



ANA LÚCIA ERBOLATO CATALAN

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pela candidata Ana Lúcia Erbolato Catalan e aprovada pela comissão julgadora.

*Gilberto A. Fernandes
5/06/90*

"EFEITO DE LESÕES NO COMPLEXO HIPOCAMPAL

NA RESPOSTA IMUNE PRIMÁRIA DE RATOS."

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas na área de Imunologia.

CAMPINAS
-1990-

C28e

12516/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Trabalho desenvolvido no
Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental,
Departamento de Patologia Clínica,
Disciplina de Fisiologia Clínica,
Hospital das Clínicas, UNICAMP.

ao meu marido, minha filha
e à meus pais, avós e irmãos.

ORIENTADOR

PROF.DR. GILBERTO D'ASSUNÇÃO FERNANDES

"Deus! Dai-nos a força de ajudar o progresso,
a fim de subirmos até Vós; dai-nos a caridade
pura; dai-nos a fé e a razão; dai-nos a
simplicidade que fará de nossas almas
o espelho onde se deve refletir a Vossa
Imagem."

AGRADECIMENTOS:

* Ao Prof.Dr. Gilberto D'Assunção Fernandes, pela orientação e confiança demonstradas durante todo este importante período de minha vida.

* Ao Prof.Dr. Marcos Garcia Costa, pelo apoio e atenção dispensados.

* À todos os técnicos que, com sua colaboração e amizade, tornaram possível este trabalho: Roberto César Stahl, Tereza Carvalho Baptiston, William Adalberto Silva, Laurione Candido de Oliveira, David Antonio Lima e Elizabeth Lima. Em especial ao Jamilson Conceição Alves (Departamento de Anatomia Patológica, Hospital das Clínicas) pelos úteis ensinamentos em métodos histológicos.

* Às colegas e amigas do Departamento de Microbiologia e Imunologia, pela convivência durante os anos de pós-graduação, em especial à Heloísa Helena e Maria Cristina, que estiveram sempre presentes colaborando diretamente nos experimentos.

* Aos meus amigos, que embora não participando diretamente do trabalho, me apoiaram nos momentos mais difíceis desta árdua caminhada.

* À FAPESP e UNICAMP, pelos auxílios financeiros concedidos.

INDICE

I. INTRODUÇÃO.....	1
1. Ação dos hormônios neuroendócrinos sobre o sistema imune.....	3
2. Células imunocompetentes liberam mensageiros que afetam mecanismos neuroendócrinos.....	6
3. Mecanismos de neuro-imunoregulação.....	6
3.1. Circuito imunoregulatório integrado à nível do eixo hipotálamo-hipófise- adrenal.....	7
3.2. Imunoregulação simpática.....	8
3.3. Imunoregulação integrada à nível hipotalâmico.....	9
3.3.1. Importância do sistema límbico na rede de interação imuno-neuroendócrina.....	10
II. OBJETIVOS.....	13
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
1. Planejamento experimental.....	16
2. Soluções.....	19
3. Animais e seu tratamento.....	20
4. Procedimentos cirúrgicos.....	21
4.1. Adrenalectomia.....	21
4.2. Lesão estereotáxica.....	21
5. Imunização.....	22
6. Colheita de sangue.....	22
7. Pesos de glândulas.....	23

8. Número total de células nucleadas por baço.....	23
9. Viabilidade celular.....	23
10. Resposta imune primária.....	24
11. Determinação da concentração de hormônios.....	25
12. Controle da extensão da lesão.....	26
13. Tratamento estatístico.....	26
IV. RESULTADOS.....	29
EXPERIMENTO I - Estudo do grupo de ratos normais....	30
EXPERIMENTO II - Efeito da adrenalectomia sobre a resposta imune primária de ratos.....	39
EXPERIMENTO III - Efeito da "sham"-cirurgia no complexo hipocampal sobre a resposta imune primária de ratos...	49
EXPERIMENTO IV - Efeito das lesões no complexo hipocampal sobre a resposta imune primária de ratos.....	57
EXPERIMENTO V - Efeito da adrenalectomia na resposta imune primária de ratos com lesões no complexo hipocampal.....	65
V. DISCUSSÃO.....	73
VI. SUMÁRIO E CONCLUSÕES.....	86
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	90

ABREVIATÖES

ACTH	= Hormônio estimulante do cortex adrenal ou corticotrofina
ADX	= Adrenalectomia
CRH	= Hormônio liberador de corticotrofina
GIF	= Fator de aumento de glicocorticóides
GH	= Hormônio de crescimento
L.F.	= Lesão de fímbria hipocampal
L.HPC	= Lesão de parte do hipocampo
L.M.	= Lesão mista
MME	= Meio mínimo essencial
PBS	= Salina tamponada com fosfato
PFC	= Células formadoras de placas
PRL	= Prolactina
SBF	= Soro bovino fetal
TSH	= Hormônio estimulante da tiróide
VIP	= Peptídeo intestinal vasoativo

I. INTRODUÇÃO

Os organismos pluricelulares dependem, para sua sobrevivência, de um "meio interno" de composição constante. Esta dependência aumenta à medida em que os seres vivos evoluem na escala zoológica, até chegarmos ao homem, onde o equilíbrio dos mecanismos homeostáticos é vital para a sua sobrevivência. Na sua interação com o meio ambiente, o organismo sofre agressões que tendem a desequilibrar estes mecanismos. Neste particular o sistema imune tem um papel dos mais importantes, pois pode defender o organismo contra os mais diferentes tipos de substâncias estranhas, tanto externas como internas, contribuindo de um modo decisivo para a manutenção da constância e integridade das células e dos tecidos do organismo. Assim, considera-se improvável que o sistema imune possa funcionar de uma maneira autônoma, bem como todos os mecanismos homeostáticos, e, portanto, conclui-se que ele também esteja integrado a um controle central composto, entre outros, pelo sistema neuroendócrino (BESEDOVSKY, DEL REY & SORKIN, 1985).

O alto grau de versatilidade do sistema imune e do sistema nervoso central sugere uma complexa rede, que envolve diferentes tipos e estruturas celulares, capazes de emitir e receber sinais bidirecionais (BESEDOVSKY et al, 1985). A existência de uma rede de imunoregulação neuroendócrina, a qual tem sido demonstrada principalmente nos trabalhos de BESEDOVSKY et al (1977), sugere que o sistema imune funcione como um órgão sensor que, ao detectar antígenos externos ou próprios-alterados, informa ao sistema

nervoso central sobre os diferentes tipos de estímulos recebidos. Seguindo este processo, o cérebro, ou mecanismos dele dependentes, pode ou não responder, emitindo sinais regulatórios. Portanto, a regulação do sistema imune pode ser o resultado final da integração de sinais neuroendócrinos externos e de mecanismos imunológicos autoregulatórios (rede idiotípica, células auxiliaadoras/supressoras, linfocinas e monocinas regulatórias, etc) (BESEDOVSKY et al, 1985).

A base molecular para a comunicação entre estes dois sistemas se inicia pelo fato de hormônios e neurotransmissores estarem presentes no micro-ambiente, envolvendo as células imunocompetentes, que, por sua vez, expressam receptores para estes agentes (WEIGENT & BLALOCK, 1987). A partir disso, inúmeras evidências têm sido propostas, demonstrando esta correlação entre os sistemas imune e neuroendócrino.

1. AÇÃO DE HORMÔNIOS NEUROENDÓCRINOS SOB O SISTEMA IMUNE.

Muitos dados experimentais mostram que, como todas as células do organismo, as células do sistema imune dependem não só das propriedades anatômicas, fisiológicas e bioquímicas dos tecidos linfóides, mas também de uma variedade de componentes celulares ou moleculares presentes no micro-ambiente que rodeia as células do sistema imune (JANKOVIC & ISAKOVIC, 1973).

Dentre os elementos moleculares que rodeiam as células linfóides, os hormônios e os neuropeptídeos, componentes deste micro-ambiente, são apontados como um dos principais fatores a influenciar a proliferação, diferenciação, crescimento, maturação e desempenho do tecido linfóide (PIERPAOLI, FABRIS & SORKIN, 1970).

Neuropeptídeos, presentes no sistema nervoso central e periférico, modulam algumas funções das células sistema imune, como a substância P e a somatostatina sobre os linfócitos, macrófagos e polimorfonucleares (PAYAN & GOETZL, 1985) e o peptídeo intestinal vasoativo (VIP), que pode inibir a resposta à estimulação mitogênica e regular a migração de linfócitos (O'DORISIO, WOOD & O'DORISIO, 1985).

Dentre os hormônios adeno-hipofisários, se destacam: a) o hormônio de crescimento (GH), por apresentar atividade timotrópica (PIERPAOLI et al, 1970), por ter importância no crescimento e função do timo durante a ontogenia do sistema imune de mamíferos (SORKIN et al, 1972) e no desenvolvimento de resposta imune dependente de células T (KIESS et al, 1983 e SNOW, 1985) e b) a prolactina (PRL), por restaurar a resposta imune em ratos hipofisectomizados (BERCZI et al, 1981). Já entre os hormônios neuro-hipofisários, se encontram a vasopressina e a ocitocina, que são capazes de substituir a função da Interleucina-2 na estimulação da produção de interferon (JOHNSON & TORRES, 1985).

Periféricamente, dentre os hormônios que influenciam a atividade e o desempenho do sistema imune, estão: a tiroxina, por acelerar a regeneração do tecido linfóide (WHITE, 1970) e, juntamente com o GH, restaurar a produção de anticorpos em camundongos com hipotireoidismo hereditário (PIERPAOLI et al, 1969) e os esteróides sexuais (PAAVONEM, ANDERSON & ADLERCREUTZ, 1981 e GROSSMAN, 1985).

Mas, de todos eles, os corticosteróides são os que apresentam a maior influência. Estes causam linfopenia por lise ou redistribuição do pool periférico (CLAMAN, 1975 e FAUCI, 1975), além de modular as diferentes funções das células imunocompetentes. Eles inibem a produção de Interleucina-2 (HORST & FLAD, 1987), Interleucina-1 e a expressão de moléculas Ia na superfície de macrófagos, modulando a resposta imune nos seus primeiros estágios de indução, ou seja, na apresentação antigênica (SNYDER & UNANUE, 1982). Nos linfócitos T, eles exercem vários efeitos inibitórios, como na sua proliferação, na produção do fator de crescimento de células T (TCGF) (GILLIS, CRABTREE & SMITH, 1979) e linfocinas (WAHL, ALTMAN & ROSENSTREICH, 1975). Já nos linfócitos B, os corticosteróides demonstram modular diferentes fases da ativação, proliferação e diferenciação destas células (CUPPS et al, 1985). Um tipo de experimento que evidencia a importância dos corticosteróides no sistema imune é a adrenalectomia, que em ratos e camundongos, aumenta a proliferação do tecido linfóide (GUNN et al, 1970).

2. CÉLULAS IMUNOCOMPETENTES LIBERAM MENSAGEIROS QUE AFETAM MECANISMOS NEUROENDÓCRINOS.

Seguindo o conceito de comunicação bidirecional entre os sistemas neuroendócrino e imune, parece claro que o sistema imune também pode originar informações que chegam ao sistema nervoso central.

Entre os mensageiros liberados pelo sistema imune, tem sido demonstrado um fator que causa aumento de secreção de glicocorticóides (GIF), produzido por células linfóides estimuladas, agindo a nível do eixo hipotálamo-hipófise (BESEDOVSKY et al, 1985).

Além deste, a Interleucina-1 (BESEDOVSKY et al, 1986 e SAPOLSKY et al, 1987) e certas timosinas (HALL et al, 1985) também são capazes de interagir principalmente com o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal.

Várias evidências demonstram que células linfóides podem também produzir hormônios biologicamente ativos, como ACTH, endorfinas e hormônio estimulante da tiróide (BLALOCK, McMENAMIN & SMITH, 1985 e SMITH, McMENAMIN & BLALOCK, 1985 e WEIGENT & BLALOCK, 1987).

3. MECANISMOS DE NEURO-IMUNOREGULAÇÃO.

Os mecanismos de neuro-imunoregulação podem ser baseados na identificação de canais de informação entre células imunocompetentes e sistema neuroendócrino.

A base funcional do equilíbrio de interações imuno-neuroendócrinas tem como principal objetivo o aumento

da imunoespecificidade de uma resposta pela supressão de eventos celulares de pouca ou nenhuma especificidade, além de influenciar nos mecanismos de tolerância e na função dos monócitos/macrófagos (BESEDOVSKY & SORKIN, 1977).

Como a resposta imune é um fenômeno temporal, sua regulação extrínseca, necessariamente deve ser refletida em mudanças endócrinas e nervosas temporais. Experimentalmente, em ratos e camundongos, um estímulo antigênico provoca -além do aumento de IgM-PFC anti-hemácias de carneiro- uma série de outras alterações, como por exemplo: uma resposta hormonal, caracterizada pelo aumento dos níveis de corticosterona e diminuição de tiroxina circulantes (BESEDOVSKY et al, 1975); um aumento da atividade elétrica de neurônios do hipotálamo (BESEDOVSKY et al, 1977) e a diminuição da síntese de noradrenalina nessa mesma estrutura (BESEDOVSKY et al, 1983).

3.1. CIRCUITO IMUNOREGULATÓRIO INTEGRADO A NÍVEL DO EIXO HIPOTÁLAMO-HIPÓFISE-ADRENAL.

Como já foi discutido anteriormente, é bem conhecido o efeito dos hormônios glicocorticóides sobre os múltiplos eventos da imunidade.

Numa resposta imune, após estimulação antigênica, o aumento nos níveis de glicocorticóides é observado concomitantemente ao aumento da resposta imune (BESEDOVSKY et al, 1975). Os níveis alcançados são imunossupressores e também são capazes de suprimir resposta

a antígenos não-relacionados (BESEDOVSKY, DEL REY & SORKIN, 1985).

Este nível de comunicação parece ter sido alcançado através da ação do GIF, produzido durante a resposta imune pelas células imunocompetentes, agindo na adeno-hipófise e estimulando o aumento da produção de ACTH e, conseqüentemente, aumentando a síntese e liberação de hormônios adrenocorticais (BESEDOVSKY et al, 1985).

Outro modo de ocorrer este aumento de glicocorticóides se baseia no fato de que células imunocompetentes, estimuladas com certos tipos de antígenos, produzem um peptídeo que possui peso molecular, antigenicidade e com mesma atividade biológica, agindo sobre o eixo hipófise-adrenal da mesma maneira que o ACTH derivado da adeno-hipófise (WEIGENT & BLALOCK, 1987).

3.2. IMUNOREGULAÇÃO SIMPÁTICA.

Inúmeros estudos histoquímicos têm demonstrado a presença de fibras nervosas autônomas no parênquima do timo, baço, linfonodos, medula óssea e outros tecidos linfóides, sendo que suas terminações estão presentes não só ao redor dos vasos sanguíneos, mas também entre os linfócitos (FELTEN et al, 1985 e 1987).

A liberação de noradrenalina no tecido linfóide pode: 1) agir diretamente nos receptores de superfície de linfócitos e macrófagos; 2) influenciar a produção ou liberação de moléculas bioativas pelas células

acessórias; 3) modular moléculas como linfocinas, hormônios e outros neurotransmissores e 4) afetar outros eventos como fluxo sanguíneo, permeabilidade vascular e tráfego de linfócitos (FELTEN et al, 1985).

BESEDOVSKY et al (1979) demonstraram que a destruição desta inervação simpática resulta num aumento significativo da resposta imune. Estes dados, juntamente com a constatação da diminuição do conteúdo de noradrenalina nos órgãos linfóides durante a manutenção da resposta imune estimulada antigenicamente (DEL REY et al, 1981), demonstram a influência imunossupressora da inervação simpática em órgãos linfóides, suportando o conceito de que o sistema simpático tem importante participação na imunoregulação.

3.3. IMUNOREGULAÇÃO INTEGRADA A NÍVEL HIPOTALÂMICO.

No estudo das interações imune-neuroendócrinas, a grande maioria dos trabalhos publicados descrevem o hipotálamo como a estrutura do sistema nervoso central mais importante nos mecanismos dessas interações. Experimentalmente, lesões no hipotálamo anterior causam alterações no sistema imune, via eixo hipófise-adrenal; dentre elas estão a inibição da produção de anticorpos anti-ovalbumina (TYREY & NALBANDOV, 1972), mudanças na celularidade do tecido linfóide (CROSS et al, 1980) e diminuição da atividade NK em células esplênicas (CROSS et al, 1984).

Entretanto, o hipotálamo, por sua vez, é modulado por outras estruturas e poucos trabalhos têm demonstrado a importância de estruturas extra-hipotalâmicas na resposta imune. Lesões eletrolíticas na formação reticular, tálamo, colículos superiores, núcleo caudato e complexo amigdalóide, causaram significativa involução do timo (ISAKOVIC & JANKOVIC, 1973). Lesões na formação reticular, causaram também diminuição na produção de anticorpos e nas funções de células T (JANKOVIC & ISAKOVIC, 1973).

3.3.1. IMPORTÂNCIA DO SISTEMA LÍMBICO NA REDE DE INTERAÇÃO IMUNO-NEUROENDÓCRINA.

O sistema límbico age como um funil de informações do sistema olfatório e de outras regiões corticais -portanto, outros sistemas sensitivos- e regula vários eixos glandulares ao modular o hipotálamo (RAISMAN & FIELD, 1971). Por outro lado, é bem conhecido o papel destas estruturas na integração de estímulos comportamentais que têm expressão somática (neurovegetativa) ou endócrina (ISAACSON & PRIBRAM, 1975).

