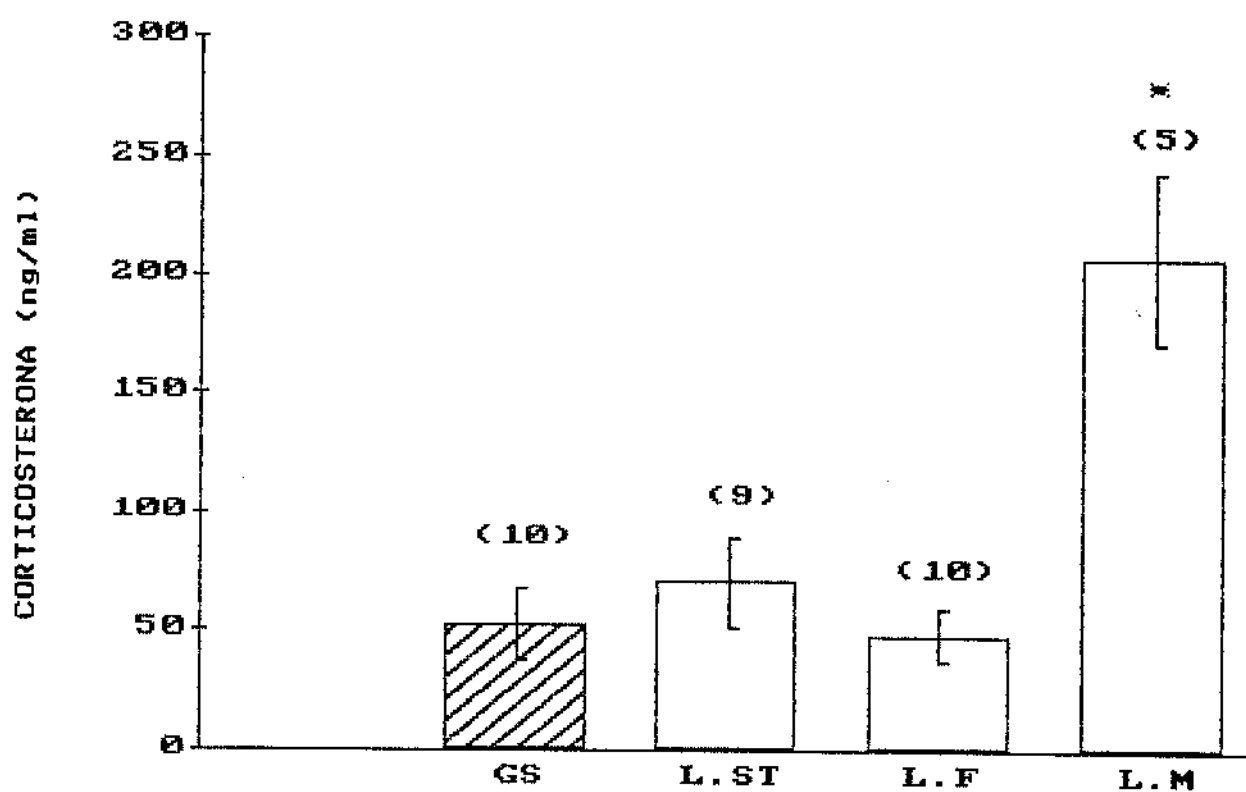


FIGURA 16 - Valores das médias $\pm$ EPM dos níveis de corticosterona sérica (ng/ml) dos grupos simulado (GS) e lesados na estria terminal (L.ST), fímbria hipocampal (L.F) e lesão mista (L.M), 4 dias após a imunização com SRBC.

() indica o número de animais

* $p < 0,05$ em relação ao GS

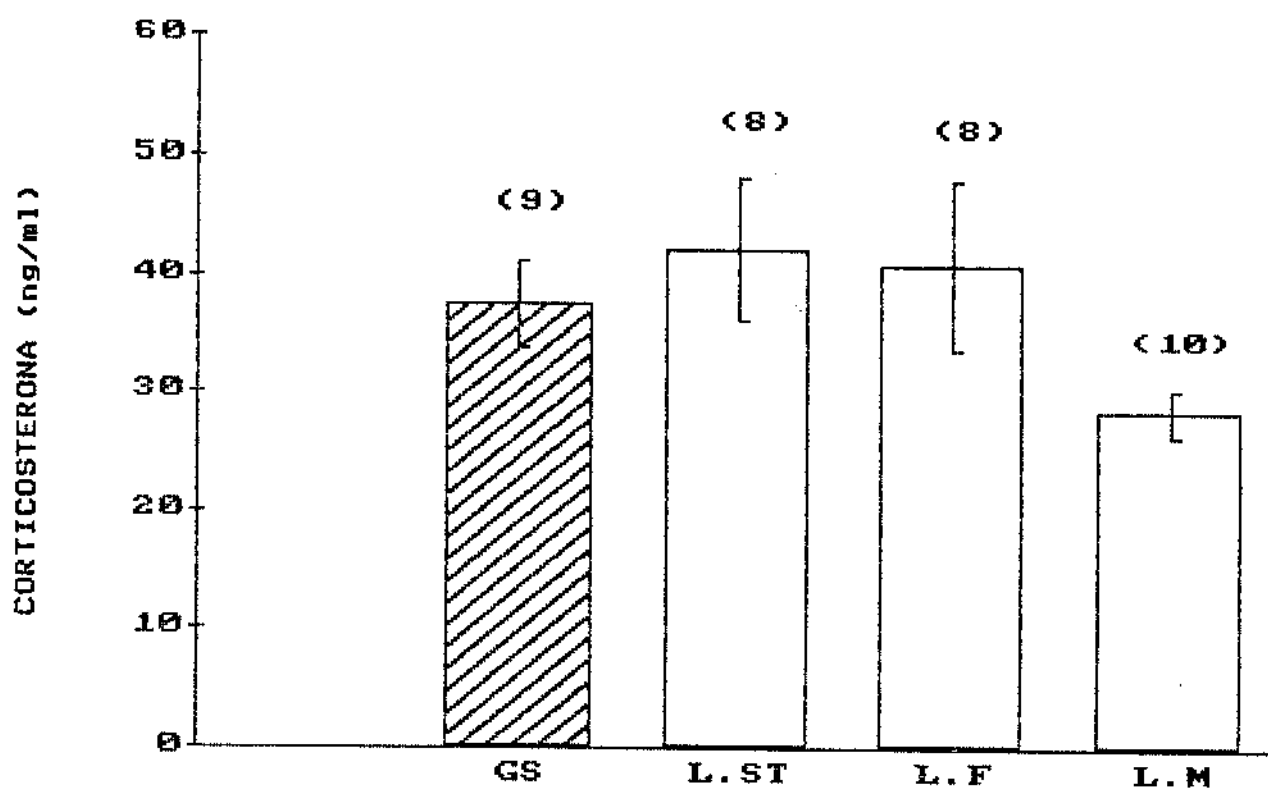


FIGURA 17 - Valores das médias $\pm$ EPM dos níveis de corticosterona sérica (ng/ml) dos grupos simulado (GS) e lesados na estria terminal (L.ST), fímbria hipocampal (L.F) e lesão mista (L.M), 5 dias após a imunização com SRBC.