De todas as estruturas límbicas, o hipocampo é o que mais se relaciona com a modulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Numerosos estudos histológicos do sistema límbico demonstram que grandes quantidades de receptores para corticosterona estão presentes nos neurônios do hipocampo e septo (KNIZLEY, 1972 e McEWEN, KLOST &

ROSTENE, 1986). Assim, uma alteração induzida por um estímulo na atividade destes neurônios, via receptores específicos, leva a informação ao núcleo paraventricular do hipotálamo, principal fonte de neurônios que sintetiza e secreta hormônio liberador de corticotrofina (CRH) na circulação porta-hipofisária (FILARETOV & FILARETOVA, 1985). O CRH leva as células da adeno-hipófise a sintetizarem e liberarem ACTH na circulação sistêmica; este, chegando ao córtex adrenal, por sua vez, estimula a síntese e secreção de corticosterona (principal hormônio adrenocortical em ratos) que, portanto, pode conduzir aos vários níveis de feedback (DALLMAN et al, 1987).

Experimentos com ablação ou lesão no hipocampo, causaram aumento de ACTH, sugerindo que esta estrutura é um componente inibitório dos mecanismos neurais reguladores do eixo hipófise-adrenal (KNIGGE & HAYS, 1963 e WILSON et al, 1980). Por outro lado, existem trabalhos demonstrando que este tipo de experimento não interfere com o ritmo diário de secreção de corticosterona (WILSON & CRITCHLOW, 1973/74).

Algumas observações anatômicas fundamentam a interpretação dos efeitos de lesões intra e extra-hipotalâmicas sobre os mecanismos de controle endócrino. Assim, estudos anatômicos das conexões intrínsecas e do modelo de projeção do complexo hipocampal têm revelado que este compreende os seguintes componentes: giro denteado, os campos do hipocampo propriamente dito (CA1 a CA4), o

prosubículo e finalmente o subículo, que são conectados por uma série unidirecional de fibras intrínsecas (LOPES DA SILVA & ARNOLDS, 1978). O modelo de projeção hipocampal demonstra que sua principal via emergente para o hipotálamo é através do trato córtico-hipotalâmico medial (RAISMAN, 1970 e MEIBACH & SIEGEL, 1977). Este se origina no prosubículo, passa pela porção lateral da fímbria hipocampal, e, após se destacar do componente pós-comissural do fórnix, se encaminha para o pólo anterior dos núcleos hipotalâmicos (MEIBACH & SIEGEL, 1977). Esta projeção é de especial interesse para a regulação do eixo hipófise-adrenal, pois os neurônios provenientes destes núcleos estão diretamente implicados na inibição das células produtoras de CRH (MEIBACH & SIEGEL, 1977).

Por todas estas evidências, o complexo hipocampal seria uma das estruturas-chave para melhor entendimento dos mecanismos que presidem a regulação da interação imuno-neuroendócrina pelo hipotálamo e, portanto, a fisiopatologia de várias doenças, que têm como mediador o sistema imune.

II. OBJETIVOS.

Normalmente, o sistema endócrino é regulado não só pela atividade do hipotálamo mas também pela interação deste com estruturas extra-hipotalâmicas como o complexo hipocampal, de fundamental importância na regulação de vários eixos neuro-endócrinos, e, em particular, do eixo adrenal, que apresenta estreita correlação com o sistema imune.

Assim, tivemos como objetivo determinar o grau de importância do hipocampo na rede de interações imuno-neuroendócrinas.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

1. PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL.

A abordagem experimental do problema que nos propusemos a estudar pode ser esquematizada em 5 séries, logicamente ligadas entre si, e nas quais foram utilizados 240 ratos. Essas experiências são resumidas esquematicamente abaixo.

EXPERIMENTO I - Estudo do grupo de ratos normais.

Com o objetivo de conhecer as características da linhagem de ratos a ser utilizada durante todos os experimentos, foi realizada a cinética da resposta imune primária, estudando-se também os pesos das diferentes glândulas e as dosagens de tiroxina e corticosterona. Assim, 40 ratos foram inoculados com solução salina fisiológica e outros 40 foram imunizados com hemácias de carneiro. Depois de 3, 4, 5 e 6 dias foram sacrificados por decapitação, obtendo-se sangue para dosagens de hormônios, glândulas para pesagens e o baço para realizar as contagens do número total de células nucleadas e de células formadoras de anticorpos.

EXPERIMENTO II - Efeito da adrenalectomia na resposta imune primária de ratos.

Para determinar o melhor dia do efeito da adrenalectomia sobre a resposta imune primária, foram estudados os mesmos parâmetros do grupo anterior em 72 ratos adrenalectomizados bilateralmente. Vinte, trinta ou quarenta dias depois foram inoculados com solução salina fisiológica ou hemácias de carneiro e, após 5 dias, foram sacrificados.

EXPERIMENTO III - Efeito da "sham"-cirurgia no Complexo Hipocampal na resposta imune primária de ratos.

Antes do início dos estudos em ratos com lesões no complexo hipocampal, foi necessário avaliar o efeito das manipulações cirúrgicas sobre os vários parâmetros fisiológicos que estão sendo estudados. Com este objetivo, 28 ratos foram submetidos à "sham"-cirurgia. Após 25 dias de pós-operatório, foram inoculados com hemácias de carneiro ou solução salina fisiológica, e sacrificados no quinto dia.

EXPERIMENTO IV - Efeito das lesões no complexo hipocampal na resposta imune primária de ratos.

Através dos conhecimentos existentes entre os efeitos das alterações hormonais na resposta imune, pretendemos demonstrar o efeito de lesões em diferentes regiões do complexo hipocampal, já que estas lesões, alterando a regulação hipotalâmica dos eixos hormonais, podem influenciar a resposta imunológica. Após lesionar 44 ratos bilateramente pelo método da estereotaxia, esperou-se 25-30 dias para consolidação da eletrocoagulação e recuperação dos animais que, só então, foram imunizados com hemácias de carneiro. Após 5 dias, procedeu-se as contagens do número total de células nucleadas por baço e do número de células formadoras de anticorpos. Além disso, para correlacionar os efeitos destas lesões na resposta imune com os eixos hormonais possivelmente afetados, foram dosados níveis circulantes de tiroxina e corticosterona e pesadas as diferentes glândulas.

EXPERIMENTO V - Efeito da adrenalectomia na resposta imune primária de ratos com lesões do complexo hipocampal.

Após demonstração do efeito da adrenalectomia na resposta imune no experimento II e do efeito das lesões no complexo hipocampal no experimento IV, pensou-se que a associação dos dois procedimentos poderia evidenciar o papel do eixo adrenal nos efeitos alcançados com as lesões do complexo hipocampal. Assim, 5 dias depois de se executar a lesão estereotáxica em 16 ratos, procedeu-se a adrenalectomia, seguindo os mesmos padrões dos experimentos II e IV. Após 40 dias de pós-operatório foram administradas hemácias de carneiro e, após 5 dias, foi realizado o sacrifício dos animais, para que se conhecesse os parâmetros em estudo.

2. SOLUÇÕES.

Meio Mínimo Essencial (MME) 5x concentrado, Soro Bovino Fetal (SBF, Laborclin Ltda), Ácido acético 1% (Carlo Erba), Azul Trypan 0,25 mg% (Merck), Agarose 1% e 0,8% (Bio-Rad Laboratories), Tampão Barbital 5x concentrado (pH = 7,3-7,4), Salina Tamponada com fosfato (PBS), Paraformaldeído 4% (Riedel-Dehaën Ag) e Azul Toluidina 0,025 mg% (Merck).

3. ANIMAIS E SEU TRATAMENTO.

Ao longo de todas as fases experimentais, foram empregados 240 ratos machos adultos-jovens da linhagem Wistar, oriundos do Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), pesando, em média, 200 g. Todos os ratos foram mantidos em gaiolas individuais, providas de ração alimentar sólida (Produtor, Gessy Lever) e água de torneira "ad libitum". O biotério foi mantido sob ciclo de luz (claro/escuro = 12:12 h) e temperatura (25°C) controladas.

Os animais, ao longo de todo período experimental, eram manipulados periodicamente, afim de se acostumarem ao manuseio e, assim, minimizar o efeito do estresse.

Imediatamente após os procedimentos cirúrgicos, os animais receberam, como profilaxia anti-infecciosa, Terramicina (Pfizer) na água do bebedouro por 10 dias. Os animais adrenalectomizados receberam também suplementação com solução salina 1% durante todo pós-operatório.

No dia do sacrifício, os animais eram retirados do biotério, um de cada vez, e guilhotinados na sala do experimento no tempo máximo de 1 minuto.

4. PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS.

4.1. ADRENALECTOMIA.

Os ratos foram anestesiados em câmara anestésica com éter etílico (Rhodia) e, após tricotomia e assepsia local, foi aberto uma incisão dorsal e o acesso a cavidade retroperitoneal foi conseguida pela abertura de dois orifícios na massa muscular através de uma pinça de ponta fina. A gordura peri-adrenal foi localizada, tracionada e o feixe vâsculo-nervoso seccionado removendo-se a adrenal. Suturou-se as aberturas e procedeu-se a assepsia apropriada.

4.2. LESÃO ESTEREOTÁXICA.

Após anestesia com éter, foram executadas a tricotomia e assepsia da região cerebral. Assim, o animal foi devidamente fixado no aparelho estereotáxico, exposta a sua calota craniana e o bregma tomado como ponto de referência. A partir dele foram demarcados dois pontos, seguindo a orientação do atlas estereotáxico de DE GROOT (1959), ou seja, 1 mm posterior ao bregma e 3 mm bilateralmente. Nestes dois pontos foram abertos orifícios com auxílio de broca de dentista apropriada e um eletrodo foi introduzido 5 mm abaixo da calota craniana. No grupo lesado, foi passada uma corrente de 2 mA por 10 segundos, enquanto que no grupo "sham" não houve nenhuma passagem de corrente elétrica. Após a retirada do eletrodo, a incisão foi fechada e submetida a assepsia.

Os animais submetidos a esta cirurgia não apresentaram nenhuma complicação cirúrgica, mantiveram-se aparentemente saudáveis, sem mudanças no comportamento de aquisição de água e alimento, e sem manifestações neurológicas aparentes, durante todo o período do experimento.

5. IMUNIZAÇÃO.

Foram utilizadas como antígeno, hemácias de carneiro por provocarem uma resposta imune T-dependente e por serem mais adequadas aos nossos objetivos experimentais.

Hemácias de carneiro, após serem lavadas 3 vezes sucessivamente em solução salina fisiológica, foram administradas por via intraperitoneal na dose de 5×10^9 por rato.

6. COLHEITA DE SANGUE.

Todos os grupos de animais foram sacrificados por decapitação, entre 9:00 e 11:00 horas da manhã, seguindo a sequência experimental de cada grupo. O sangue de cada animal, colhido em tubo cônico de centrífuga, foi deixado a temperatura ambiente para ocorrer a coagulação; este foi centrifugado a 2.000 rpm por 10 minutos e o soro assim obtido foi mantido em freezer -20°C até o momento das dosagens hormonais.

7. PESOS DAS GLÂNDULAS.

Após a colheita de sangue, foram removidas as glândulas adeno-hipófise, tiróide, adrenais, timo e testículos, que foram limpas de tecido adventício e mantidas em papel umedecido com solução salina fisiológica até o momento da pesagem em balança de torsão, de precisão igual a 0,01 mg (Bethlehem). Os pesos foram referidos em mg/100 gr de peso corporal do rato.

8. NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS NUCLEADAS POR BAÇO.

Removido o baço, este foi homogeneizado manualmente em meio nutritivo apropriado (MME suplementado com 1% de SBF). Após centrifugação e lavagem, o número de células nucleadas foi determinado através da diluição desta suspensão em ácido acético 1% e contagem em câmara de Neubauer. Os resultados foram expressos como número total de células nucleadas por baço ($\times 10^6$).

9. VIABILIDADE CELULAR.

Após a contagem do número total de células nucleadas por baço, foi determinada a viabilidade celular pelo método de exclusão por Azul Trypan.

10. RESPOSTA IMUNE PRIMÁRIA.

A resposta imune primária foi determinada pela técnica de Células Formadoras de Placas (PFC), segundo JERNE & NORDIN (1963) modificada. Resumidamente, a suspensão de células do baço foi diluída em MME contendo 1% SBF para 1/40 e 1/80. A 50 ul de cada diluição, eram adicionados 50ul de suspensão de hemácias de carneiro 5% . Essa mistura era mantida em banho-maria 42°C, onde recebeu 200 ul de agarose 0,8%. Após leve homogenização, a solução foi estendida sobre lâminas de microscopia previamente seladas com agarose 1% e aquecidas a 42°C. Após solidificação em temperatura ambiente, foram colocadas em suportes apropriados e incubadas em estufa úmida 37°C por 2 horas. As lâminas, então, foram imersas em complemento de cobaia, previamente adsorvido com hemácias de carneiro e diluído em tampão barbital, numa proporção de 1:10. Após 1 hora de incubação, nas mesmas condições anteriores, as lâminas foram fixadas em paraformaldeído 4% durante 30 minutos. Depois de mantidas em temperatura ambiente por aproximadamente 48 horas para secagem, as lâminas foram lavadas em água corrente por 30 minutos e secas, novamente, em temperatura ambiente.

As lâminas foram realizadas em duplicata e foram examinadas em lupa (Zeiss) para contagem do número total de placas de lise, quando após a obtenção das médias das duplicatas, foram realizados os cálculos em função da viabilidade celular e do número total de células nucleadas por baço. O resultado final está expresso em número de PFC x 10^{-6} células de baço.

11. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE HORMÔNIOS.

Após descongelamento prévio dos soros colhidos no dia do sacrifício, foram realizadas as dosagens de tiroxina total (ug%) e corticosterona (ng/ml) circulantes pelo método de radioimunoensaio.

Para dosagem de tiroxina total foi utilizado "kit" comercial da TRILAB, com separação por duplo anticorpo.

Já para dosagem de corticosterona foi utilizado "kit" da ICN BIOMEDICALS, especialmente designado para uso em ratos e camundongos de laboratório. O anti-soro utilizado neste "kit" mostrou ser altamente específico, demonstrado pela baixa reatividade cruzada com 20 esteróides testados.

Todas as amostras de um mesmo experimento foram analisadas dentro de um mesmo ensaio.

12. CONTROLE DA EXTENSÃO DA LESÃO.

Os cérebros dos animais submetidos à lesão estereotáxica foram removidos no dia do sacrifício e mantidos em freezer -20°C até o momento da análise histológica. Assim, foram realizados cortes seriados de aproximadamente 50 μm de espessura em criostato (Leitz Wetzler), recolhidos em lâminas de microscopia e, após secagem, foram corados com Azul de Toluidina e lavados em água. Os cortes foram observados em microscópio estereoscópico (Zeiss) com câmara lúcida e classificados de acordo com as estruturas do complexo hipocampal lesadas, seguindo a orientação do atlas de DE GROOT (1959).

Após a realização do diagnóstico de lesão dos 44 ratos do Experimento IV e dos 16 ratos do Experimento V, estes foram agrupados de acordo com a estrutura do complexo hipocampal lesada em grupos: a) com lesão total de fímbria hipocampal (L.F.); b) com lesão de parte do hipocampo, atingindo porção CA1 (L.HPC) ou c) com lesão mista (L.M.), que atingiu parte da fímbria e parte do hipocampo entre as porções CA2 e CA3 (Figura 1).

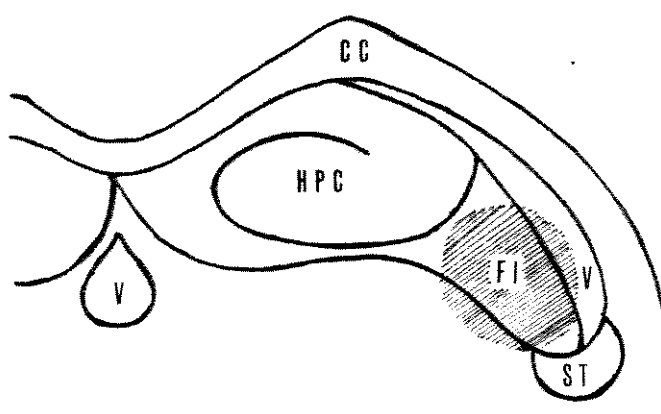
13. TRATAMENTO ESTATÍSTICO.

O teste "t" de Student, para amostras independentes, foi utilizado em todos experimentos para se determinar o nível de significância entre as médias dos vários grupos. Tomou-se como diferença estatisticamente significativa o valor de $p < 0,05$.

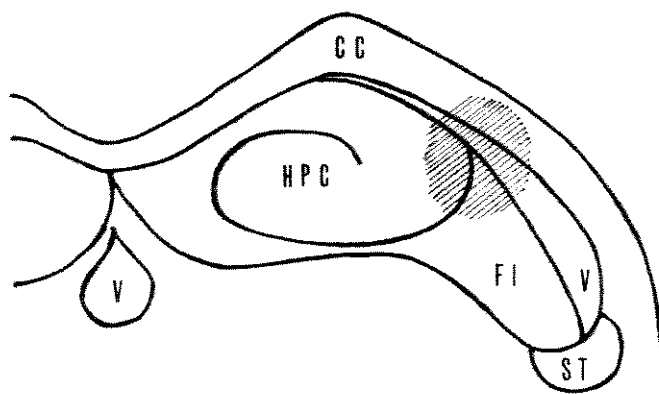
A porcentagem de aumento da resposta imune nos animais adrenalectomizados foi calculada através da fórmula:

$$\% \text{ DE AUMENTO} = \frac{\text{EXPERIMENTAL} - \text{CONTROLE}}{\text{CONTROLE}} \times 100$$

lesão
de fimbria
hipocampal
(L.F)



lesão
mista
(L.M)



lesão de
parte do
hipocampo
(L.HPC)

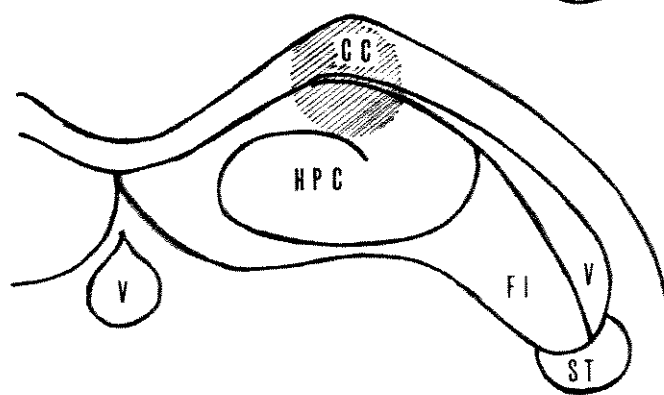


FIGURA 1 - Esquema representativo do corte histológico do cérebro de animais com lesões no complexo hipocampal (plano 5,0 do atlas de DE GROOT, 1959).