() indica o número de animais

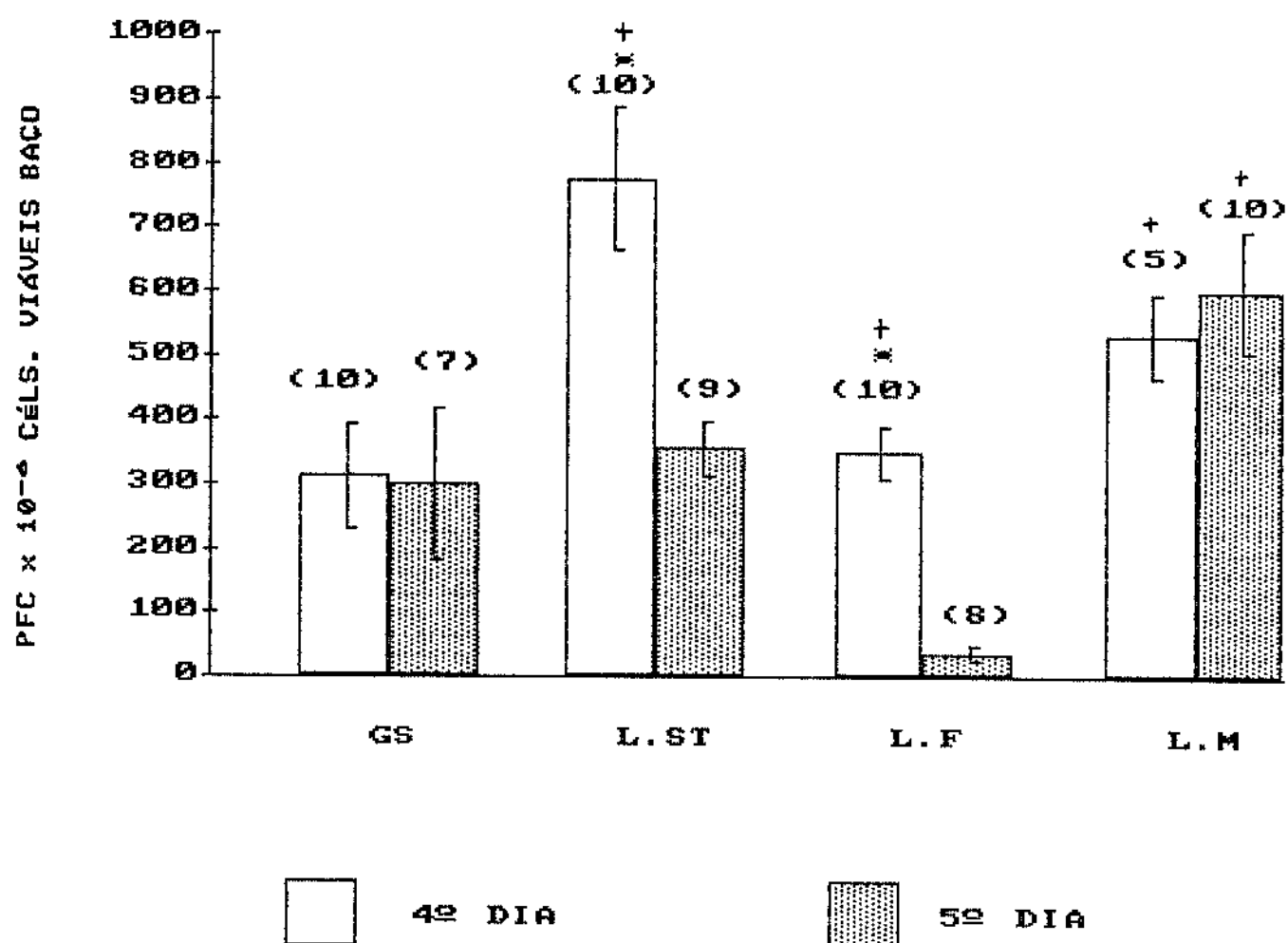


FIGURA 18 - Valores das médias $\pm$ EPM do n $^{\circ}$ de PFC $\times 10^{-4}$ céls. viáveis do baço, dos grupos simulado (GS) e lesados na estria terminal (L.ST), fímbria hipocampal (L.F) e lesão mista (L.M), e seus Valores comparados entre 40 e 50 dias após a imunização com SRBC.

() indica o número de animais

* $p < 0,05$ em relação ao 50 dia

+ $p < 0,05$ em relação ao GS

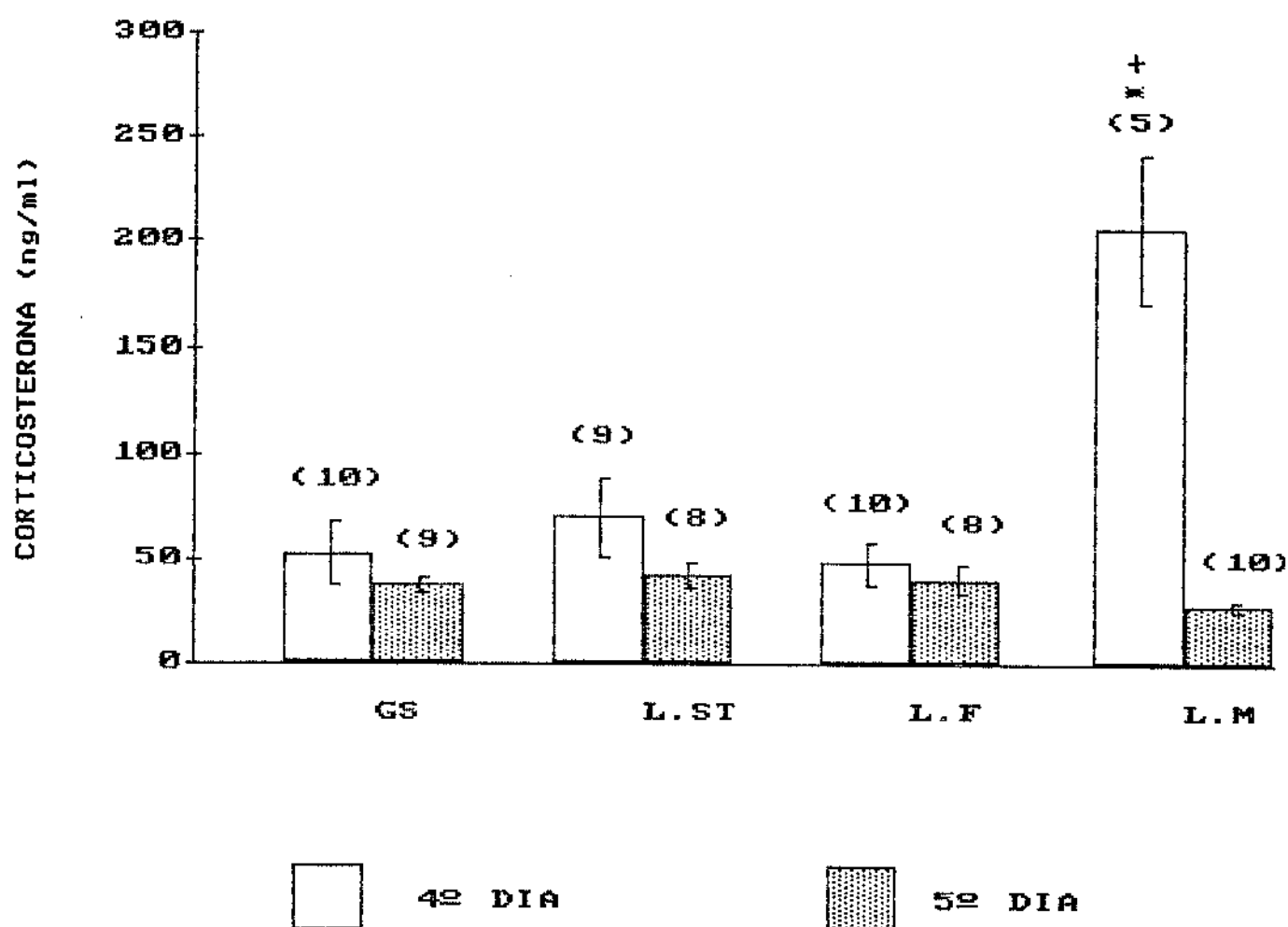


FIGURA 19 - Valores das médias $\pm$ EPM dos níveis de corticosterona sérica (ng/ml), dos grupos simulado (GS) e lesados na estria terminal (L.ST), fímbria hipocampal (L.F) e lesão mista (L.M), e seus valores comparados entre 40 e 50 dias após a imunização com SRBC.

() indica o número de animais

* $p < 0,05$ em relação ao 50 dia

+ $p < 0,05$ em relação ao GS

DOSAGEM DE TIROXINA

As Figuras 20 e 21 mostram os valores dos níveis de tiroxina sérica em $\mu\text{g}\%$ dos animais lesados, sendo que no 50 dia após imunização com SRBC, todos os animais lesados tiveram seus níveis aumentados significativamente ($p < 0,05$) em relação ao seu controle. No dia anterior nenhuma alteração foi observada.

PESO DAS GLÂNDULAS

Foram comparados os pesos relativos ($\text{mg}\%$) das diferentes glândulas dos animais lesados, com seus respectivos grupos simulados de 4 e 5 dias após a imunização com hemácia de carneiro.

A Tabela 6 mostra que, 4 dias após a imunização, os animais com lesão mista (L.M) apresentam os pesos da tiróide e timo significativamente superiores ($p < 0,05$) ao controle, sendo que seus testículos se apresentaram com valores inferiores ($p < 0,05$). Os demais grupos lesados (L.F e L.ST) apresentaram também redução nos valores dos pesos dos testículos ($p < 0,05$).

No 50 dia (Tabela 7), os animais com lesão mista (L.M), permaneceram com os valores aumentados de tiróide, e aumento significativo da adeno-hipófise. O grupo com lesão de

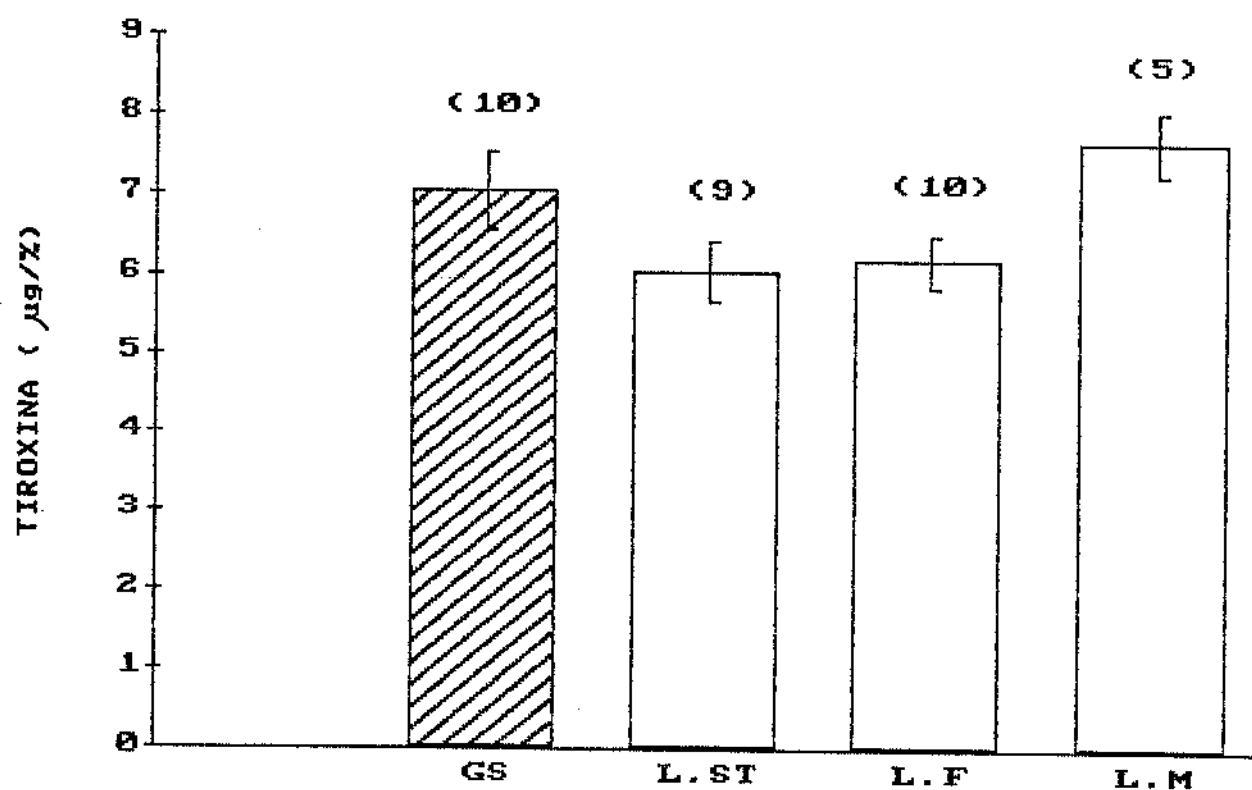


FIGURA 20 - Valores das médias $\pm$ EPM dos níveis de tiroxina sérica ($\mu\text{g}/\%$) dos grupos simulado (GS) e lesados na estria terminal (L.ST), fímbria hipocampal (L.F) e lesão mista (L.M), 4 dias após a imunização com SRBC.

() indica o número de animais

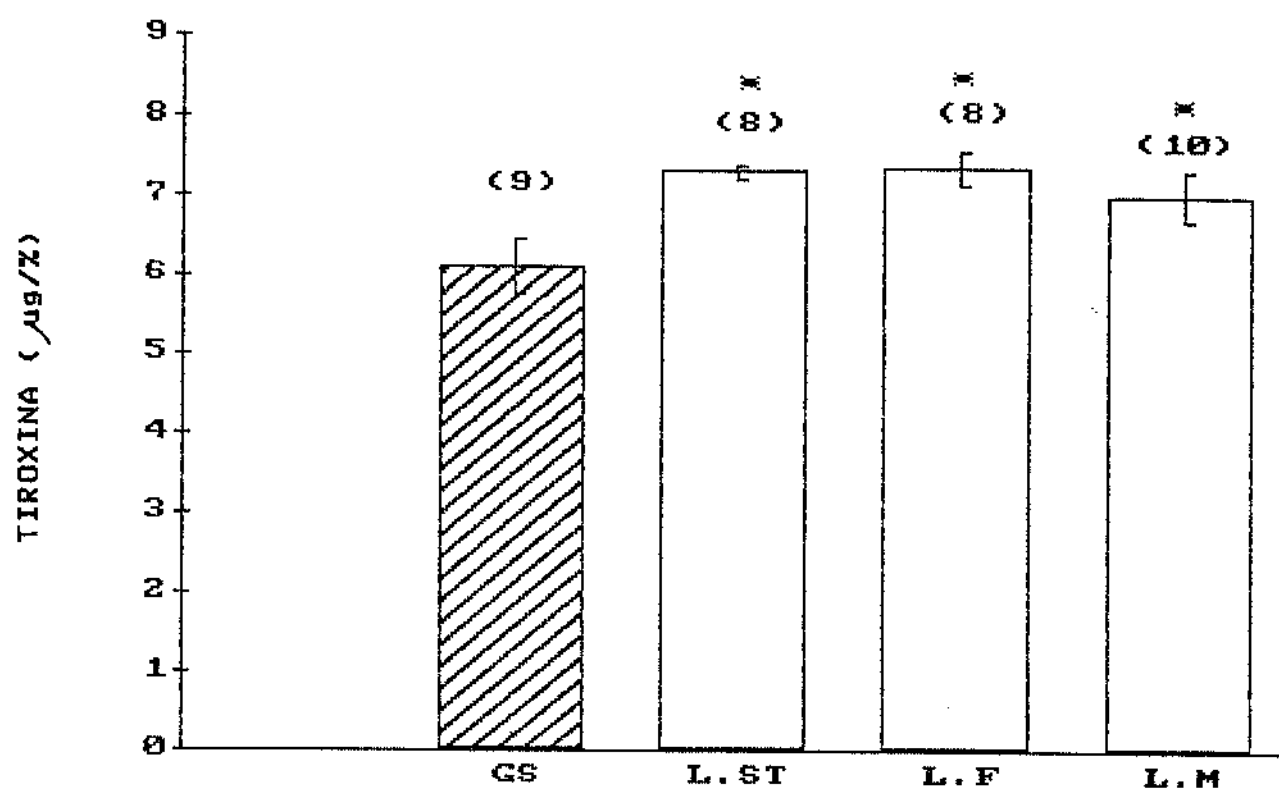


FIGURA 21 - Valores das médias $\pm$ EPM dos níveis de tiroxina sérica ($\mu\text{g}/\%$) dos grupos simulado (GS) e lesados na estria terminal (L.ST), fímbria hipocampal (L.F) e lesão mista (L.M), 5 dias após a imunização com SRBC.