V = ventrículo cerebral

HPC = hipocampo

FI = fimbria hipocampal

CC = corpo caloso

ST = estria terminal

IV. RESULTADOS.

EXPERIMENTO I - ESTUDO DO GRUPO DE RATOS NORMAIS.

A resposta imune em ratos normais provoca alterações, hormonais e no sistema nervoso central, já bem estabelecidas. Assim, este experimento foi executado com o objetivo de se conhecer a cinética da resposta imune e possíveis alterações nos diferentes eixos glandulares após estímulo antigênico dos ratos Wistar da nossa colônia, a serem utilizados ao longo de todo trabalho.

1. **Análise da resposta imune primária:** Na figura 2, acha-se representado o perfil da resposta imune primária (número de PFC x 10^{-6} células de baço) em ratos normais, frente a um estímulo antigênico (hemácias de carneiro) aos 3, 4, 5 e 6 dias após imunização.

Nesta figura, podemos observar que aos 4 e 5 dias após a imunização, há um aumento significativo ($p < 0,05$ em relação aos 3 e 6 dias) no número de PFC, caracterizando, assim, o melhor dia para ser utilizado nos experimentos posteriores, ou seja, o 5º dia após a imunização.

Nos ratos controles, isto é, aqueles que foram inoculados com solução salina fisiológica, a contagem de células formadoras de placas, utilizando-se com antígeno hemácias de carneiro, se apresentou praticamente nula (inferior a 2 placas por baço).

2. Análise do número total de células nucleadas por baço: A figura 3 representa o número total de células nucleadas por baço ($\times 10^6$) de animais inoculados com solução salina fisiológica ou hemácias de carneiro e sacrificados 3, 4, 5 e 6 dias depois. Por esta análise, podemos observar que não há diferenças significativas no número de células nucleadas por baço de animais inoculados com hemácias de carneiro, em relação aos animais controles inoculados com solução salina fisiológica. No entanto, os valores de 4º e 5º dias, tanto nos animais inoculados com solução salina fisiológica como naqueles com hemácias de carneiro, são diferentes dos valores de 3º e 6º dias.

3. Análise dos pesos das glândulas: A tabela 1 estão expressos os pesos (mg/100 g de peso corporal) das glândulas adeno-hipófise, tiróide, adrenais, timo e testículos do grupo em estudo.

3.1. Pesos da adeno-hipófise: Somente o grupo de ratos inoculados com hemácias de carneiro, e sacrificados no 5º dia, apresentou diminuição significativa ($p < 0,05$) no peso da adeno-hipófise em relação ao seu controle inoculado com solução salina fisiológica.

3.2. Pesos de tiróide: Não houve diferenças significativas nos pesos de tiróide entre os grupos inoculados com hemácias de carneiro e os grupos inoculados com solução salina fisiológica, sacrificados 3, 4, 5 e 6 dias depois.

3.3. **Pesos de adrenais:** Observamos somente uma diminuição significativa ($p < 0,05$) nos pesos das adrenais, no grupo inoculado com hemácias de carneiro, em relação ao seu grupo controle, sacrificado 4 dias após inoculação.

3.4. **Pesos de timo:** Houve somente uma significativa diminuição ($p < 0,05$) no peso do timo dos animais inoculados com hemácias de carneiro e sacrificados 6 dias depois, não havendo diferenças nos outros grupos.

3.5. **Pesos de testículos:** Não foram observadas alterações nos pesos de testículos entre os grupos sob observação.

4. **Análise das dosagens hormonais:** As figuras 4 e 5 mostram as dosagens de tiroxina ($\mu\text{g}\%$) e corticosterona (ng/ml) respectivamente, dos grupos de ratos inoculados com hemácias de carneiro e sacrificados 3, 4, 5 e 6 dias depois.

4.1. **Dosagem de tiroxina:** Analisando os níveis de tiroxina nos diferentes dias posteriores à imunização, observamos um aumento significativo ($p < 0,05$) do 3º para o 4º dia, que se manteve no 5º dia, diminuindo então no 6º dia após imunização.

4.2. **Dosagem de corticosterona:** Podemos observar um aumento significativo ($p < 0,05$) no 4º dia após imunização, enquanto aos 3, 5 e 6 dias o nível se manteve semelhante.

COMENTÁRIOS:

O exame dos resultados do Experimento I mostra que 4 dias após imunização com hemácias de carneiro, houve um pronunciado aumento no número de células formadoras de placas no baço, alcançando o pico máximo no 5º dia (figura 2). Estas modificações indicaram haver somente aumento no número de células sensibilizadas pelo antígeno, pois não houve alterações significativas no número total de células nucleadas por baço (figura 3).

Como era esperado, juntamente com as modificações ocorridas na resposta imune, houve mudanças hormonais significativas. No 4º dia pós-imunização, observamos um rápido aumento de corticosterona e tiroxina circulantes (figura 4 e 5), evidenciado também pela diminuição do peso das adrenais (tabela 1). Já no 5º dia, os níveis de corticosterona voltam ao normal (figura 5), enquanto os níveis de tiroxina se mantêm elevados (figura 4). No 6º dia, ambos os níveis hormonais voltam aos valores basais (figuras 4 e 5), enquanto observamos que o timo sofreu profundas influências de todos os eventos da resposta imune, como também a conhecida ação dos hormônios sob os tecidos linfóides (tabela 1).

TABELA 1 - Valores das médias $\pm$ EPM dos pesos das glândulas: adeno-hipófise, tiróide, adrenais, timo e testículos, expressos em mg/100 g de peso corporal, do grupo normal, inoculado com hemácias de carneiro (SRBC) ou solução salina fisiológica (NaCl) e sacrificados 3, 4, 5 e 6 dias após imunização.

GLÂNDULAS (mg%)					
	A.HIPÓFISE	TIRÓIDE	ADRENAIS	TIMO	TESTÍCULOS
GRUPOS					
3DIAS NaCl (N=10)	2,6 $\pm$ 0,2	9,8 $\pm$ 0,4	17,1 $\pm$ 0,6	140,4 $\pm$ 9,9	1153,5 $\pm$ 4,0
3DIAS SRBC (N=9)	2,9 $\pm$ 0,4	8,8 $\pm$ 0,9	17,3 $\pm$ 0,7	162,5 $\pm$ 10,2	1184,2 $\pm$ 29,2
4DIAS NaCl (N=10)	2,6 $\pm$ 0,1	6,6 $\pm$ 0,5	20,5 $\pm$ 0,6	152,2 $\pm$ 8,0	1239,3 $\pm$ 39,3
4DIAS SRBC (N=10)	2,8 $\pm$ 0,1	6,3 $\pm$ 0,6	18,1 $\pm$ 1,0*	156,8 $\pm$ 6,9	1209,2 $\pm$ 67,4
5DIAS NaCl (N=10)	3,2 $\pm$ 0,1	9,2 $\pm$ 0,6	19,9 $\pm$ 0,5	186,6 $\pm$ 15,1	1143,8 $\pm$ 65,5
5DIAS SRBC (N=10)	2,9 $\pm$ 0,1*	8,4 $\pm$ 0,5	20,3 $\pm$ 1,0	161,8 $\pm$ 12,6	1037,6 $\pm$ 58,1
6DIAS NaCl (N=10)	2,5 $\pm$ 0,1	6,6 $\pm$ 0,5	20,5 $\pm$ 0,9	175,7 $\pm$ 11,1	1240,7 $\pm$ 64,5
6DIAS SRBC (N=10)	2,6 $\pm$ 0,1	6,7 $\pm$ 0,3	19,1 $\pm$ 0,6	122,0 $\pm$ 7,7*	1128,8 $\pm$ 32,5

EPM = erro padrão da média

N = número de animais

* p < 0,05

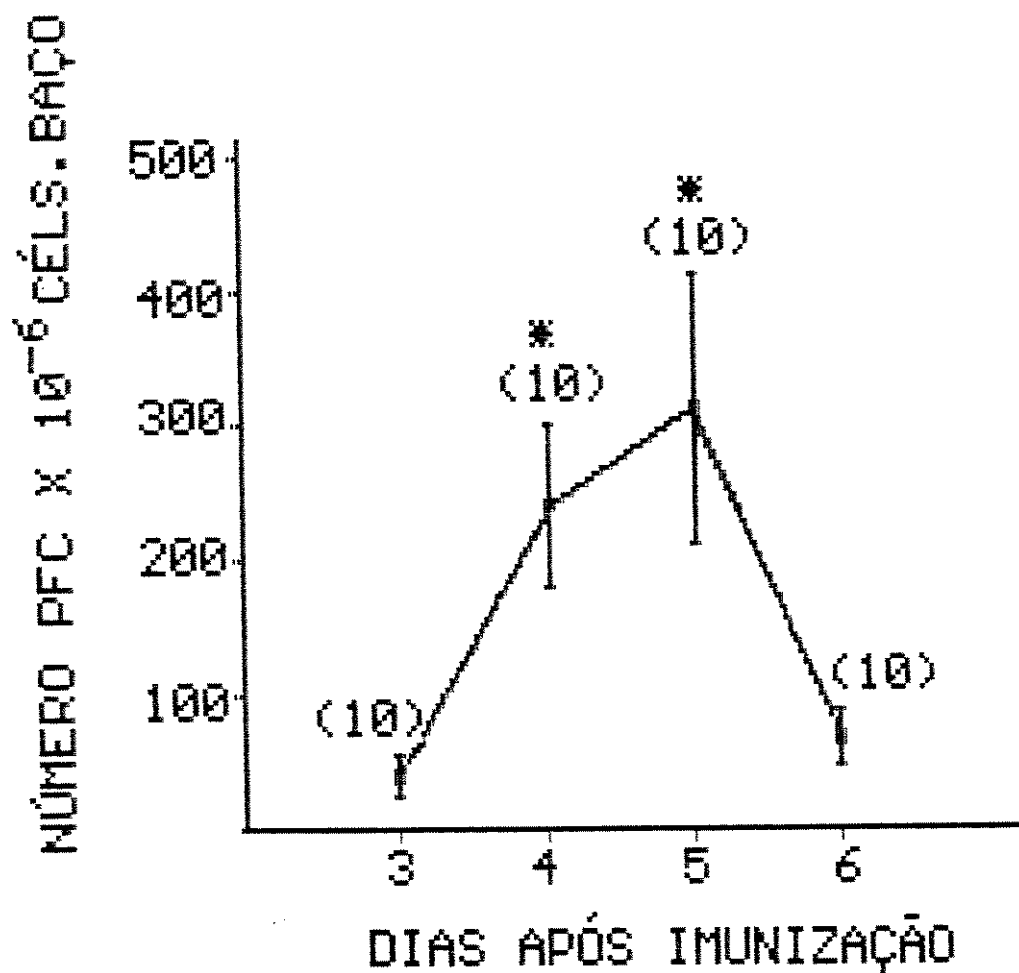


FIGURA 2 - Valores das médias $\pm$ EPM do número de células formadoras de placas ($\times 10^{-6}$ células do baço), do grupo normal, inoculado com hemácias de carneiro e sacrificado 3, 4, 5 e 6 dias após imunização.

* $p < 0,05$

() número de animais

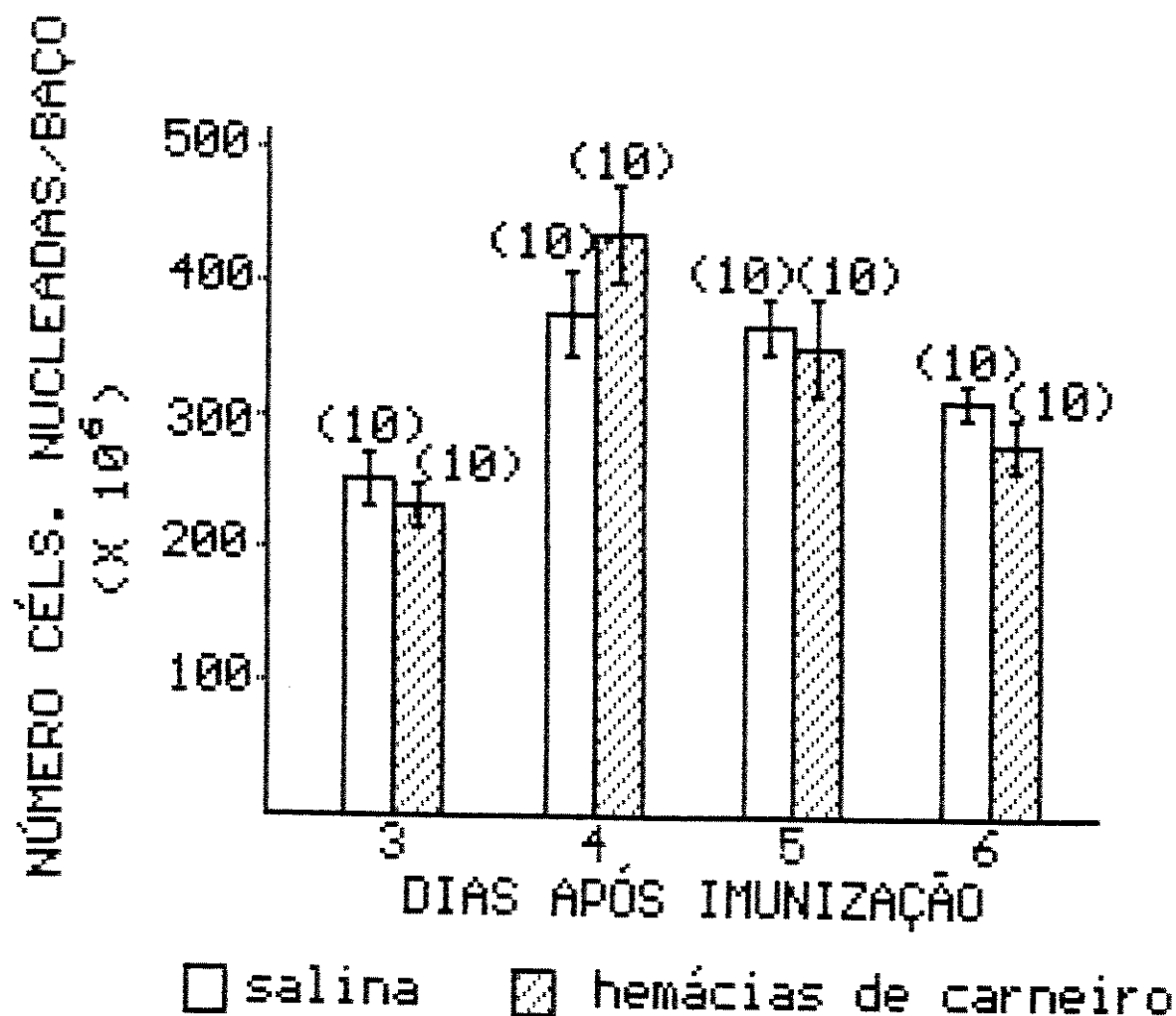


FIGURA 3 - Valores das médias $\pm$ EPM do número total de células nucleadas por baço ($\times 10^6$), do grupo normal inoculado com hemácias de carneiro ou solução salina fisiológica e sacrificado 3, 4, 5 e 6 dias após imunização. () número de animais

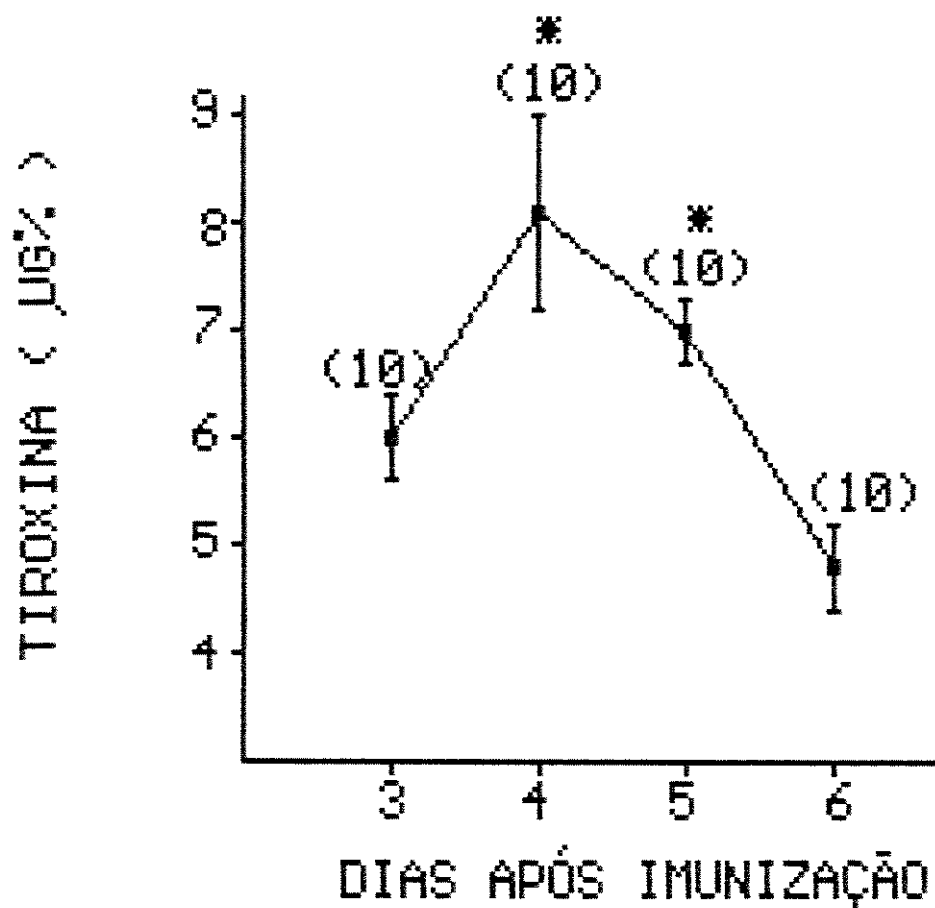


FIGURA 4 - Valores das médias $\pm$ EPM dos níveis de tiroxina sérica (ug%) do grupo normal, inoculado com hemácias de carneiro e sacrificado 3, 4, 5 e 6 dias após imunização.