() indica o número de animais

* $p < 0,05$ em relação ao GS

TABELA 6 - Valores médios $\pm$ EPM do peso relativo das glândulas adeno-hipófise, tiróide, adrenais, timo e testículos dos grupos simulado e lesados na estria terminal (L.ST), fímbria hipocampal (L.F) e parte distal da fímbria e parte da estria (L.M), inoculados com hemácia de carneiro (SRBC) e sacrificados 4 dias após a imunização.

PESOS (mg/100g de peso corporal)					
	ADENO-HIPÓFISE	TIRÓIDE	ADRENAIS	TIMO	TESTÍCULOS
GS	2.02 $\pm$ 0.10 (10)	5.68 $\pm$ 0.29 (10)	17.68 $\pm$ 0.70 (10)	98.77 $\pm$ 2.29 (9)	1099.44 $\pm$ 49.22 (10)
L. ST	2.10 $\pm$ 0.05 (10)	5.49 $\pm$ 0.43 (10)	17.88 $\pm$ 1.31 (9)	114.35 $\pm$ 10.69 (10)	*894.29 $\pm$ 38.66 (10)
L. F	2.16 $\pm$ 0.09 (10)	5.70 $\pm$ 0.33 (10)	15.95 $\pm$ 0.85 (10)	93.75 $\pm$ 10.01 (10)	*984.37 $\pm$ 22.98 (10)
L. M	2.23 $\pm$ 0.06 (5)	*6.56 $\pm$ 0.19 (5)	15.54 $\pm$ 1.27 (5)	*118.96 $\pm$ 12.85 (5)	*849.50 $\pm$ 82.94 (5)

() indica número de animais

* $p < 0,05$ em relação ao GS

TABELA 7 - Valores médios $\pm$ EPM do peso relativo das glândulas adeno-hipófise, tiróide, adrenais, timo e testículos dos grupos simulado e lesados na estria terminal (L.ST), fímbria hipocampal (L.F) e parte distal da fímbria e parte da estria (L.M), inoculados com hemácia de carneiro (SRBC) e sacrificados 5 dias após a imunização.

PESOS (mg/100g de peso corporal)					
	ADENO-HIPÓFISE	TIRÓIDE	ADRENAIS	TIMO	TESTÍCULOS
GS	1.98 $\pm$ 0.05 (10)	4.41 $\pm$ 0.22 (10)	15.38 $\pm$ 0.45 (10)	91.71 $\pm$ 6.11 (10)	919.25 $\pm$ 35.93 (10)
L. ST	*2.15 $\pm$ 0.05 (9)	*5.90 $\pm$ 0.28 (9)	14.97 $\pm$ 0.74 (9)	*113.63 $\pm$ 8.96 (9)	961.85 $\pm$ 28.71 (9)
L. F	2.15 $\pm$ 0.14 (8)	*5.21 $\pm$ 0.26 (8)	15.23 $\pm$ 0.87 (8)	104.54 $\pm$ 9.43 (8)	953.09 $\pm$ 38.78 (8)
L. M	*2.15 $\pm$ 0.08 (10)	*5.55 $\pm$ 0.28 (10)	17.73 $\pm$ 0.64 (10)	107.91 $\pm$ 7.98 (10)	923.23 $\pm$ 15.90 (10)

() indica número de animais

* $p < 0,05$ em relação ao GS

estria (L.ST) teve aumento significativo ($p<0,05$) da adeno-hipófise, tiróide e timo. Um aumento da tiróide também foi observado no grupo com lesão de fímbria (L.F).

CELULARIDADE

A Tabela 8, representa o número de células nucleadas $\times 10^4$ conc., 4 e 5 dias após a imunização com SRBC, dos diferentes grupos com lesões no complexo amigdalóide, comparados com seus grupos simulados. A celularidade dos diferentes grupos de animais lesados se apresentaram superiores ($p<0,05$) ao GS no 5º dia após imunização. No 4º dia nenhuma diferença foi observada. As células nucleadas se mostraram com 80% de viabilidade durante todo o experimento.

TABELA 8 - Valores médios $\pm$ EPM da celularidade (cél. totais $\times 10^6$ conc.) dos grupos simulado e lesados, inoculados com hemácia de carneiro (SRBC) e sacrificados 4 e 5 dias após a imunização.

	número de células totais $\times 10^6$ conc.	
	4 DIAS	5 DIAS
GS	487.92 $\pm$ 30.92 (10)	355.44 $\pm$ 17.63 (10)
L. ST	442.32 $\pm$ 40.39 (10)	*426.40 $\pm$ 16.35 (9)
L. F	449.52 $\pm$ 41.95 (10)	*411.00 $\pm$ 25.73 (8)
L. H	467.84 $\pm$ 45.78 (5)	*424.32 $\pm$ 32.22 (10)

() indica número de animais

* $p < 0,05$ em relação GS

5. DISCUSSÃO

Estudos sistemáticos estão sendo realizados em nosso laboratório com o objetivo de investigar os efeitos de determinadas estruturas do complexo límbico sobre alguns aspectos do sistema imune, como a resposta de PFC-IgM e sua correlação principalmente com os níveis de corticosterona. O presente trabalho, dando continuidade a esta linha de pesquisa, teve por finalidade analisar o efeito do isolamento de estruturas do complexo amigdalóide que acreditamos ser fundamentais para a integridade da resposta imune, e discutir os possíveis mecanismos envolvidos.

Os resultados obtidos com o grupo controle, estão em acordo com os de BESEDOVSKY et al, (1977), na publicação pioneira em demonstrar a resposta imune induzindo modificações endócrinas em ratos normais. Esses autores demonstraram que o pico de resposta imune IgM anti-SRBC é acompanhada por elevação de corticosterona e diminuição da tiroxina durante a manutenção desta resposta, fatos estes que também caracterizaram nossos resultados, onde os valores de PFC IgM anti-SRBC se mantiveram juntamente com a celularidade no 40 e 50 dias (Figura 6 e Tabela 2), com aumento de corticosterona no 50 dia e diminuição da tiroxina nestes dois dias (Figuras 7 e 8).

O fato dos animais, ao desenvolverem resposta imunológica frente a antígenos, mostrarem ao mesmo tempo aumento de glicocorticóides sérico em proporção à amplitude da resposta de PFC, foi demonstrado ser consequência dos mecanismos de feedback que controlam a expansão da resposta imune. Esses mecanismos podem, via mediadores liberados por linfócitos durante a sua fase de proliferação, agir a nível de hipotálamo-pituitária-adrenal, aumentando a quantidade de ACTH liberado e consequentemente de corticosterona (BESEDOVSKY et al, 1986, 1985b).

Os glicocorticóides, por suas ações anti-inflamatórias dentre tantas, podem bloquear a produção e a ação de muitas linfocinas (IL-1, IL-2, -IFN) (WAHL et al, 1975), ou atuar diretamente na indução da resposta imune (SNYDER & UNANUE, 1982). Deste modo, os produtos da resposta imune e do sistema neuroendócrino, os quais agindo em sinergismo, representariam um mecanismo da regulação imune.

Quanto à tiroxina, juntamente com o GH, tem papel de restaurar e desenvolver normalmente as células produtoras de anticorpos (BARONI et al, 1969; SORKIN et al, 1972; PIERPAOLI et al, 1969). Deste modo a tiroxina teria sua ação máxima em fases precedentes ao pico de resposta, fato este reforçado pelo aumento do timo observado somente no 4º dia (Tabela 1), dando-nos a indicação de possível ativação do eixo tiroidiano nos dias anteriores ao pico de corticosterona e sua ação em

diferentes tecidos linfáticos. Outros hormônios não devem ter suas ações descartadas, como por exemplo a prolactina, que sabidamente também está envolvida com a competência imune (BERCZI et al, 1981). Portanto nesta fase experimental, foi possível determinar que os animais utilizados, se mostraram em acordo com a literatura quanto à resposta imune humoral PFC-IgM e às alterações de corticosterona e tiroxina séricas ocorridas no pico da resposta (BESEDOVSKY et al, 1975).