* $p < 0,05$

() número de animais

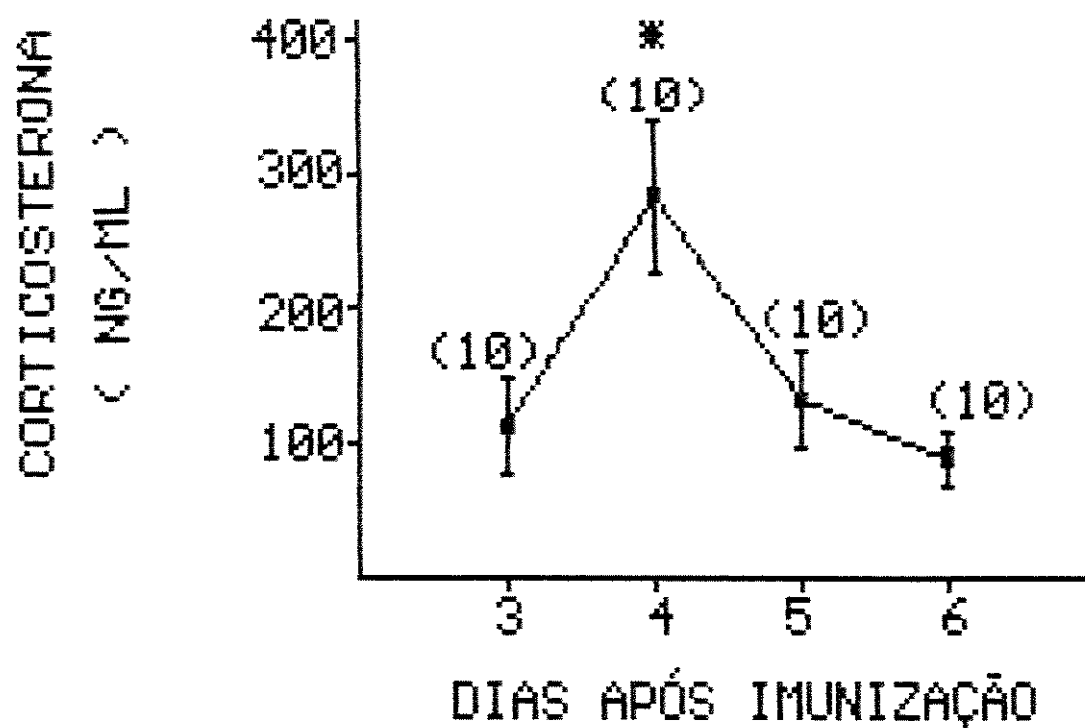


FIGURA 5 - Valores das médias $\pm$ EPM dos níveis de corticosterona sérica (ng/ml) do grupo normal, inoculado com hemácias de carneiro e sacrificado 3, 4, 5 e 6 dias após imunização.

* $p < 0,05$

() número de animais

3. Análise dos pesos de glândulas: A tabela 2 representa os pesos das diferentes glândulas (mg/100 g de peso corporal do rato) do grupo normal/adrenalectomizado com 20, 30 e 40 dias de pós-operatório, que foram inoculados com solução salina fisiológica ou hemácias de carneiro e sacrificados 5 dias depois.

3.1. Pesos de adeno-hipófise : Podemos observar que os grupos de 30 e 40 dias, inoculados com hemácias de carneiro, apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) em relação aos seus controles inoculados com solução salina fisiológica. Além disso, observamos uma diminuição significativa ($p < 0,05$) nos pesos de adeno-hipófise em todos os grupos submetidos à adrenalectomia em relação ao grupo normal.

3.2. Pesos de tiróide: Somente o grupo de 20 dias, inoculado com hemácias de carneiro, apresentou diminuição significativa ($p < 0,05$) no peso de tiróide quando comparado com seu controle inoculado com solução salina fisiológica. Do mesmo modo que observado na adeno-hipófise, os pesos de tiróide de todos animais adrenalectomizados também se apresentaram diminuídos ($p < 0,05$) em relação ao grupo normal.

3.3. Pesos do timo: Não foram observadas alterações significativas nos pesos do timo dos animais inoculados com hemácias de carneiro, mas todos os animais adrenalectomizados apresentaram novamente diminuição significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo normal.

3.4. Pesos de testículos: Analisando-se os pesos de testículos, não observamos alterações significativas entre os diferentes grupos experimentais.

4. Análise das dosagens hormonais: As figuras 8 e 9 apresentam as dosagens de tiroxina (ug%) e corticosterona (ng/ml) respectivamente, do grupo de ratos inoculados com hemácias de carneiro ou solução salina fisiológica, após 40 dias da adrenalectomia, e sacrificados 5 dias após inoculação.

4.1. Dosagem de tiroxina: Observamos que os animais adrenalectomizados que receberam hemácias de carneiro apresentaram aumento significativo ($p < 0,05$) em relação aos que receberam solução salina fisiológica, ao mesmo tempo que ambos se apresentaram diminuídos ($p < 0,05$) em relação ao grupo normal.

4.2. Dosagem de corticosterona: Podemos observar através da figura 9, que o grupo adrenalectomizado, inoculado com hemácias de carneiro, apresentou aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis de corticosterona circulante, em relação ao inoculado com solução salina fisiológica, que apresentou níveis indosáveis. Mesmo assim, o grupo adrenalectomizado apresentou diminuição significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo normal.

COMENTÁRIOS:

Comparando-se os resultados obtidos dos animais submetidos à adrenalectomia com os dos animais normais, 5 dias após imunização com hemácias de carneiro ou solução salina fisiológica, observamos que 20 dias após adrenalectomia não houve mudanças no número de PFC (figura 7), embora tenha sido constatado um aumento no número de células nucleadas por baço (figura 7). Podemos também demonstrar o envolvimento do eixo tireoidiano neste período indicado pela diminuição no peso da tiróide, que retorna ao normal após 30 e 40 dias de pós-operatório (tabela 2).

Após 30 dias de adrenalectomia, podemos observar um pronunciado aumento no número de PFC (figura 6), juntamente com o aumento na proliferação celular no baço, indicado pelo aumento do número de células nucleadas por baço (figura 7). Podemos demonstrar também neste período um aumento na síntese dos hormônios da adeno-hipófise, frente ao estímulo antigênico, já que houve um aumento de seu peso (tabela 2).

Já aos 40 dias, observamos o pico máximo de aumento no número de PFC (figura 6). Com as dosagens hormonais constatamos diminuição dos níveis de tiroxina (figura 8), coincidindo com diminuição do peso da tiróide (tabela 2), indicando hipofunção glandular nestas condições experimentais. Ao mesmo tempo, observamos aumento destes níveis nos animais adrenalectomizados inoculados com hemácias de carneiro em relação ao inoculado com solução

salina (figura 8). Em relação ao eixo adrenal, podemos atestar uma pronunciada diminuição nos níveis de corticosterona circulante, embora, como observado no eixo tireoidiano, a estimulação antigênica tenha levado a um aumento destes níveis, não alcançando os níveis do grupo normal (figura 9). Outros hormônios, no entanto, podem estar também envolvidos, pois um aumento do peso da adeno-hipófise foi observado neste grupo (tabela 2).

TABELA 2- Valores das médias $\pm$ EPM dos pesos das glândulas: adeno-hipófise, tiróide, timo e testículos, expressos em mg/100 g de peso corporal, dos grupos normal e adrenalectomizado com 20, 30 e 40 dias de pós-operatório, inoculados com hemácias de carneiro (SRBC) ou solução salina fisiológica (NaCl) e sacrificados 5 dias após imunização.

GRUPOS	GLÂNDULAS (mg%)			
	A.HIPÓFISE	TIRÓIDE	TIMO	TESTÍCULOS
NORMAL NaCl (N=10)	3,2 $\pm$ 0,1	9,2 $\pm$ 0,6	186,6 $\pm$ 15,1	1113,8 $\pm$ 42,9
NORMAL SRBC (N=10)	2,9 $\pm$ 0,1*	8,4 $\pm$ 0,5	161,7 $\pm$ 12,6	1037,6 $\pm$ 58,1
20DIAS NaCl (N=9)	2,2 $\pm$ 0,1	6,2 $\pm$ 0,2#	153,7 $\pm$ 11,9#	1079,5 $\pm$ 21,2
20DIAS SRBC (N=10)	2,1 $\pm$ 0,1	4,9 $\pm$ 0,4*#	121,9 $\pm$ 9,9#	1064,6 $\pm$ 63,6
30DIAS NaCl (N=5)	1,6 $\pm$ 0,2	5,0 $\pm$ 0,7#	95,9 $\pm$ 18,9#	932,2 $\pm$ 90,8
30DIAS SRBC (N=10)	2,1 $\pm$ 0,1*	5,5 $\pm$ 0,5#	108,1 $\pm$ 12,5#	989,5 $\pm$ 52,7
40DIAS NaCl (N=9)	2,0 $\pm$ 0,1	6,3 $\pm$ 0,4#	114,7 $\pm$ 9,0#	1113,9 $\pm$ 41,5
40DIAS SRBC (N=9)	2,8 $\pm$ 0,1*	6,8 $\pm$ 0,3#	97,9 $\pm$ 11,4#	1027,7 $\pm$ 48,3

EPM = erro padrão da média

N = número de animais

* p < 0,05 em relação ao grupo inoculado com NaCl

p < 0,05 em relação ao grupo normal

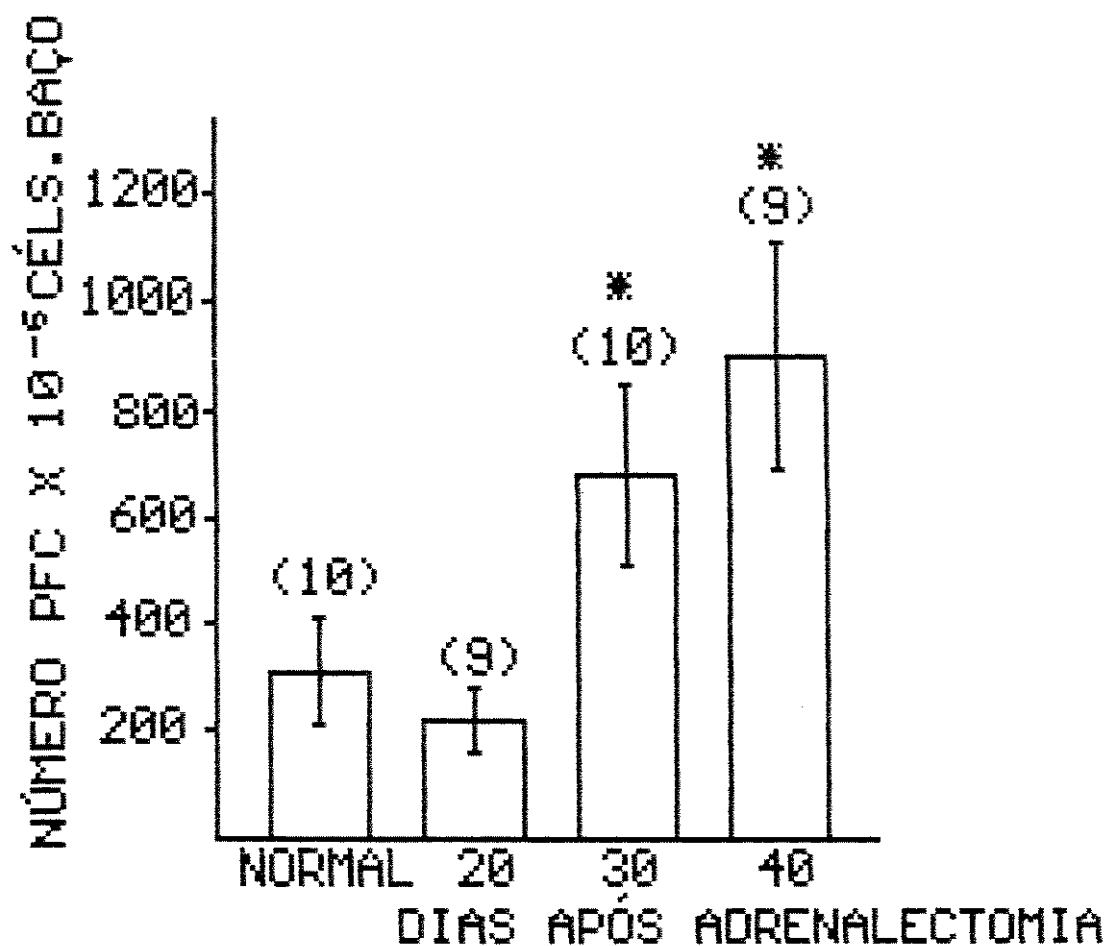


FIGURA 6 - Valores das médias $\pm$ EPM do número de células formadoras de placas ($\times 10^{-6}$ células do baço), do grupo normal/adrenalectomizado, inoculado 20, 30 e 40 dias após adrenalectomia com hemácias de carneiro e sacrificado 5 dias após imunização.

* $p < 0,05$

() número de animais

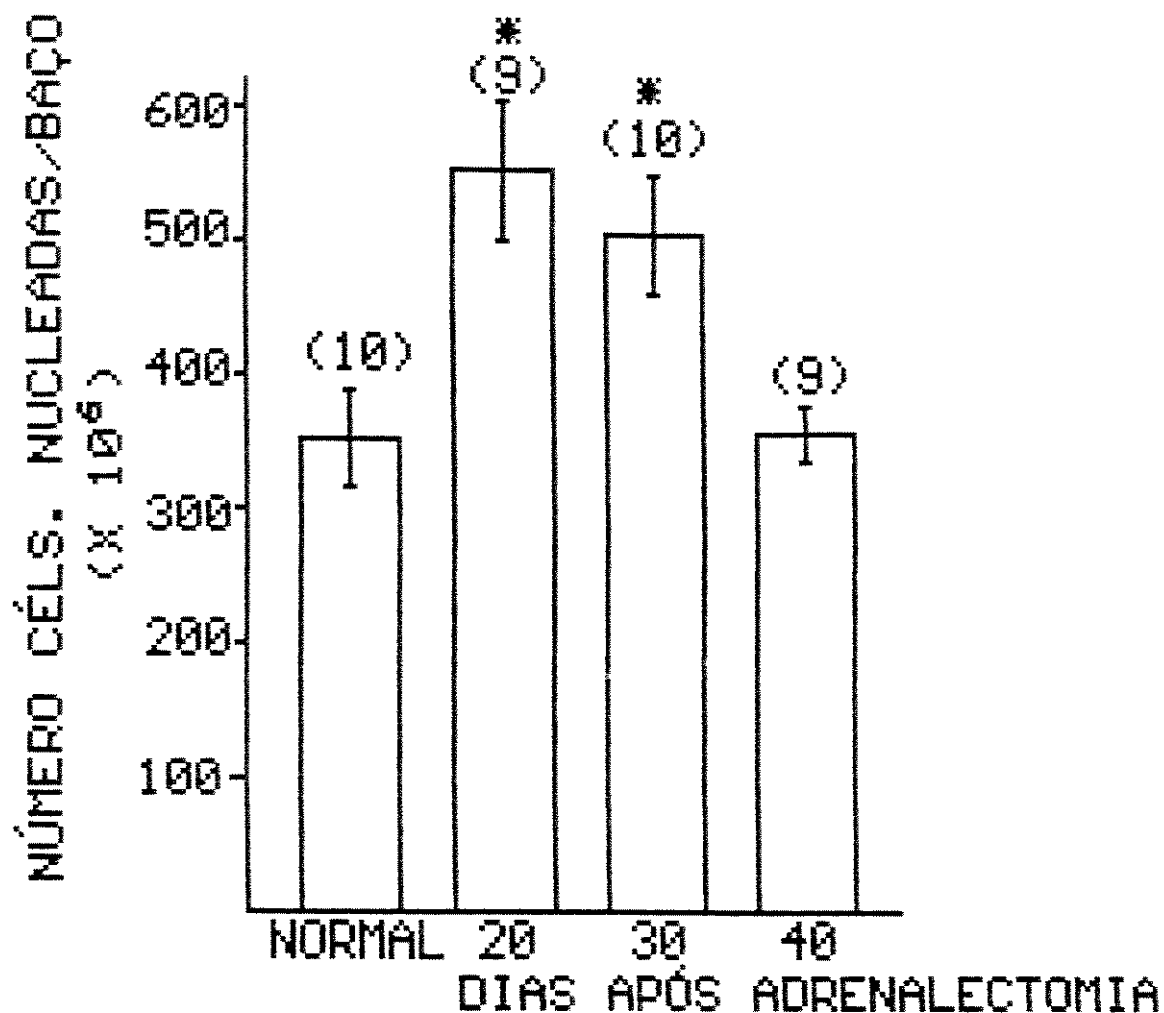


FIGURA 7 - Valores das médias $\pm$ EPM do número total de células nucleadas por baço ($\times 10^6$), do grupo normal/adrenalectomizado, inoculado 20, 30 e 40 dias após adrenalectomia com hemácias de carneiro e sacrificado 5 dias após imunização.

* $p < 0,05$

() número de animais

EXPERIMENTO II - EFEITO DA ADRENALECTOMIA SOBRE A RESPOSTA IMUNE DE RATOS .

É também bem conhecida a ação dos corticosteróides sobre o sistema imune. Assim, a ablação de sua fonte produtora, ou seja, as glândulas adrenais, pode levar a mudanças significativas nos eventos da resposta imune. Com o objetivo de se determinar o melhor período de pós-adrenalectomia, onde culminam estas mudanças, foi realizado este experimento.

1. **Análise da resposta imune primária:** A figura 6 mostra o efeito da adrenalectomia na resposta imune primária (número PFC $\times 10^{-6}$ células de baço). Podemos observar um aumento significativo ($p < 0,05$) de PFC nos grupos com 30 e 40 dias de pós-operatório, 117 e 187% respectivamente, em relação ao grupo normal. Assim, ficou estabelecido o melhor tempo de pós-operatório a ser utilizado no Experimento V, ou seja, 40 dias, onde observamos a maior porcentagem de aumento.

2. **Análise do número total de células nucleadas por baço:** A figura 7 representa as contagens do número de células nucleadas por baço ($\times 10^6$) dos grupos compreendidos neste experimento. Podemos observar um aumento significativo ($p < 0,05$) no número total de células nucleadas nos grupos com 20 e 30 dias de pós-operatório em relação ao grupo de ratos normais.

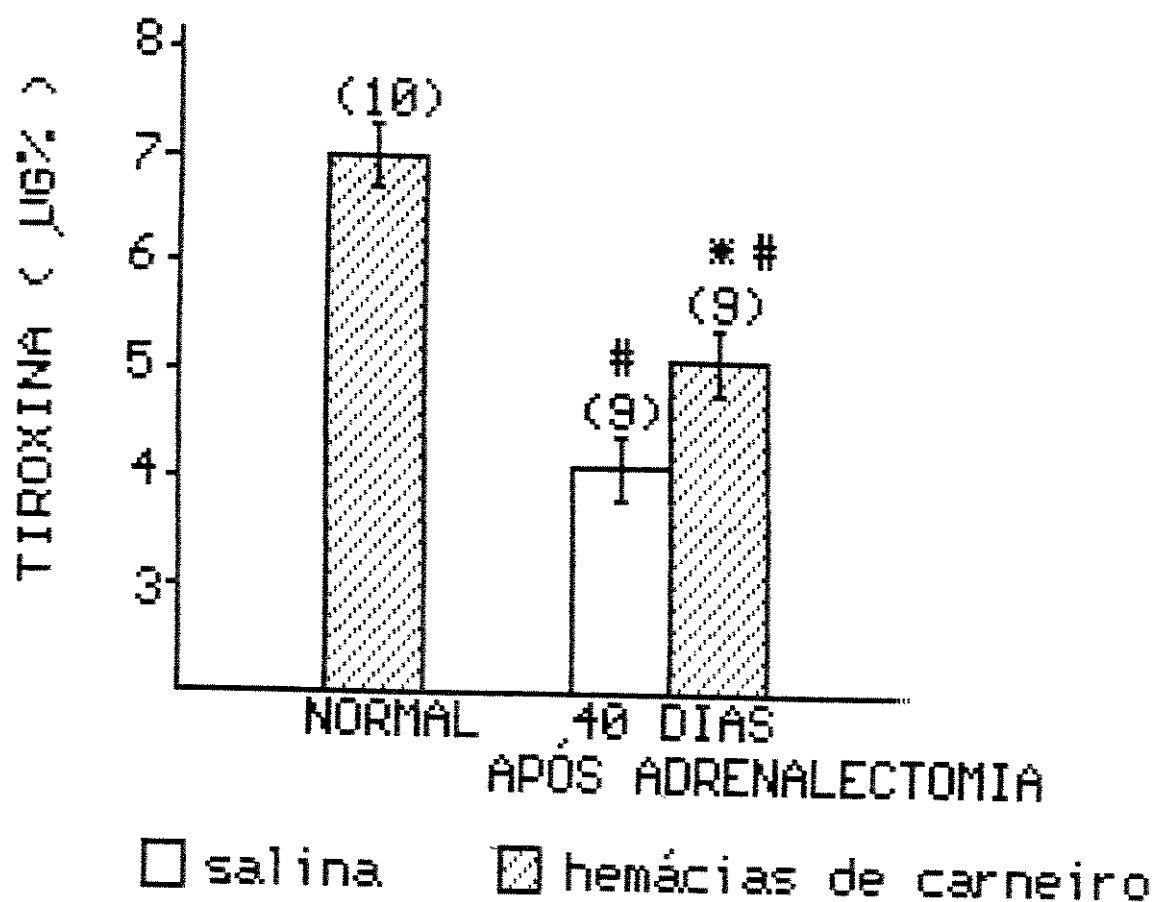


FIGURA 8 - Valores das médias $\pm$ EPM dos níveis de tiroxina sérica ($\mu\text{g}\%$) do grupo normal/adrenalectomizado, inoculado com hemácias de carneiro ou solução salina fisiológica 40 dias após adrenalectomia e sacrificado 5 dias após imunização.

* $p < 0,05$ em relação ao grupo inoculado com salina

$p < 0,05$ em relação ao grupo normal

() número de animais

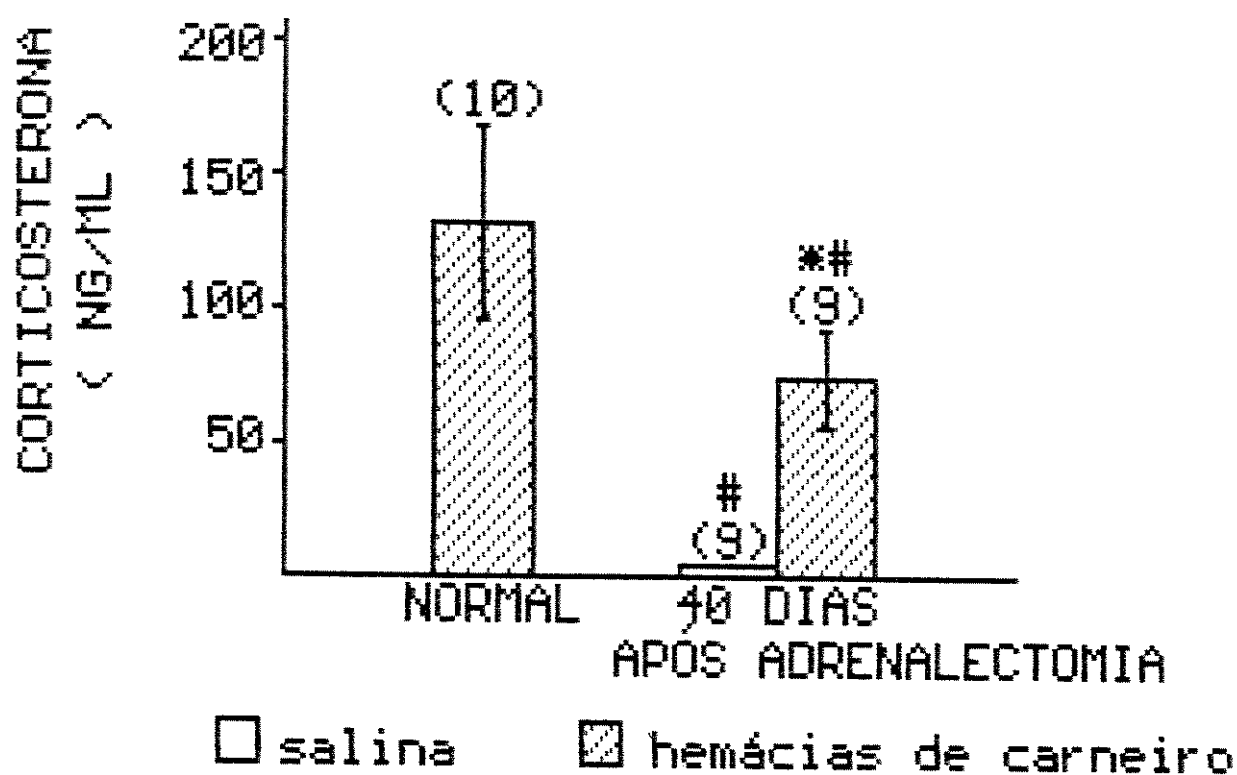


FIGURA 9 - Valores das médias $\pm$ EPM dos níveis de corticosterona sérica (ng/ml) do grupo normal/adrenalectomizado, inoculado com hemácias de carneiro ou solução salina fisiológica 40 dias após adrenalectomia e sacrificado 5 dias após imunização.

* $p < 0,05$ em relação ao grupo inoculado com salina

$p < 0,05$ em relação ao grupo normal

() número de animais

EXPERIMENTO III - EFEITO DA "SHAM"-CIRURGIA NO COMPLEXO HIPOCAMPAL SOBRE A RESPOSTA IMUNE PRIMÁRIA DE RATOS.

Seguindo o planejamento experimental, este experimento foi executado com o objetivo de validar dos resultados dos grupos subsequentes com lesões eletrolíticas do complexo hipocampal.

1. Análise da Resposta imune primária:

Analizando-se a resposta imune primária dos ratos submetidos à "sham"-cirurgia e inoculados com hemácias de carneiro (figura 10), após aproximadamente 25 dias, e sacrificados no quinto dia de imunização, observamos resultados estatisticamente semelhantes aos do grupo normal.

2. Análise do número total de células nucleadas por baço: O número de células nucleadas obtido dos baços dos animais deste experimento está representado na figura 11. Observou-se um aumento significativo ($p < 0,05$) deste número quando comparado ao do grupo normal e ao do grupo "sham"-operado inoculado com solução salina .

3. Análise dos pesos das glândulas: A tabela 3 compara os pesos das diferentes glândulas (mg/100 g de peso corporal do rato) entre os grupos "sham" e normal. Podemos observar que todas as glândulas dos animais "sham" se apresentaram diminuídas ($p < 0,05$) em relação ao grupo

normal, não havendo diferenças entre os animais inoculados com hemácias de carneiro e os inoculados com solução salina.

4. Análise das dosagens hormonais: Na figura 12 acha-se representada a dosagem de tiroxina (ug%) do grupo em estudo e podemos observar que houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) no grupo "sham", tanto no inoculado com hemácias de carneiro como naquele inoculado com solução salina, em relação ao grupo normal.

Já na dosagem de corticosterona em ng/ml (figura 13) podemos observar que os níveis deste hormônio se acham semelhantes entre os grupos "sham" e normal.

COMENTÁRIOS:

Analizando-se os animais deste grupo experimental, observamos que a simples introdução de um eletrodo no complexo hipocampal, não causou mudanças funcionais na resposta imune humoral (figura 10), embora tenhamos observado um aumento no número de células nucleadas por baço (figura 11).

Em relação ao eixo tireoidiano, observamos diminuição nos níveis de tiroxina deste grupo em relação ao grupo normal (figura 12).

Observamos, ainda, diminuições significativas nos pesos das diferentes glândulas (tabela 3), embora os níveis de corticosterona não se encontrem alterados (figura

13), descartando a hipótese de que estes animais ainda estejam sobre o efeito de corticosteróides liberados durante as primeiras horas de estresse cirúrgico.

TABELA 3 - Valores das médias $\pm$ EPM dos pesos das glândulas: adeno-hipófise, tiróide, adrenais, timo e testículos, expressos em mg/100 g de peso corporal, dos grupos normal e "sham"-operado, inoculados com hemácias de carneiro (SRBC) ou solução salina fisiológica (NaCl) e sacrificados 5 dias após imunização.

GLÂNDULAS (mg%)					
	A.HIPÓFISE	TIRÓIDE	ADRENAIS	TIMO	TESTÍCULOS
GRUPOS					
NORMAL					
SRBC (N=10)	2,9 $\pm$ 0,1	8,4 $\pm$ 0,5	20,3 $\pm$ 1,0	155,7 $\pm$ 13,7	1037,6 $\pm$ 58,1
NORMAL					
NaCl (N=10)	3,2 $\pm$ 0,1	9,2 $\pm$ 0,6	19,9 $\pm$ 0,5	186,6 $\pm$ 15,1	1143,8 $\pm$ 65,5
"SHAM"					
SRBC (N=18)	2,0 $\pm$ 0,1*	5,4 $\pm$ 0,2*	16,2 $\pm$ 0,7*	96,4 $\pm$ 5,9*	951,3 $\pm$ 25,4*
"SHAM"					
NaCl (N=10)	2,0 $\pm$ 0,1*	5,3 $\pm$ 0,2*	15,7 $\pm$ 0,4*	65,5 $\pm$ 4,6*	866,6 $\pm$ 29,0*

EPM = erro padrão da média

N = número de animais

* p < 0.05 em relação ao grupo normal

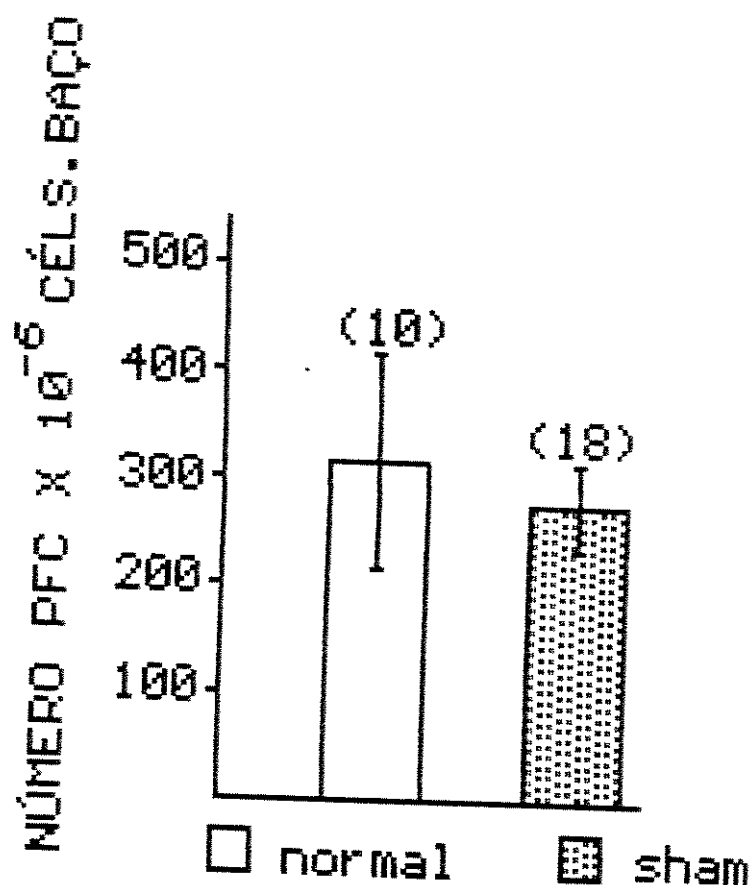


FIGURA 10 - Valores das médias $\pm$ EPM do número de células formadoras de placas ($\times 10^{-6}$ células do baço) dos grupos normal e sham-operado, inoculados com hemácias de carneiro e sacrificados 5 dias após imunização.
() número de animais

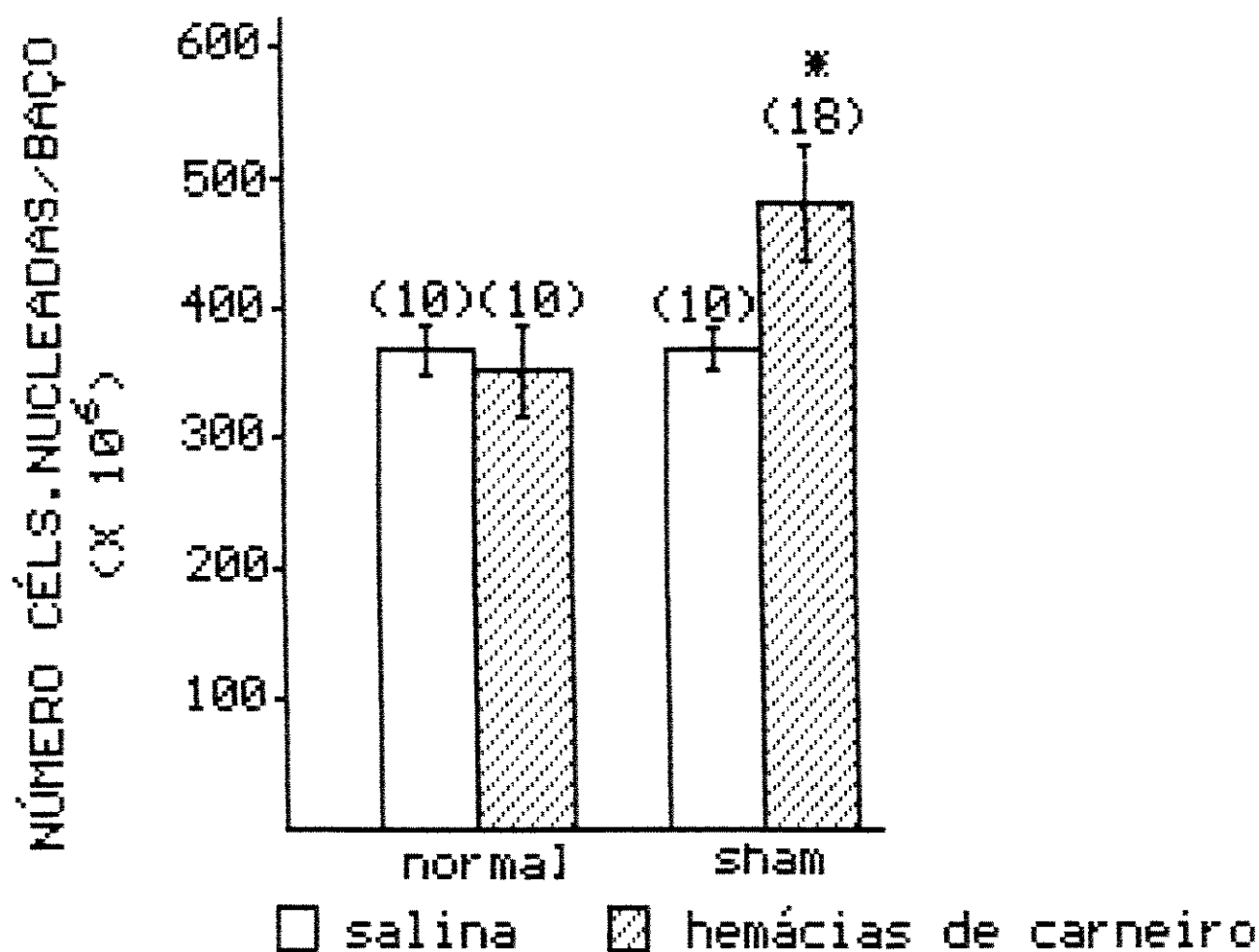


FIGURA 11 - Valores das médias $\pm$ EPM do número total de células nucleadas por baço ($\times 10^6$) dos grupos normal e sham-operado, inoculados com hemácias de carneiro ou solução salina fisiológica e sacrificados 5 dias após imunização.