Dados da literatura nos mostram que a cirurgia simulada poderia induzir desarranjos funcionais significativos no sistema nervoso central, decorrentes do estresse cirúrgico ou simplesmente pela anestesia, os quais seriam suficientes para causar depressão de linfócitos no baço e linfonodo de camundongos. Estes efeitos ocorreriam dentro das primeiras 24-48 horas após o estresse e, num período de 1 a 3 semanas de pós-operatório, a recuperação da população destas células atingiria índices normais (ROCHA, 1985). Outro efeito observado por FORNI et al, (1984), seria a diminuição da atividade das células NK após 7 dias da cirurgia simulada em camundongos, sendo que estes níveis também voltam a normalidade após 3 semanas. Estes dados, juntamente com os obtidos anteriormente em nosso laboratório, nos levaram a submeter os animais ao sacrifício somente após transcorridos 25 a 30 dias da cirurgia.

A simples introdução do eletrodo (trauma mecânico), manuseio, anestesia ou, de um modo geral, o estresse cirúrgico sofrido pelo grupo simulado não foram suficientes para alterar o quadro de resposta quanto ao PFC, os quais mostraram o mesmo comportamento dos animais não operados. Foram mantidos no 4º e 5º dias a quantidade de células formadoras de placas (Figura 9), enquanto os níveis de corticosterona no 5º dia, se mostraram com valores inferiores contrariando os valores máximos conseguido neste dia pelos animais controles (Figura 11).

Embora o máximo de cuidado tenha sido tomado para que o eletrodo não atingisse o córtex cerebral durante a realização da cirurgia simulada, acreditamos que, possivelmente, o comprometimento de neurônios mecanicamente alteraram as atividades funcionais de estruturas. Este dano não foi suficiente para manter alterada a resposta de PFC, mas para modificar os níveis de corticosterona; ou ainda, que outros mecanismos (sistema nervoso autônomo) poderiam estar envolvidos para causar este tipo de resposta. De qualquer modo, outros mecanismos envolvidos para a manutenção do pico de resposta de PFC nestes animais, que não por meio de corticosterona, não influenciaram também a nível de resposta de tiroxina a qual se manteve com valores semelhantes aos animais não operados no 4º e 5º dias após a imunização (Figuras 12 e 13).

A diminuição do número de células totais nucleadas do baço do GS em relação ao GC e aos inoculados com salina, observada no 5º dia (Tabela 5), poderia ser decorrente também do trauma mecânico. As alterações relacionadas aos mecanismos de estresse como a redistribuição do PFC, ou de células envolvidas na sua geração, para outros compartimentos (DRACOTT & SMITH, 1979), não devem ser consideradas pois os animais foram utilizados em um período em que não havia atividade dos glicocorticóides gerado nestas condições.

As possíveis alterações ocorridas com estes animais não modificaram o peso da maioria das glândulas analisadas (Tabelas 3 e 4), comparadas aos valores obtidos dos animais não operados, sendo que os valores significativos encontrados quanto ao timo e testículos no 4º dia, provavelmente devam ser decorrentes da interação sistema reprodutivo-imune a qual parece ser mediada por hormônios tímicos e gonadais (GROSSMAN, 1985).

Com base nos resultados obtidos com o grupo simulado e ciente dos possíveis mecanismos envolvidos, procuramos validar o comportamento do próximo grupo experimental submetido a lesões por eletrocoagulação.

Baseado em observações de que estruturas hipotalâmicas estão relacionadas com a imunomodulação através da atividade principalmente do eixo hipófise-adrenal (TYREY &

NALBANDOV, 1972; SAPHIER et al, 1987; CROSS et al, 1980; ROSZMAN, 1985), a interrupção da principal via emergente do complexo amigdalóide para o hipotálamo, a estria terminal (L.ST), é motivo de estudo neste trabalho.

A interrupção de outras vias, como trato córtico-hipotalâmico medial pela lesão mista (L.M) e de parte do complexo hipocampal (L.F), conseguidas em decorrência dos grupos experimentais serem terminais, portanto só depois de diagnosticadas as lesões é que estes animais foram agrupados, nos possibilitou a formação de grupos com lesões que sabidamente têm papel modulador. Este fato nos forneceram resultados úteis para realçar os dados obtidos com nosso principal objetivo: correlacionar a lesão de estria terminal com a resposta imune.

A entrada de um antígeno, definido por BESEDOVSKY et al, (1975), como estresse imunogênico, ao encontrar um animal já com as condições basais alteradas, decorrente da lesão estereotáxica, se manifestaria de modo distinto do animal submetido à cirurgia simulada quanto à liberação de hormônios principalmente em vias do eixo amígdala-hipotálamo-hipófise-adrenal, sabidamente fundamentais para o controle de ACTH, sua ação a nível de liberação de corticosterona, e consequentemente a resposta imune periférica (ALLEN & ALLEN, 1975). Deste modo os grupos lesados foram analisados e comparados com os respectivos GS.

A lesão de estria terminal provocou aumento significativo de resposta de PFC-IgM no 4º dia após a imunização, aumento este de cerca de duas vezes maior que os valores obtidos com o GS quando em pico de resposta anti-SRBC (Figura 14), o qual volta para valores próximos ao controle cirúrgico no 5º dia (Figuras 15 e 18), sendo que esta alteração parece não ter sido mediada por corticosterona (Figuras 16, 17 e 19). A estria terminal via componentes oriundos do núcleo intersticial é extremamente importante na regulação do eixo hipófise-adrenal. Isto se deve a grande quantidade de neurônios com afinidade para glicocorticóides e encefalinas presentes em áreas da amígdala (núcleo central e basal) os quais, através desta via, se projetam para o hipotálamo. Este fato nos leva a acreditar que, a lesão da estria provavelmente não deixou predomínio de estruturas excitadoras ou inibidoras de ACTH, permanecendo inalterados os valores de corticosterona (CARRILLO & DUNN, 1977; DUNN, 1987).

O aumento de resposta de PFC, já no 4º dia, poderia ser causada pela liberação de áreas hipotalâmicas tais como dos núcleos ventromedial e paraventricular que agora sem o controle límbico amigdalóide, poderiam influenciar a resposta imune via peptídeos (SOM, TSH, CRF). Ou ainda pelo fato de que, o complexo hipocampal estando íntegro, poderia exercer seus efeitos neste sentido através de mecanismos autônomos. Como demonstrado por BESEDOVSKY et al, (1983) e DEL REY et al, (1981), a influência do sistema nervoso autônomo na regulação

de mecanismos imunes poderia ser vista pela inervação simpática direta do tecido parenquimatosos da maioria dos órgãos linfóides ou ainda, como demonstrado por PAYAM & GOETZL (1985), pelo fato de que interações entre o sistema nervoso periférico via substância P, VIP e SOM com células imuno competentes poderiam exercer influências para manter este quadro de resposta imune.

Dentre os mecanismos possivelmente envolvidos, poderia ainda ser citado a ação do eixo tireoidiano (Figura 21) que, através de TSH, aumentaria a resposta de PFC para o antígeno T dependente (KRUGER & BLALOCK, 1986). Como foi demonstrado por SHIZUME et al, (1962), que a estimulação do complexo hipocampal em cães pode causar aumento da atividade tireoidiana esta proposta parece reforçada.

O aumento do peso relativo das glândulas adeno-hipófise, tiróide, timo e da celularidade (Tabelas 7 e 8), reforçam o envolvimento do eixo tireoidiano e das possíveis ações autônomas, bem como a imunomodulação a nível de sistema retículo endotelial visto que fatores hipotalâmicos (FTS) influenciam a capacidade secretora do timo e consequentemente a resposta imune (FOLCH et al, 1986).

A lesão de fímbria, representada esquematicamente na Figura 5, acarretou uma diminuição drástica da resposta imune humoral no 59 dia (Figura 15), embora este efeito supressivo

pareça não ter sido também mediado por corticosterona circulante (Figuras 16 e 17). Estes dados estão de acordo com FELDMAN & CONFORTI (1980), que demonstraram que a secção de fímbria hipocampal não modifica os níveis de corticosterona.