* $p < 0,05$ em relação ao grupo normal

() número de animais

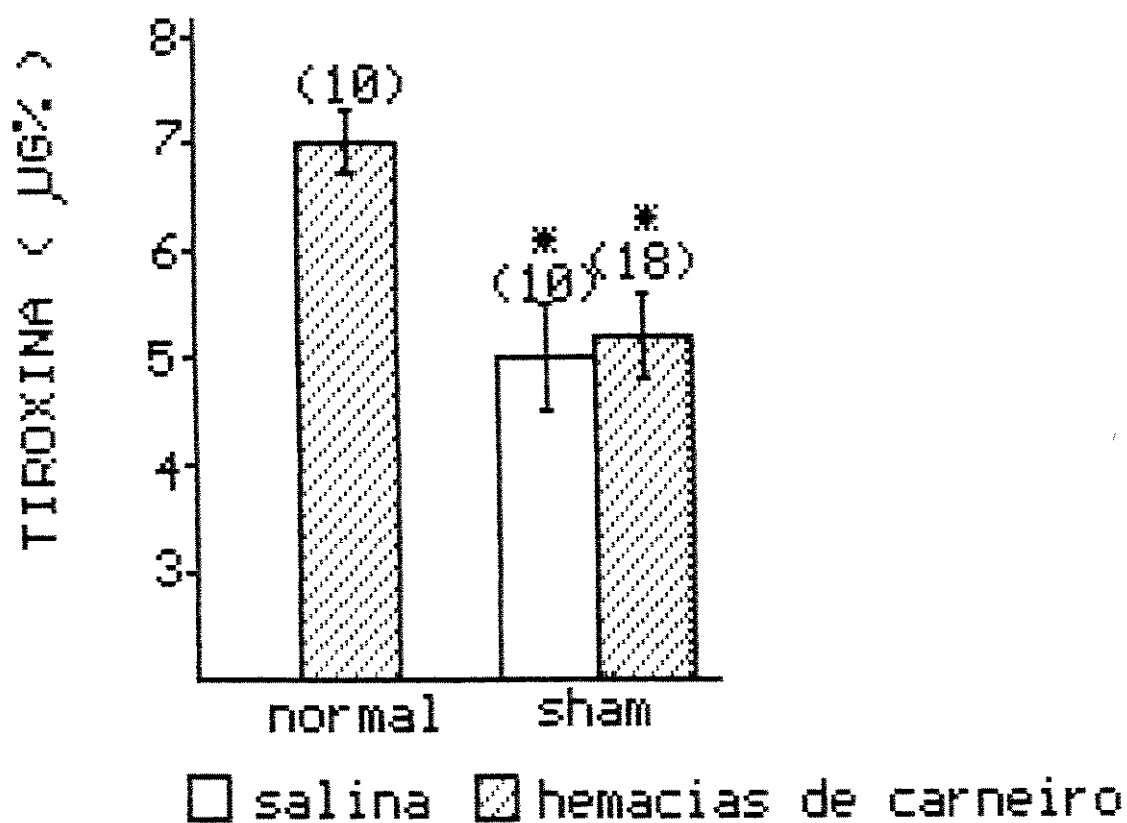


FIGURA 12 - Valores das médias $\pm$ EPM dos níveis de tiroxina sérica (ug%) dos grupos normal e sham-operado, inoculados com hemácias de carneiro ou solução salina fisiológica e sacrificados 5 dias após imunização.

* $p < 0,05$ em relação ao grupo normal

() número de animais

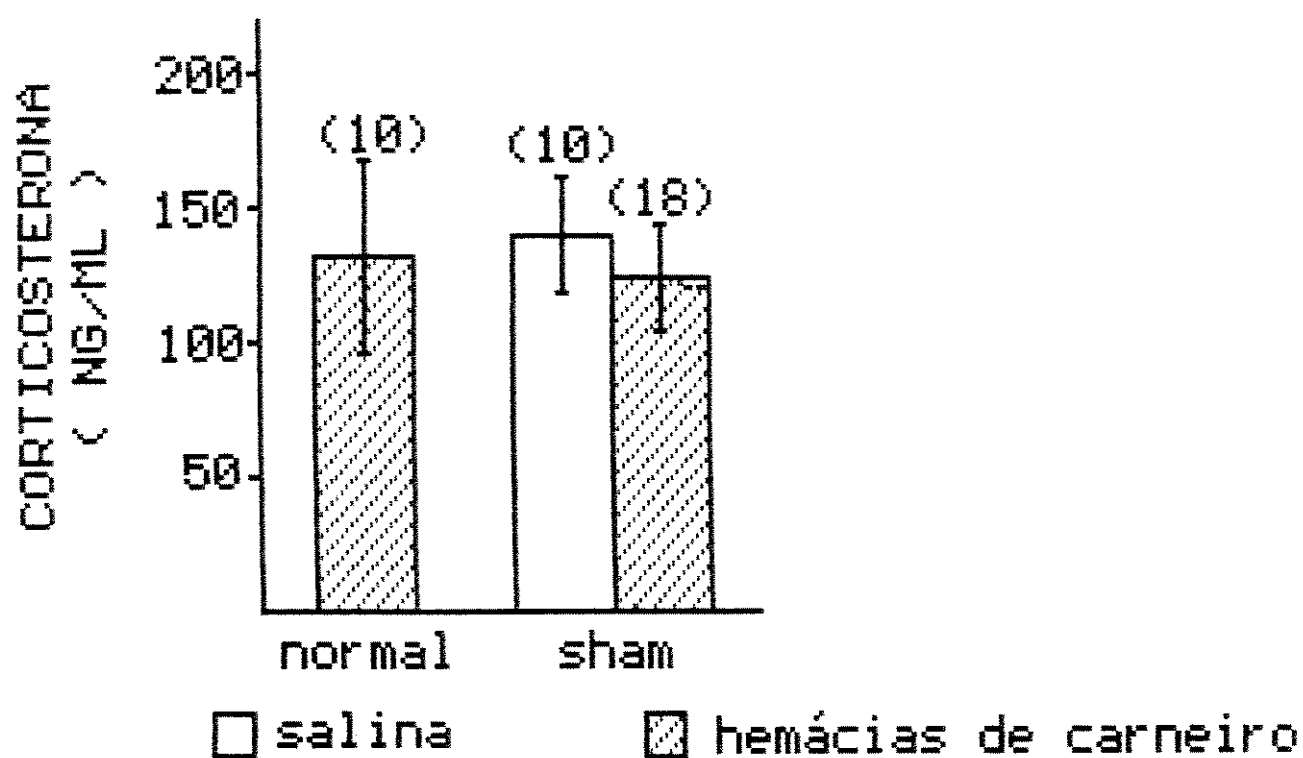


FIGURA 13 - Valores das médias $\pm$ EPM dos níveis de corticosterona sérica (ng/ml) dos grupos normal e sham-operado, inoculados com hemácias de carneiro ou solução salina fisiológica e sacrificados 5 dias após imunização.
() número de animais

EXPERIMENTO IV - EFEITOS DAS LESÕES NO COMPLEXO HIPOCAMPAL NA RESPOSTA IMUNE PRIMÁRIA DE RATOS.

O complexo hipocampal, como estrutura do sistema nervoso central e parte do sistema límbico, é responsável pela regulação dos vários eixos glandulares, via hipotálamo, em especial sobre o eixo hipófise-adrenal. Os resultados obtidos neste experimento pretendem demonstrar o grau de importância do complexo hipocampal na modulação da resposta imune, principalmente através de alterações dos diferentes eixos glandulares.

1. **Análise da resposta imune primária :** A figura 14 representa a resposta imune primária (número de PFC x 10^{-6} células de baço) dos grupos de ratos com lesão de fímbria hipocampal (L.F), lesão de parte do hipocampo (L.HPC) e lesão mista (L.M), ou seja, parte do hipocampo e parte da fímbria hipocampal, inoculados com hemácias de carneiro e sacrificados no 5º dia.

Podemos observar que houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) no grupo com L.F, enquanto que no grupo com L.M houve um aumento significativo ($p < 0,05$) e, no grupo com L.HPC, o resultado obtido foi semelhante ao do grupo "sham".

2. **Análise do número total de células nucleadas por baço:** Analisando-se a figura 15, onde se acha representado o número de células nucleadas por baço (no 5º

dia de imunização com hemácias de carneiro) dos diferentes grupos com lesões no complexo hipocampal, observamos que não houve diferenças significativas nestes resultados quando comparados aos do grupo "sham".

3. Análise dos pesos das glândulas: A tabela 4 mostra os pesos das glândulas (mg/100 g de peso corporal do rato) dos grupos com lesões, inoculados com hemácias de carneiro e sacrificados 5 dias depois.

Podemos observar que o grupo com L.M apresentou aumento significativo ($p < 0,05$) no peso de adeno-hipófise em relação ao grupo "sham". Comparando-se os pesos de tiróides, observamos aumentos significativos ($p < 0,05$) nos grupos com L.F e com L.HPC. Ao mesmo tempo, não foram observadas alterações nos pesos de adrenais e timo, enquanto que no peso de testículos somente o grupo com L.HPC apresentou aumento significativo ($p < 0,05$).

4. Análise das dosagens hormonais: As figuras 16 e 17 apresentam os níveis de tiroxina (ug%) e corticosterona (ng/ml), respectivamente, dos grupos deste experimento.

Somente no grupo com L.M houve um aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis de tiroxina, em relação ao grupo "sham". Comparando-se os níveis de corticosterona, observamos uma diminuição significativa ($p < 0,05$) no grupo com L.M em relação ao grupo "sham".

COMENTÁRIOS:

A análise comparativa dos resultados deste experimento, mostra que a lesão eletrolítica de diferentes regiões do complexo hipocampal promove diferentes efeitos na resposta imune primária.

A interrupção da fimbria hipocampal acarretou uma diminuição da resposta imune humoral (figura 14). Este efeito não parece ter sido via hormônio tireoidiano -embora o peso da tiróide tenha se mostrado aumentado (tabela 4)- nem via corticosterona, pois ambos os níveis se apresentaram iguais aos do grupo "sham" (figuras 16 e 17).

Já a lesão mista, isto é, que atingiu parte do hipocampo e parte da fimbria hipocampal, parece ter provocado um efeito estimulatório local, causando aumento na resposta imune (figura 14), que pode ter sido causado pelo concomitante aumento nos níveis de tiroxina (figura 16) e diminuição nos níveis de corticosterona (figura 17). Além disso, outros hormônios podem estar envolvidos neste mecanismo, pois constatamos um aumento no peso da adeno-hipófise (tabela 4).

A lesão que atingiu somente pequena parte do hipocampo não provocou diferenças na resposta imune (figura 14), nem nos níveis de tiroxina e corticosterona (figuras 16 e 17), embora tenha sido constatado aumento nos pesos da tiróide e testículos destes animais (tabela 4).

TABELA 4 - Valores das médias $\pm$ EPM dos pesos das glândulas: adeno-hipófise, tiróide, adrenais, timo e testículos, expressos em mg/100 g de peso corporal, dos grupos "sham"-operado e lesados na fimbria hipocampal (L.F), em parte do hipocampo e parte da fimbria (L.M) e em parte do hipocampo (L.HPC), inoculados com hemácias de carneiro e sacrificados 5 dias após imunização.

GRUPOS	GLÂNDULAS (mg%)				
	A.HIPÓFISE	TIRÓIDE	ADRENAIS	TIMO	TESTÍCULOS
"SHAM" (N=18)	2,0 $\pm$ 0,1	5,4 $\pm$ 0,2	16,2 $\pm$ 0,7	96,4 $\pm$ 5,9	951,3 $\pm$ 25,4
L.F (N=8)	1,8 $\pm$ 0,2	6,5 $\pm$ 0,4*	16,9 $\pm$ 0,6	116,8 $\pm$ 7,6	1036,8 $\pm$ 26,2
L.M (N=26)	2,3 $\pm$ 0,1*	5,9 $\pm$ 0,2	16,6 $\pm$ 0,4	92,1 $\pm$ 4,4	952,9 $\pm$ 26,2
L.HPC (N=10)	2,0 $\pm$ 0,1	7,4 $\pm$ 0,3*	17,2 $\pm$ 0,8	105,6 $\pm$ 6,6	1038,7 $\pm$ 26,2*

EPM = erro padrão da média

N = número de animais

* p < 0,05 em relação ao grupo "sham"

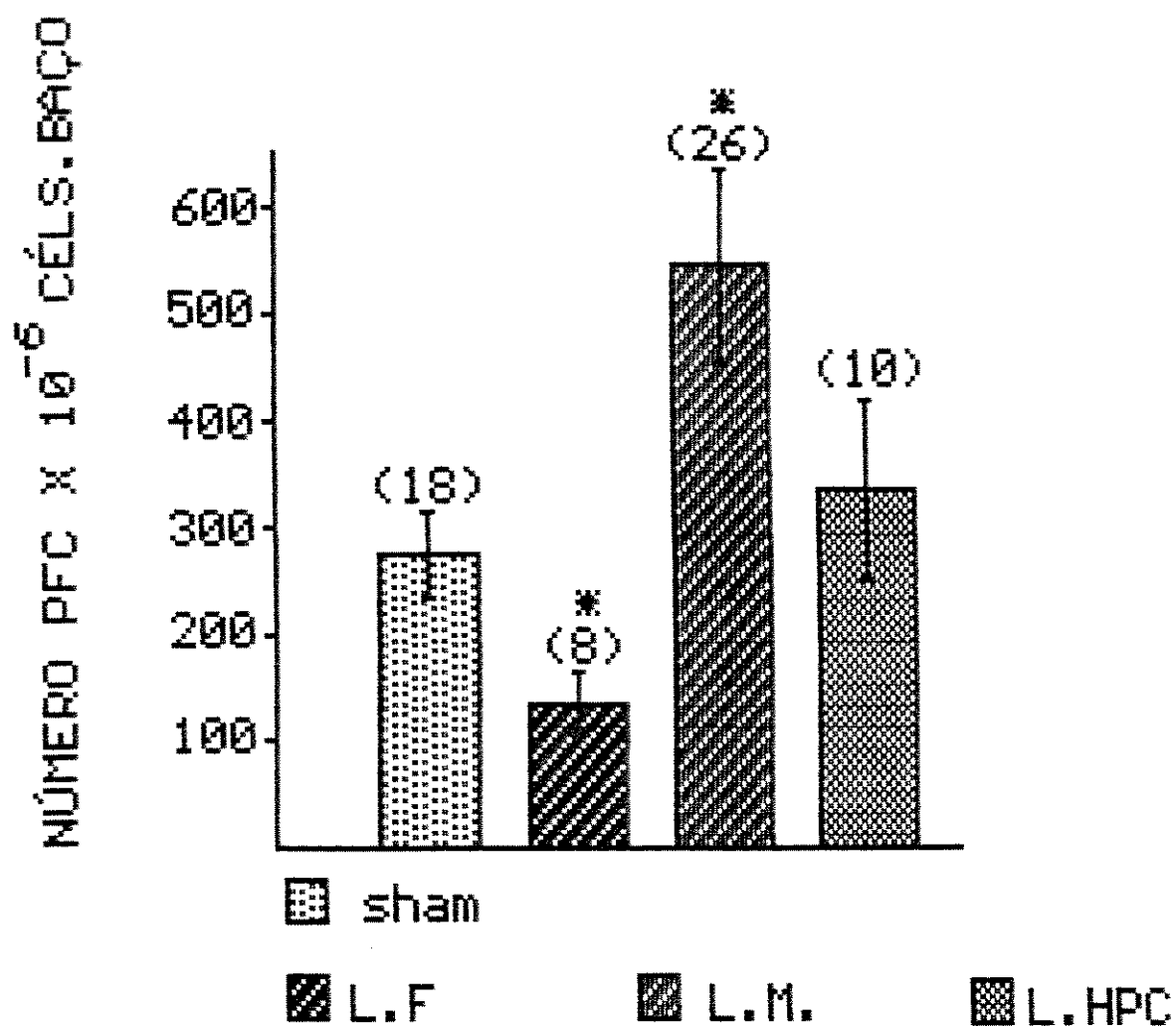


FIGURA 14 - Valores das médias $\pm$ EPM do número de células formadoras de placas ($\times 10^{-6}$ células de baço) dos grupos sham-operado e com lesão na fímbria hipocampal (L.F), em parte do hipocampo e parte da fímbria (L.M) e em parte do hipocampo (L.HPC), inoculados com hemácias de carneiro e sacrificados 5 dias após imunização.