Embora seja sabido que o hipocampo exerça efeitos inibitórios sobre o eixo adrenal de acordo com a porção do hipocampo envolvida, decorrentes da heterogeneidade funcional destas áreas, manifestações distintas podem ser observadas. A lesão de fímbria medial, conta com projeções diretas da formação hipocampal posterior para os corpos mamilares hipotalâmicos os quais mostram envolvimento principalmente com mecanismos autônomos, que desta forma poderia ser responsável pela supressão da resposta imune observada (FELTEN et al, 1987; BESEDOVSKY et al, 1977; MEIBACH & SIEGEL, 1977).

Não devemos esquecer o fato de que, as estruturas facilitadoras e inibidoras que fazem parte do complexo amigdalóide via núcleo intersticial da estria terminal se presente seria capaz de normalizar a liberação de ACTH e desta forma, os níveis de corticosterona permaneceriam inalterados (TYREY & NALBANDOV, 1972).

Semelhante à lesão de estria, a tiroxina se mostrou aumentada no 50 dia, acompanhada do aumento da tiróide e da celularidade (Figura 21 e Tabelas 7 e 8) mostrando possível comprometimento do eixo tireoidiano.

A lesão mista, atingindo a porção distal da fímbria e parte da estria (Figura 5) teve como efeito o comprometimento do trato cortico-hipotalâmico medial principal via responsável pela influência inibidora do hipocampo sobre o eixo hipófise-adrenal (MEIBACH & SEIGEL, 1977). A lesão, atingindo estas extensões, provocou a manutenção do PFC com valores superiores ao pico de resposta no 4º e 5º dias (Figura 18) e aumento de corticosterona no 4º dia cerca de quatro vezes maior que os valores obtidos pelo grupo controle, sendo que, no 5º dia, os valores retornaram aos níveis de pico de resposta (Figura 19).

Possivelmente, o comprometimento de estruturas inibidoras do eixo adrenal foi suficiente para total liberação da secreção de corticosterona, a qual teve seus valores aumentados no 4º dia, se diferenciando por este comportamento do perfil normalmente encontrado nos animais controles. O restabelecimento a níveis normais de pico de resposta no dia subsequente poderia ser decorrente de estruturas inibidoras presentes na porção restante da estria terminal (SHIMADA et al, 1989).

A resposta imune ativada nestes animais sugere que a liberação de fatores (GIF) ou linfocinas (IL-1), poderiam levar a uma diminuição da síntese de norepinefrina hipotalâmica (BESEDOVSKY et al, 1985b) ou aumentar a liberação de ACTH na hipófise e, conseqüentemente, o nível dos

glicocorticóides circulantes. Estes por meio de mecanismos de **feedback** a nível de receptores presentes principalmente em neurônios hipocampais, retornariam a níveis não basais mas a nível de pico de resposta em vistas a presença pelo menos de parte do complexo amigdalóide.

O peso da tiróide e o timo se encontram com valores superiores ao controle no 40 dia (Tabela 7) e aumento da adeno-hipófise, tiróide e celularidade no 50 dia (Tabelas 8 e 9), indicando uma atividade glandular mais intensa neste tipo de lesão que, de modo semelhante a lesão de estria e fímbria, o eixo tireoidiano poderia estar envolvido.

Aparentemente a lesão de estria terminal e fímbria hipocampal apresentaram resultados opostos ao analisarmos os dias de pico de PFC; enquanto a lesão de estria mostrou números elevados de células formadoras de placas já no 40 dia, a lesão de fímbria acarretou diminuição acentuada no 50 dia, sendo que os níveis de corticosterona de ambas as lesões permaneceram inalterados. A lesão mista mostrou efeito distinto, com valores de PFC intermediários aos obtidos pelas L.ST e L.F mantidos no 40 e 50 dias após imunização, com o aumento drástico de corticosterona antecipado para o 40 dia.

Ao analisarmos o perfil destes dados acreditamos que as lesões que envolveram os tratos não diretos, vindos da amígdala ou hipocampo, via núcleo intersticial da estria

terminal e septo/fornix respectivamente, estão sob o controle não só dos núcleos neuronais de origem, mas também da ação conjunta de regiões intermediárias que modulam os componentes finais no hipotálamo e consequentemente a resposta imune.

Desta forma, a lesão de estria terminal e a lesão mista com o provável comprometimento de vias desta natureza, tiveram a resposta imune humoral PFC-IgM aumentadas pelo envolvimento de estruturas relacionadas mais diretamente com eventos metabólicos e, portanto, com funções de ordem endócrina, as quais contribuem para a integridade e ajustes dos processos adaptativos com o sistema imune. Entretanto, os componentes comprometidos na lesão mista (complexo amigdalóide e hipocampal) são de especial importância na manutenção do perfil de uma resposta normal, uma vez que nossos resultados demonstraram que se tais estruturas forem comprometidas em conjunto, revelam comportamento peculiar no dia do pico de PFC, acompanhada da elevação de corticosterona, estando aqui apenas com a amplitude aumentada.

De um modo geral, os estudos mostram que neurônios hipotalâmicos são heterogêneos em função e participação na homeostase, visto que diferentes períodos após a administração de um antígeno a atividade neuronal destes animais imunizados comparados com animais intactos, revelam mudanças em diferentes estruturas hipotalâmicas durante a imunogênese sendo caracterizada basicamente por uma área específica de

mudança de atividade e sua intercomunicação com estruturas extra-hipotalâmicas (KORNEVA, 1987). Deste modo a amígdala não seria a fonte primária da função do eixo pituitária-adrenal, mas sim moduladora juntamente com estruturas do complexo hipocampal.

6. CONCLUSÕES

Este trabalho teve como objetivo investigar a importância do complexo amigdalóide na rede de interações imuno-neuroendócrinas, através de lesões eletrolíticas de estruturas no sistema nervoso central e seus efeitos na resposta imune primária.

Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

1. Animais controles frente a antígenos T-dependente, apresentaram resposta imune IgM-PFC relacionadas com as alterações endócrinas já descritas.

2. A amígdala mostrou ter influência na modulação da resposta imune IgM-PFC por mecanismos independentes da corticosterona, demonstrado pelo comprometimento da estria terminal, fazendo-nos acreditar que possivelmente haja o envolvimento de outros mecanismos.

3. O complexo hipocampal, através da lesão da fímbria medial mostrou importante papel na neuroimunomodulação, independentemente dos níveis de corticosterona sérica, possivelmente modulando a resposta imune por mecanismos como sistema autônomo responsável pela supressão de PFC observada.

4. A lesão mista, que atingiu parte distal da fímbria e porção da estria terminal, provocou manutenção dos níveis elevados de PFC com antecipação do pico de corticosterona para o 4º dia. Este tipo de lesão não alterou o perfil de resposta observado normalmente na presença de antígeno, além de que sugere uma facilitação no desenvolvimento do fenômeno.

5. Os valores de tiroxina se mantiveram elevados independentemente da região atingida, fazendo-nos acreditar que outros mecanismos que não somente os glicocorticóides possam estar envolvidos nos efeitos observados.

Os resultados obtidos, analisados em conjunto, e juntamente com os dados existentes da literatura sobre a existência de estruturas do sistema nervoso central interferindo na imunomodulação, nos permitem concluir que os níveis de interações vão além das estruturas hipotalâmicas e que a integridade do complexo amigdalóide juntamente com o hipocampal, são essenciais para que o equilíbrio de interações imuno-neuroendócrinas permita o desenvolvimento de uma resposta imune normal, o que nos poderia ajudar a esclarecer a fisiopatologia de muitas doenças de fundo imunológico.

7. SUMÁRIO

Muitos autores reforçam as ligações entre o sistema nervoso central, endócrino, imune e o estabelecimento das relações entre as funções do cérebro com o desempenho das respostas imunes. Deste modo, investigamos o papel do complexo amigdalóide, via estria terminal, a principal via neural emergente da amígdala para o hipotálamo nesta rede de interações.

Para tal, foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar divididos em grupos: controle, submetido a lesão simulada e grupos lesados por eletrocoagulação na estria terminal, fímbria hipocampal e com lesão mista (parte da estria e fímbria distal).

A resposta imune primária frente ao antígeno SRBC foi determinada pela técnica do PFC; as dosagens de corticosterona e tiroxina séricas por RIA; o diagnóstico das lesões por cortes histológicos. Toda a metodologia foi realizada 4 e 5 dias após as imunizações.

Os animais controles apresentaram pico de resposta IgM-PFC concomitante com o aumento de corticosterona e diminuição de tiroxina.

O grupo simulado, apresentou valores de PFC semelhantes ao controle, nos possibilitando o uso destes animais para o controle cirúrgico.

Os animais com lesões de estria e fímbria apresentaram alterações de PFC (aumento e diminuição respectivamente) não relacionados com corticosterona. A lesão mista mostrou-se a mais relevante quanto as alterações de corticosterona, visto pelo aumento do PFC ser mantido nos dias de pico em concordância com a elevação deste hormônio.

Deste modo, os níveis de interações parecem ir além das estruturas hipotalâmicas e que a integridade do complexo amigdalóide juntamente com o hipocampal são essenciais para que o equilíbrio imune neuroendócrino ocorra.

B. BIBLIOGRAFIA

- ABRAMSKY, O.; WERTMAN, E.; RECHES, A.; BRENNER, T. & OVADIA, H. Effect of hypothalamic lesions on experimental autoimmune diseases in rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 496: 360-5, 1987.
- ALLEN, J. P. & ALLEN, C. F. Role of the amygdaloid complexes in the stress-induced release of ACTH in the rat. *Neuroendocrinology*, 15: 220-30, 1974.
- ALLEN, J. P. & ALLEN, C. F. Amygdalar participation in tonic ACTH secretion in the rat. *Neuroendocrinology*, 19: 115-25, 1975.
- BARONI, C. D.; FABRIS, N. & BERTOLI, G. Effects of hormones on development and function of lymphoid tissues. *Immunology*, 17: 303-13, 1969.
- BELTRAMINO, C. & TALEISNIK, S. Dual action of electrochemical stimulation of the bed nucleus of the stria terminalis on the release of LH. *Neuroendocrinology*, 30: 238-42, 1980.
- BERCZI, I.; NAGY, E.; KOVACS, K. & HORVATH, E. Regulation of humoral immunity in rats by pituitary hormones. *Acta Endocrinol.*, 98: 506-13, 1981.

BESEDOVSKY, H.; SORKIN, E.; KELLER, M. & MÜLLER, J. Changes in blood hormone levels during the immune response. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **150**: 466-70, 1975.

BESEDOVSKY, H & SORKIN, E. Network of immune-neuroendocrine interactions. *Clin. Exp. Immunol.*, **27**: 1-12, 1977.

BESEDOVSKY, H.; SORKIN, E.; FELIX, D. & HASS, H. Hypothalamic changes during the immune response. *Eur. J. Immunol.*, **7**: 323-5, 1977.

BESEDOVSKY, H.; DEL REY, A.; SORKIN, E.; PRADA, M.; BURRI, R. & HONEGGER, C. The immune response evokes changes in brain noradrenergic neurons. *Science*, **221**: 564-5, 1983.

BESEDOVSKY, H.; DEL REY, A. & SORKIN, E. Immune-neuroendocrine interactions. *J. Immunol.*, **135** (2): 750s-4, 1985.

BESEDOVSKY, H.; DEL REY, A.; SORKIN, E.; LOTZ, W. & SCHWULERA, U. Lymphoid cells produce an immunoregulatory glucocorticoid-increasing factor (GIF) acting through the pituitary gland. *Clin. Exp. Immunol.*, **59**: 622-8, 1985b.

BESEDOVSKY, H.; DEL REY, A.; SORKIN, E. & DINARELLO, C. A. Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. *Science*, **233**: 652-4, 1986.

- BLALOCK, J. E. & STANTON J. D. Common pathways of interferon and hormonal action. *Nature*, 283: 406-8, 1980.
- BLALOCK, J. E.; HARBOUR-McMENAMIN, D. & SMITH, E. M. Peptide hormones shared by the neuroendocrine and immunologic systems. *J. Immunol.*, 135: 858s-61s, 1985.
- BLALOCK, J. E. & SMITH, E. M. A complete regulatory loop between the immune and neuroendocrine systems. *Fed. Proc.*, 44 (1): 108-10, 1985.
- CARRILLO, A. J. & DUNN, J. D. The effect of amygdaloid ablation or stimulation on plasma corticosterone levels in the male rat. *Neuroscience*, 2: 997-1006, 1977.
- CATALAN, A. L. Efeito de lesões no complexo hipocampal na resposta imune primária de ratos. Campinas, 1990. 112 páginas. Tese (mestrado). UNICAMP, Instituto de Biologia.
- CROSS, R. J.; MARKESBERY, W. R.; BROOKS, W. H. & ROSZMAN, T. L. Hypothalamic-immune interactions. I- The acute effect of anterior hypothalamic lesions on the immune response. *Brain Res.*, 196: 79-87, 1980.

- DALLMAN, M. F.; AKANA, S. F.; CASCIO, C. S.; DARLINGTON, D. N.; JACOBSON, L. & LEVIN, N. - Regulation of ACTH secretion: variations on theme of B. *Recent Prog. Horm. Res.*, **43**: 113-73, 1987.
- DEL REY, A.; BESEDOVSKY, H.; SORKIN, E.; DA PRADA, M. & ARRENBRECHT, S. Immunoregulation mediated by the sympathetic nervous system, II. *Cell. Immunol.*, **63**: 329-34, 1981.
- DRACOTT, B. N. & SMITH, C. E. T. Hydrocortisone and the antibody response in mice. I- Correlation between serum cortisol levels and cell numbers in thymus, spleen, marrow and lymph nodes. *Immunology*, **36**: 429-35, 1979.
- DRESSER, D. W. Assays for immunoglobulin secreting cells. In Weir, D. M., ed. *Handbook of experimental immunology*, Blackwell Scientific Publication. Oxford, 1978. pp 28.
- DUNN, J. D. & WHITENER, J. Plasma corticosterone responses to electrical stimulation of the amygdaloid complex: cytoarchitectural specificity. *Neuroendocrinology*, **42**: 211-7, 1986.
- DUNN, J. D. Plasma corticosterone responses to electrical stimulation of the bed nucleus of the stria terminalis. *Brain Res.*, **407**: 327-31, 1987.

FAUCI, A. S. Mechanisms of corticosteroid action on lymphocyte subpopulation. I- Redistribution of circulating T and B lymphocytes to the bone marrow. *Immunology*, 28: 669-80, 1975.

FAUCI, A. S.; KEHRL, J. H. & ALVAREZ-MON, M. A potential role for adrenocorticotropin in regulating human B lymphocyte function. *J. Immunol.*, 135 (6): 3823-6, 1985.

FEIN, H. G.; BERTON, E. W.; BEACH, J. E.; HOLADAY, J. W. & SMALLRIDGE, R. C. Release of multiple hormones by a direct action of interleukin-1 on pituitary cells. *Science*, 238: 519-21, 1987.

FELDMAN, S. & CONFORTI, N. Participation of the dorsal hippocampus in the glucocorticoid feedback effect on adrenocortical activity. *Neuroendocrinology*, 30: 52-5, 1980.

FELTEN, D. L.; FELTEN, S. Y.; BELLINGER, D. L.; CARLSON, S. L. ACKERMAN, K. D.; MADDEN, K. S.; OLS CHOWKI, J. A. & LIVNAT, S. Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: struture and function. *Immunol. Rev.*, 100: 420-5, 1987.

FOLCH, H.; ELLER, G.; MENA, M. & ESQUIVEL, P. Neuroendocrine regulation of thymus hormones: hypothalamic dependence of "facteur thymique serique" levels. *Cell. Immunol.*, **102**: 211-6, 1986.

FORNI, G.; BINDONI, M.; SANTONI, A.; GIOVARELLI, M. & MANTOVANI, A. Physiological and pathological influences of central nervous system on the immune system: a critical appraisal. *J. Psychiat. Res.*, **18** (4): 491-9, 1984.