* $p < 0,05$ em relação ao grupo sham

() número de animais

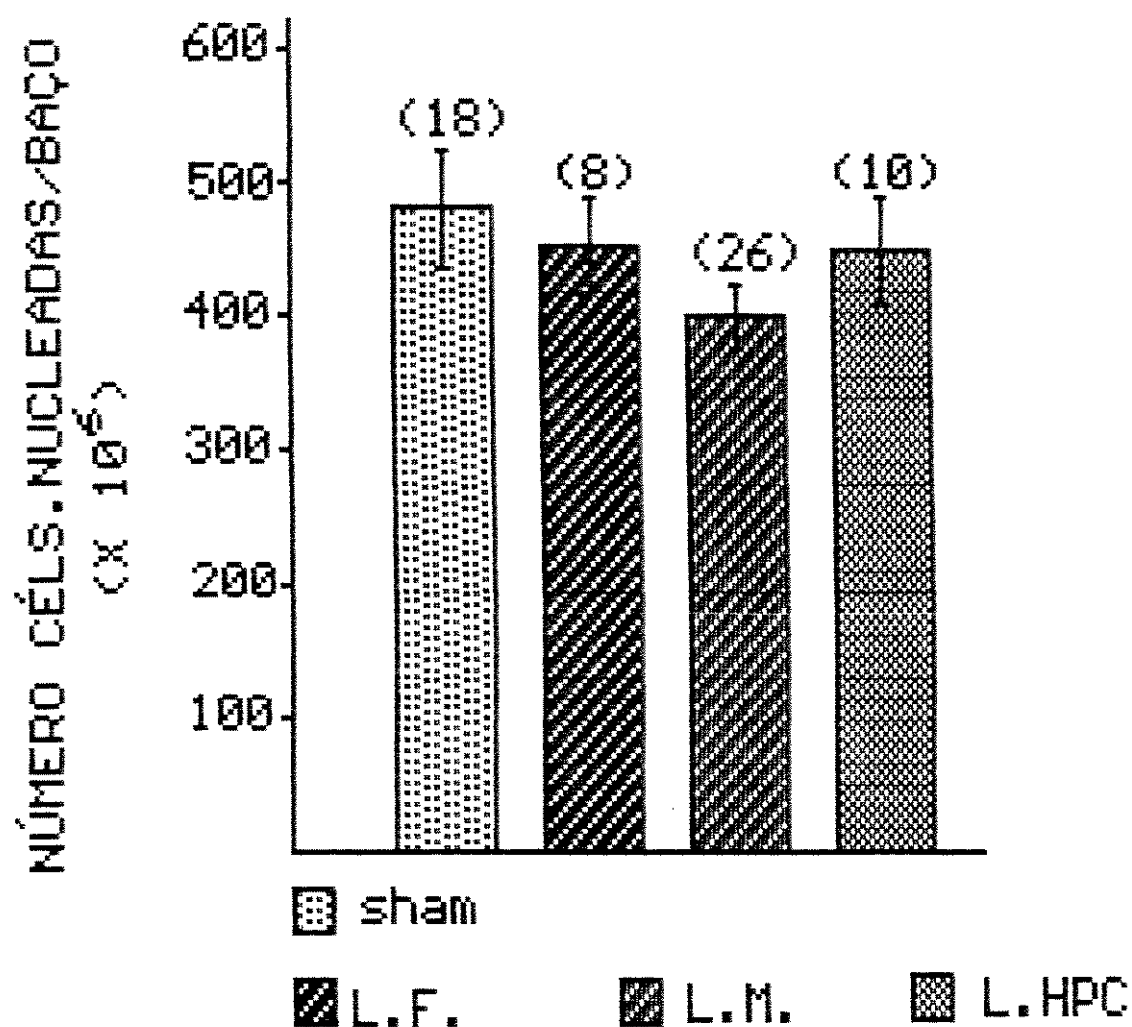


FIGURA 15 - Valores das médias $\pm$ EPM do número total de células por baço ($\times 10^6$) dos grupos sham-operado e com lesão na fímbria hipocampal (L.F), em parte do hipocampo e parte da fímbria (L.M) e em parte do hipocampo (L.HPC), inoculados com hemácias de carneiro e sacrificados 5 dias após imunização.

() número de animais

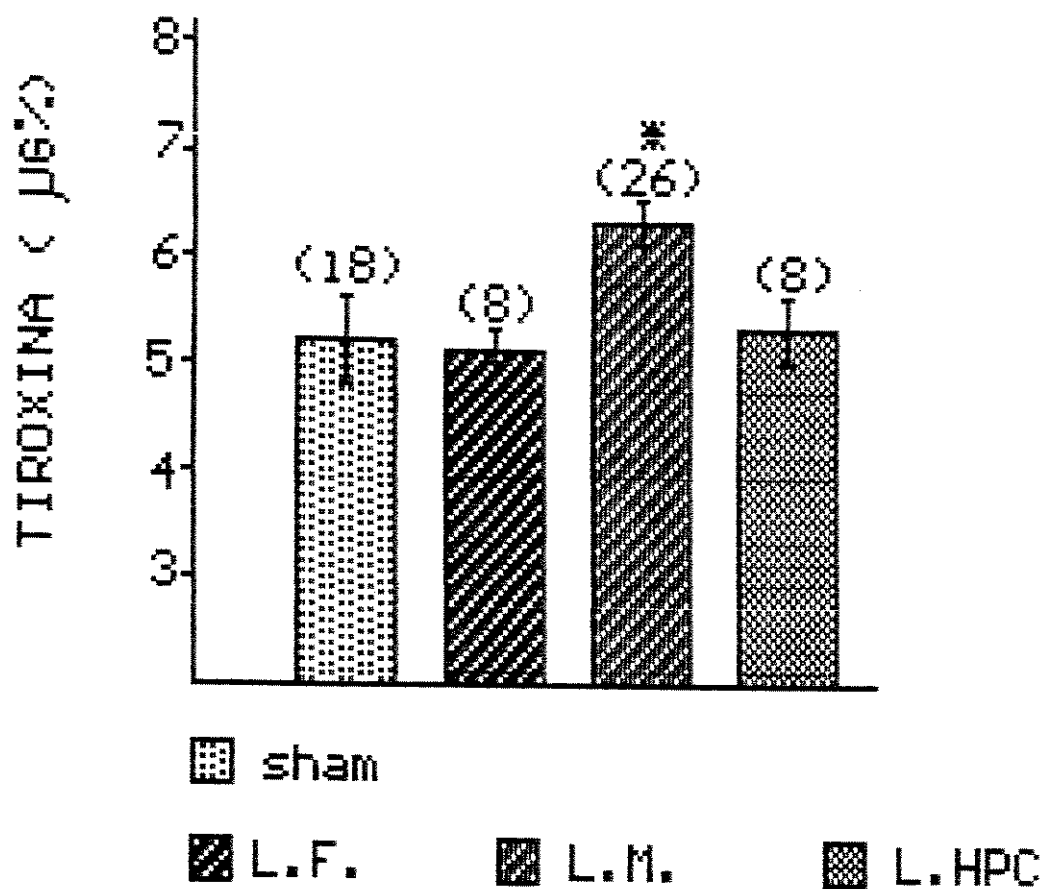


FIGURA 16 - Valores das médias $\pm$ EPM dos níveis de tiroxina sérica (ug%) dos grupos sham-operado e com lesão de fimbria hipocampal (L.F), em parte do hipocampo e parte da fimbria (L.M) e em parte do hipocampo (L.HPC), inoculados com hemácias de carneiro e sacrificados 5 dias após imunização.
 * $p < 0,05$ em relação ao grupo sham
 () número de animais

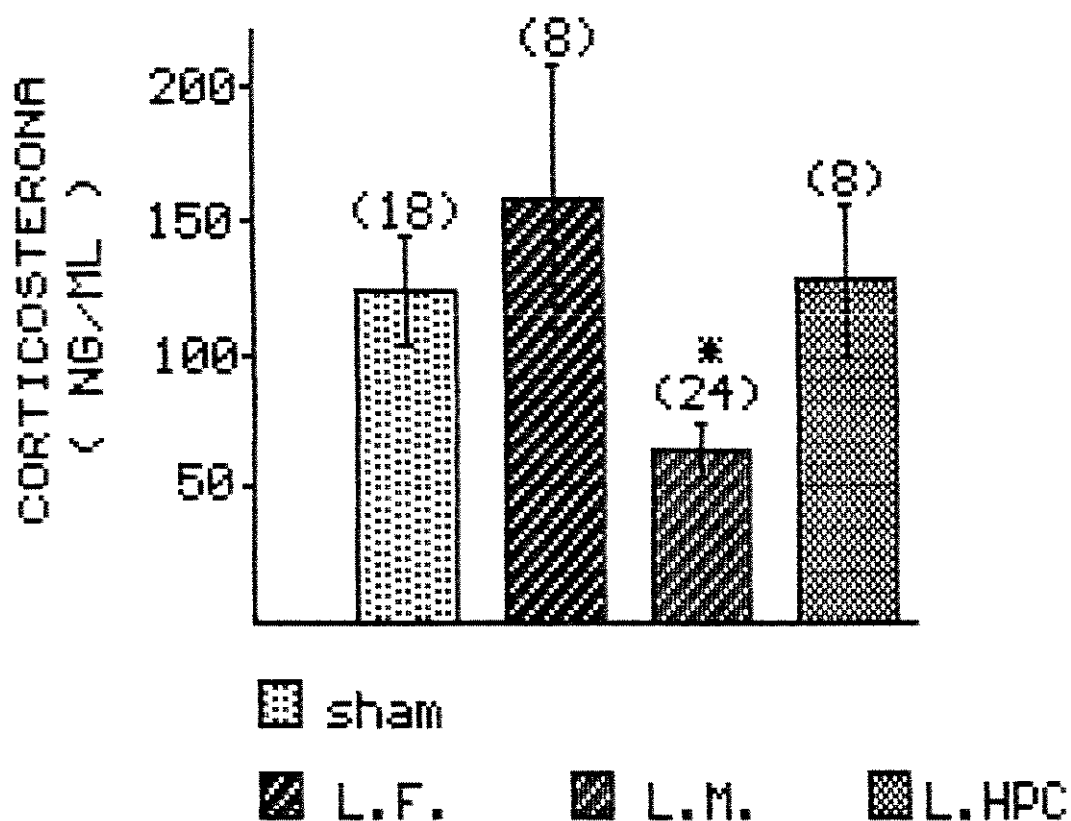


FIGURA 17 - Valores das médias $\pm$ EPM dos níveis de corticosterona sérica (ng/ml) dos grupos sham-operado e com lesão na fímbria hipocampal (L.F), em parte do hipocampo e parte da fímbria (L.M) e em parte do hipocampo (L.HPC), inoculados com hemácias de carneiro e sacrificados 5 dias após imunização.

* $p < 0,05$ em relação ao grupo sham

() número de animais

EXPERIMENTO V - EFEITO DA ADRENALECTOMIA NA RESPOSTA IMUNE PRIMÁRIA DE RATOS COM LESÕES NO COMPLEXO HIPOCAMPAL.

Os resultados do experimento anterior demonstraram claramente que algumas regiões do complexo hipocampal têm profunda influência na modulação da resposta imune. Como estas regiões são apontadas como as principais reguladoras do eixo adrenal, executamos a adrenalectomia em animais com lesões no complexo hipocampal, com o objetivo de demonstrar a importância do eixo adrenal nos efeitos alcançados com estas lesões.

1. **Análise da resposta imune primária:** A figura 18 representa o número de PFC $\times 10^{-6}$ células de baço dos ratos, que após serem lesados no complexo hipocampal, foram adrenalectomizados e, após 40 dias, receberam imunização com hemácias de carneiro, sendo, 5 dias depois, sacrificados.

Podemos observar que os dois grupos em questão obtiveram resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) dos seus grupos correspondentes sem adrenalectomia, embora estes resultados também sejam diferentes dos obtidos nos animais normais/adrenalectomizados com 40 dias de pós-operatório (figura 6).

2. **Análise do número total de células nucleadas por baço:** Analisando-se a figura 19, onde se acha

representado o número de células nucleadas por baço ($\times 10^6$) dos grupos em estudo, observamos que somente o grupo com lesão de fimbria/adrenalectomizado apresentou diminuição significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo com o mesmo tipo de lesão sem adrenalectomia.

3. Análise dos pesos de glândulas: Na tabela 5 encontram-se os pesos das glândulas (mg/100 g de peso corporal) destes grupos. Podemos observar que somente o timo dos animais com lesão de fimbria/adrenalectomizados apresentou-se diminuído ($p < 0,05$) em relação ao grupo com lesão de fimbria sem adrenalectomia. Não encontramos alterações significativas nos pesos das outras glândulas, comparando-se os grupos lesados com e sem adrenalectomia.

4. Análise das dosagens hormonais: A figura 20 apresenta os níveis de tiroxina ($\mu\text{g}\%$) dos grupos lesados/adrenalectomizados. Tanto o grupo com lesão de fimbria como o grupo com lesão mista, ambos adrenalectomizados, apresentaram diminuições significativas ($p < 0,05$) nos níveis de tiroxina, em relação aos grupos sem adrenalectomia.

A figura 21 demonstra os níveis de corticosterona (ng/ml) deste grupo em questão. Podemos observar níveis indosáveis de corticosterona nos animais adrenalectomizados ($p < 0.05$).

COMENTÁRIOS:

Comparando-se os resultados dos animais lesados no complexo hipocampal, com e sem adrenalectomia, observamos que a adrenalectomia aboliu o efeito da lesão na resposta imune primária (figura 18).

Os animais com lesão na fimbria hipocampal, que estavam com a resposta imune suprimida, após adrenalectomia tiveram sua resposta aumentada (figura 18) e diminuída em relação ao grupo normal/adrenalectomizado com 40 dias de pós-operatório (figura 6) e uma diminuição no número de células nucleadas por baço (figura 19). Este efeito foi alcançado pela diminuição dos níveis de tiroxina, que nos animais sem adrenalectomia estavam normais, e pela ausência de corticosterona (figuras 20 e 21). Além disso, a diminuição no peso do tимо parece demonstrar que este órgão também sofreu as influências destas mudanças hormonais ocorridas (tabela 5).

Já nos animais com lesão mista, que estavam com a resposta imune aumentada, após adrenalectomia, tiveram diminuição pronunciada nesta resposta (figura 18) e também, quando comparada com os animais normais/adrenalectomizados (figura 6). Mais uma vez, as diminuições nos níveis de tiroxina, que nos animais sem adrenalectomia estavam aumentados, bem como a ausência de corticosterona, parecem ter papel importante no efeito alcançado (figuras 20 e 21).

TABELA 5 - Valores das médias $\pm$ EPM dos pesos das glândulas: adeno-hipófise, tiróide, timo e testículos, expressos em mg/100 g de peso corporal, dos grupos lesados na fimbria hipocampal (L.F) e com lesão mista (L.M), com ou sem adrenalectomia (ADX), inoculados com hemácias de carneiro e sacrificados 5 dias após imunização.

GRUPOS	GLÂNDULAS (mg%)			
	A.HIPÓFISE	TIRÓIDE	TIMO	TESTÍCULOS
L.F (N=8)	1,8 $\pm$ 0,2	6,5 $\pm$ 0,4	116,8 $\pm$ 7,6	1036,8 $\pm$ 26,2
L.M. (N=26)	2,3 $\pm$ 0,1	5,9 $\pm$ 0,2	92,1 $\pm$ 4,4	952,9 $\pm$ 26,2
L.F/ADX (N=6)	2,1 $\pm$ 0,1	6,2 $\pm$ 0,5	76,2 $\pm$ 8,7*	995,9 $\pm$ 36,8
L.M/ADX (N=10)	2,1 $\pm$ 0,1	6,5 $\pm$ 0,3	95,1 $\pm$ 8,6	922,7 $\pm$ 30,1

EPM = erro padrão da média

N = número de animais

* p < 0.05 em relação ao grupo sem ADX

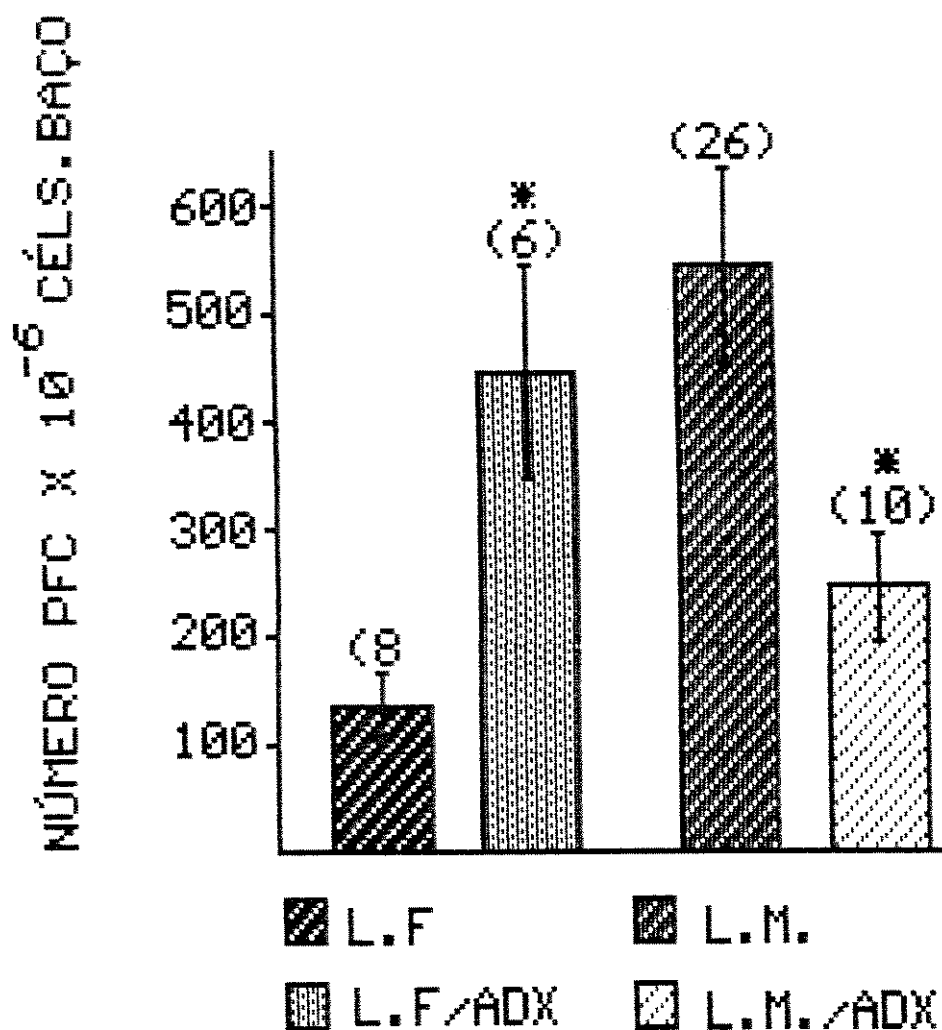


FIGURA 18 - Valores das médias $\pm$ EPM do número de células formadoras de placas ($\times 10^{-6}$ células do baço) dos grupos com lesão de fimbria hipocampal (L.F) e em parte do hipocampo e parte da fimbria (L.M), com ou sem adrenalectomia (ADX), inoculados com hemácias de carneiro e sacrificados 5 dias após imunização.