GANONG, W. F.; ALPERT, L. C. & LEE, T. C. ACTH and the regulation of adrenocortical secretion. *N. Engl. J. Med.*, **290** (18): 1006-11, 1974.

GROSSMAN, C. J. Interactions between the gonadal steroids and the immune system. *Science*, **227**: 257-60, 1985.

HALL, N. R.; MCGILLIS, J. P.; SPANGELO, B. L. & GOLDSTEIN, A. L. Evidence that thymosins and other biologic response modifiers can function as neuroactive immunotransmitters. *J. Immunol.*, **135** (2): 806s-11s, 1985.

HAMILTON, L. W. In: -----, *Basic limbic system anatomy of the rat*. Plenum Press, New York and London, 1976.

- HEIJNEN, C. J.; BEVERS, C.; KAVELAARS, A. & BALLIEUX, R. E.
Effects of μ -endorphin on the antigen-induced primary
antibody response of human blood B cells in vitro. *J.*
Immunol., **136** (1): 213-6, 1986.
- ISAACKSON, R. L. In: ----- *The limbic system*. Plenum
Press, New York and London, cap. 3, p. 109-134, 1982.
- JANKOVIC, B. D. & ISAKOVIC, K. Neuroendocrine correlates of
immune response. I- Effects of brain lesions on antibody
production, arthus reactivity and delayed hypersensitivity
in the rat. *Int. Arch. Allergy*, **45**: 360-72, 1973.
- JAVANOVA-NESIC, K.; KOJIC, L.; VUJIC, D. & JANKOVIC, B. D.
Amygdaloid complex and immune response. *Periodicum*
Biologorum, **88** (1): 97-9, 1986.
- JERNE, N. K.; NORDIN, A. A.; FUGI, H.; KORDS, A. M. C. &
LEFKOVITS, I. Plaque forming cells: methodology and theory.
Transpl. Rev., **19**: 130, 1974.
- KATAYAMA, M.; KOBAYASHI, S.; KURAMOTO, N. & YOKOYAMA, M. M.
Effects of hypothalamic lesions on lymphocytes subsets in
mice. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **496**: 366-76, 1987.

- KORNEVA, E. A. Electrophysiological analysis of brain reactions to antigen. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 496: 318-37, 1987.
- KRUGER, T. E. & BLALOCK, J. E. Cellular requirements for thyrotropin enhancement of in vitro antibody production. *J. Immunol.*, 137 (1): 197-200, 1986.
- LUPARELLO, T. J.; STEIN, M. & PARK, D. C. Effect of hypothalamic lesions on rat anaphylaxis. *Am. J. Physiol.*, 207 (4): 911-4, 1964.
- MANSON, J. W. Plasma-17-OH-corticosteroid levels during electrical stimulation of the amygdaloid complex in conscious monkeys. *Am. J. Physiol.*, 196 (1): 44-8, 1959.
- MANDLER, R. N.; BIDDISON, W. E.; MANDLER, R. & SERRATE, S. A.B-endorphin augments the cytolytic activity and interferon production of natural killer cells. *J. Immunol.*, 136 (3): 934-9, 1986.
- McEWEN, B. S.; KLOET, E. R. & WILLIAM, R. Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system. *Physiol. Rev.*, 66 (4): 1121-75, 1986.

- MEIBACH, R. C. & SIEGEL, A. Efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *Brain Res.*, **124**: 197-224, 1977.
- O'DORISIO, M. S.; WOOD, C. L. & O'DORISIO, T. M. Vasoactive intestinal peptide and neuropeptide modulation of the immune response. *J. Immunol.*, **135** (2): 792s-6s, 1985.
- PAYAN, D. G. & GOETZL, E. J. Modulation of lymphocyte function by sensory neuropeptides. *J. Immunol.*, **135** (2): 783s-5s, 1985.
- PELLEGRINO, L. J. & CUSHMAN, A. J. *Atlas of rat brain.* Meredith Publishing Company, N. Y., 1967.
- PIERPAOLI, W.; BARONI, C.; FABRIS, N. & SORKIN, E. Hormones and immunological capacity. II- Reconstitution of antibody production in hormonally deficient mice by somatotrophic hormone, thyrotrophic hormone and thyroxin. *Immunology*, **16**: 217-29, 1969.
- PLAUT, M. Lymphocyte hormone receptors. *Ann. Rev. Immunol.*, **5**: 621-9, 1987.
- RAISMAN, G. An evaluation of the basic pattern of connection between the limbic system and the hypothalamus. *Am. J. Anat.*, **129**: 197-246, 1970.

RENAUD, L. P. An electrophysiological study of amygdalohypothalamic projection to the ventromedial nucleus of the rat. *Brain Res.*, **105**: 45-58, 1976.

RIVIER, C. L. & PLOTSKY, P. M. Mediation by corticotropin releasing factor (CRF) of adenohipophysial hormone secretion. *Ann. Rev. Physiol.*, **48**: 475-94, 1986.

ROCHA, B. The effects of stress in normal and adrenalectomized mice. *Eur. J. Immunol.*, **15**: 1131-5, 1985.

ROSZMAN, T. L.; JACKSON, J. C.; CROSS, R. J.; TITUS, M. J.; MARKESBERY, W. R. & BROOKS, W. H. Neuroanatomic and neurotransmitter influences on immune function. *J. Immunol.*, **135** (2): 769s-72s, 1985.

SAPHIER, D.; ABRAMSKY, O.; MDR, G. & OVADIA, H. A neurophysiological correlate of an immune response. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **496**: 354-60, 1987.

SAPOLSKY, R.; RIVIER, C.; YAMAMOTO, G.; PLOTSKY, P. & VALE, W. IL-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. *Science*, **238**: 522-4, 1987.

- SHIMADA, S.; INAGAKI, S.; KUBOTA, Y.; OGAWA, N.; SHIBASAKI, T. & TAKAGI, H. Coexistence of peptides (corticotropin releasing factor / neurotensin and substance P / somatostatin) in the bed nucleus of the stria terminalis and central amygdaloid nucleus of the rat. *Neuroscience*, 30 (2): 377-83, 1989.
- SHIZUME, K.; MATSUZAKI, F.; IINO, S.; MATSUDA, K.; SHIGENOBU, S. & OKINAKA, S. Effect of electrical stimulation of the limbic system on pituitary-thyroidal function. *Endocrinology*, 71: 456-63, 1962.
- SNYDER, D. S. & UNANUE, E. R. Corticosteroids inhibit murine macrophage Ia expression and interleukin-1 production. *J. Immunol.*, 129 (5): 1803-5, 1982.
- SORKIN, E.; PIERPAOLI, W.; FABRIS, N. & BIANCHI, E. Relation of growth hormone to thymus and the immune response. *Proc. II Int. Symp. of Growth Hormone*, 1972.
- TYREY, L. & NALBANDOV, A. V. Influence of anterior hypothalamic lesions on circulating antibody titers in the rat. *Am. J. Physiol.*, 222 (1): 179-85, 1972.
- VALE, W. & RIVIER, C. Substances modulating the secretion of ACTH by cultured anterior pituitary cells. *Fed. Proc.*, 36 (8): 2094-9, 1977.

- WAHL, S. M.; ALTMAN, L. C. & ROSENSTREICH, D. L. Inhibition of in vitro lymphokine synthesis by glucocorticosteroids. *J. Immunol.*, **115** (2): 476-81, 1975.
- WEIGENT, D. A. & BLALOCK, J. E. Interactions between the neuroendocrine and immune systems: common hormones and receptors. *Immunol. Rev.*, **100**: 79-108, 1987.
- WYSS, J. M.; SWANSON, L. W. & COWAN, W. N. The organization of the fimbria, dorsal fornix and ventral hippocampal commissure in the rat. *Anat. Embryol.*, **158**: 303-16, 1980.
- YAMADA, T. & GREER, M. A. The effect of bilateral ablation of the amygdala on endocrine function in the rat. *Endocrinology*, **66**: 565-74, 1960.