* $p < 0,05$ em relação ao grupo sem ADX

() número de animais

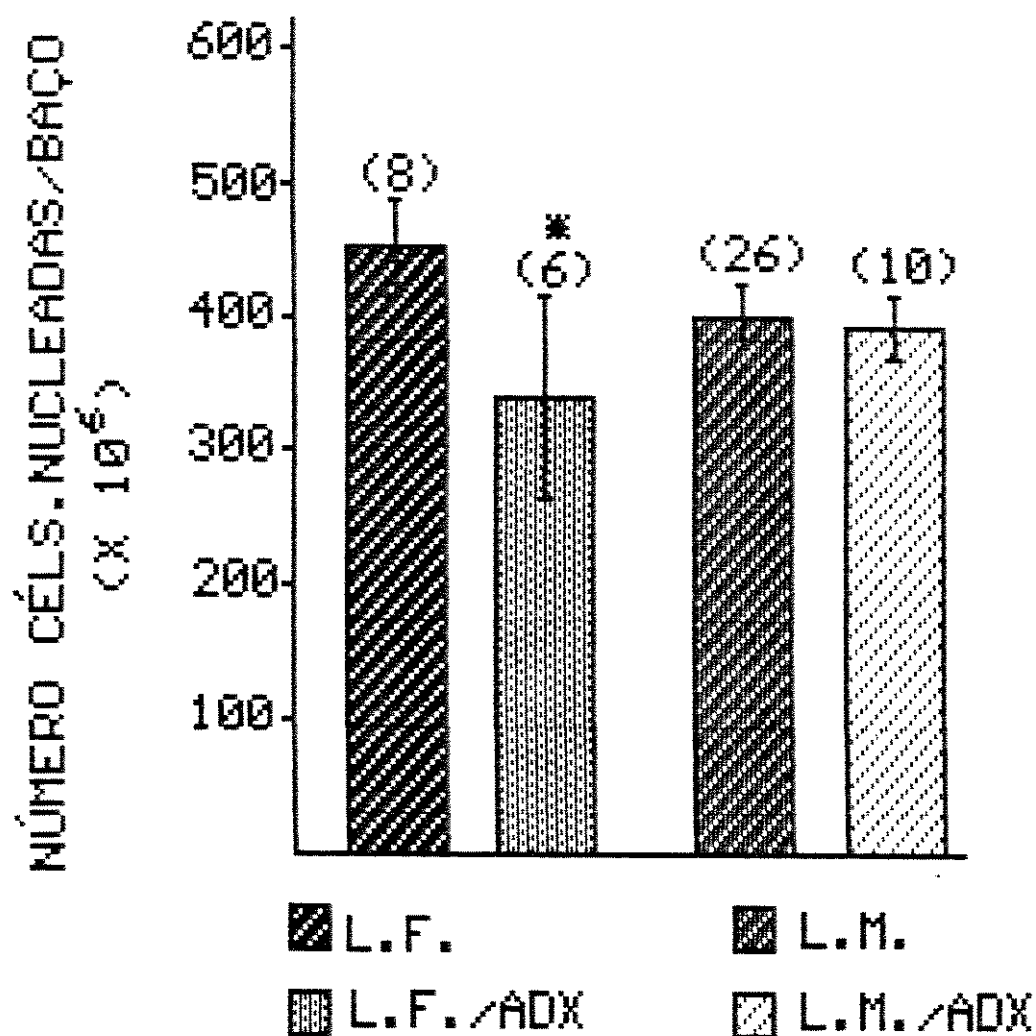


FIGURA 19 - Valores das médias $\pm$ EPM do número total de células nucleadas por baço ($\times 10^6$) dos grupos com lesão de fimbria hipocampal (L.F) e em parte do hipocampo e parte da fimbria (L.M), com ou sem adrenalectomia (ADX), inoculados com hemácias de carnerio e sacrificados 5 dias após imunização.

* $p < 0,05$ em relação ao grupo sem ADX

() número de animais

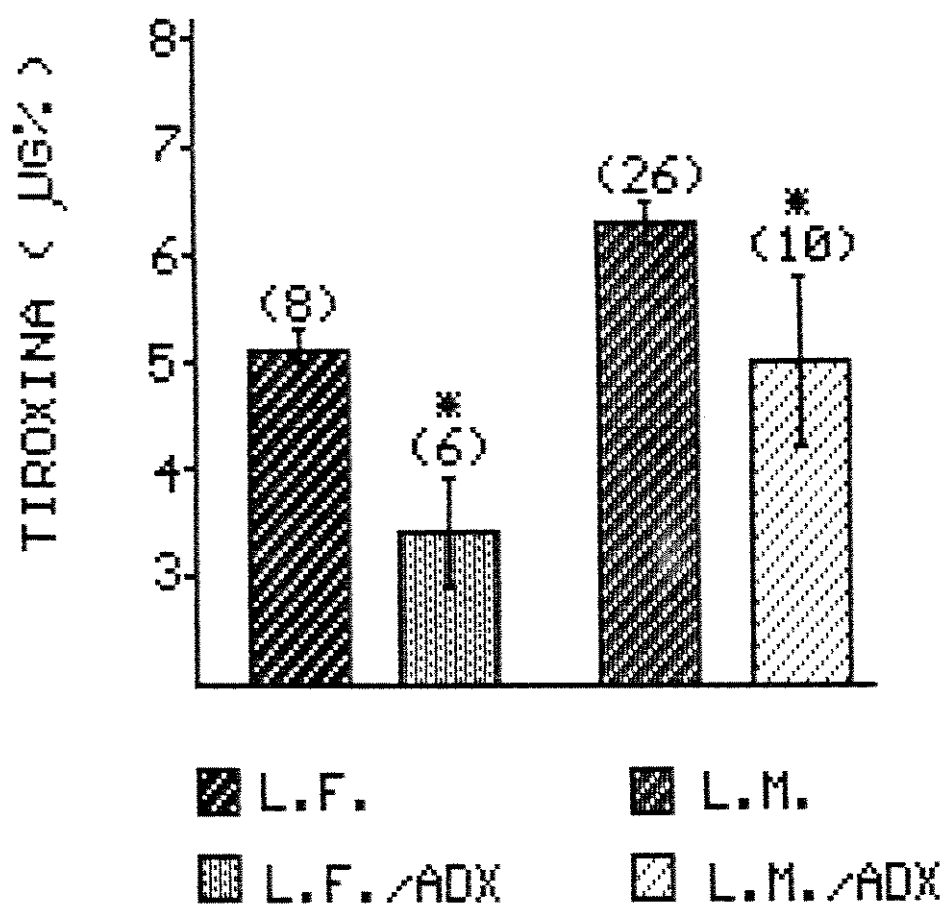


FIGURA 20 - Valores das médias $\pm$ EPM dos níveis de tiroxina sérica (ug%) dos grupos com lesão de fímbria hipocampal (L.F) e em parte do hipocampo e parte da fímbria (L.M), com ou sem adrenalectomia (ADX), inoculados com hemácias de carneiro e sacrificados 5 dias após imunização.

* $p < 0,05$ em relação ao grupo sem ADX

() número de animais

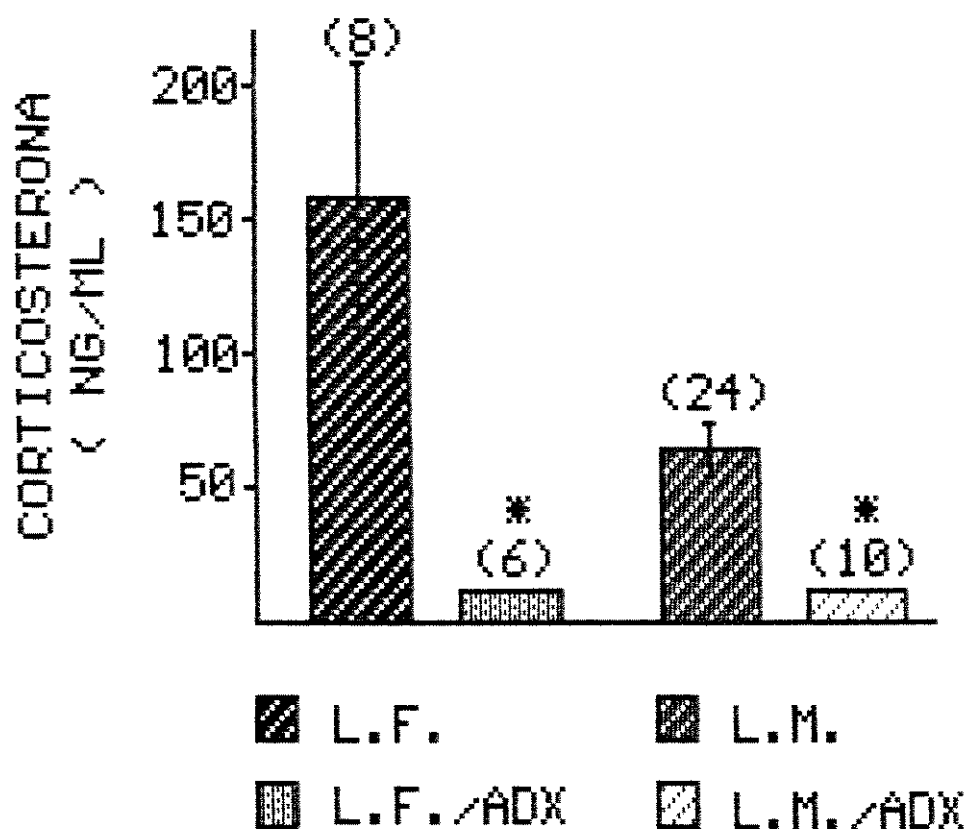


FIGURA 21 - Valores das médias $\pm$ EPM dos níveis de corticosterona sérica (ng/ml) dos grupos com lesão de fímbria hipocampal (L.F) e em parte do hipocampo e parte da fímbria (L.M), com ou sem adrenalectomia (ADX), inoculados com hemácias de carneiro e sacrificados 5 dias após imunização.

* $p < 0,05$ em relação ao grupo sem ADX

() número de animais

V. DISCUSSÃO

Inúmeras evidências demonstraram haver uma correlação entre os sistemas imune e neuroendócrino (BESEDOVSKY, DEL REY & SORKIN, 1985). Como o sistema neuroendócrino é regulado não só pela atividade do hipotálamo, mas também pela interação deste com estruturas extra-hipotalâmicas, como o complexo límbico, estudos sistemáticos estão sendo realizados neste laboratório com o intuito de investigar os efeitos de estruturas deste complexo sobre o sistema imune.

O presente trabalho, prosseguindo nesta linha de pesquisa, teve por finalidade analisar a importância da formação hipocampal na resposta imune primária de ratos, dentro da sequência experimental descrita.

I- ESTUDO DO GRUPO DE RATOS NORMAIS.

As primeiras investigações do envolvimento dos hormônios na resposta imune utilizaram a administração de hormônios, ablação ou bloqueio das glândulas endócrinas de animais experimentais, atestando a modulação do sistema imune pelo sistema endócrino (BESEDOVSKY et al, 1975). Entretanto, para melhor conhecimento da possibilidade que a resposta imune por si levaria a mudanças nos níveis hormonais, do mesmo modo que BESEDOVSKY et al (1975), tornou-se necessário a realização deste estudo, para melhor conhecimento dos animais a serem utilizados ao longo das fases experimentais.

Os resultados obtidos neste experimento diferem discretamente dos resultados de BESEDOVSKY et al (1975), que demonstraram o pico de IgM-PFC anti-hemácias de carneiro no 5º e 7º dias após imunização. Em concordância com nossos resultados, o nível máximo de corticosterona foi alcançado juntamente com início do pico da resposta imune e a maior concentração de tiroxina precedeu a resposta imune, embora tenha seus valores diminuídos durante a manutenção do pico da resposta.

Assim, o aumento nos níveis de corticosterona teria como finalidade o controle da expansão do processo imune desencadeado pela introdução de um antígeno (BESEDOVSKY & SORKIN, 1977), já que este hormônio tem papel bem definido na supressão dos diferentes tipos celulares envolvidos nos eventos da resposta imune, como macrófagos (SNYDER & UNANUE, 1982), linfócitos T (ALTMAN & ROSENTREICH, 1975 e GILLIS, CRABTREE & SMITH, 1979) e linfócitos B (CUPPS et al, 1985).

A tiroxina, por sua vez, teria importante papel na regeneração do tecido linfóide (WHITE, 1970), impedindo que o processo imune cause danos a estes tecidos, principalmente em associação com o GH (PIERPAOLI et al, 1969). Como observamos diminuição da adeno-hipófise no 5º dia (tabela 1) e, portanto, uma possível diminuição na produção de GH, a tiroxina por si só não poderia regenerar o timo, que após o pico da resposta imune se encontrou diminuído (tabela 1).

Portanto, nesta fase experimental, além de determinarmos as características dos nossos animais, mostramos, de acordo com a literatura, que durante a resposta imune ocorrem mudanças hormonais que podem regular, por um mecanismo de retroalimentação, a duração e, possivelmente, até a amplitude da resposta imune (BESEDOVSKY et al, 1975).

II- EFEITO DA ADRENALECTOMIA SOBRE A RESPOSTA IMUNE PRIMÁRIA DE RATOS.

A relação entre glândulas adrenais e tecido linfático foi primeiramente reconhecida por THOMAS ADDISON (1855), que descreveu hiperplasia do sistema linfóide em pacientes com insuficiência adrenal. Depois, com o isolamento dos hormônios adrenais, SELYE (1946) demonstrou seu efeito lítico sobre o tecido linfóide. Inúmeros estudos foram realizados para se analisar o efeito do tratamento com corticosteróides sobre a distribuição e função das células imunocompetentes (DOUGHERTY, 1952), principalmente porque a secreção de corticosteróides tem sido considerada como um dos mecanismos de modulação da imunidade induzida pelo estresse. (STEIN, KELLER & SCHLEIFER, 1985), isto é, o aumento da atividade adrenal suprime diferentes eventos da imunidade, aumentando a susceptibilidade a doenças (KELLER et al, 1983).

Já os efeitos da adrenalectomia sobre o sistema imune têm sido pouco estudados, embora pesquisas

realizadas em camundongos e ratos tenham demonstrado alterações na proliferação dos tecidos linfóides, incluindo o timo, que mostrou aumento da atividade mitótica após adrenalectomia (DOUGHERTY, 1960). Além disso FLOWER et al (1986) demonstraram a ocorrência de um aumento pronunciado na resposta inflamatória em ratos adrenalectomizados, aumento este que poderia ser prevenido através do tratamento com glicocorticóides.

Vários trabalhos utilizam-se da adrenalectomia para estudo do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Após adrenalectomia, foi observado aumento de síntese e secreção de ACTH pela adeno-hipófise (BUCKINGHAM & HODGES, 1974 e LEVIN, SHINSAKO & DALLMAN, 1988) e elevação temporal nos níveis de receptores para corticosterona no hipocampo (MAC EWEN, KLOST & ROSTENE, 1986). Mas, de fundamental importância, é a significativa diminuição de corticosterona circulante após algumas horas da adrenalectomia (BUCKINGHAM & HODGES, 1974 ; KELLER et al, 1983 e DAMASCO & PEDRAZZINI, 1985), que pode ser restabelecida com a administração de corticosteróides.

Em nosso experimento, utilizando-nos do modelo clássico de adrenalectomia, demonstramos que a ablação cirúrgica das glândulas adrenais causa alterações no curso da resposta imune .

ROCHA (1985) descreveu depleção celular dos tecidos linfóides em camundongos, induzida pela adrenalectomia, que, após 2 meses de pós-operatório, foi

compensada por hipertrofia -em concordância com os resultados de DOUGHERTY (1952)- bem como aumento das diferentes populações celulares do timo. Embora não tenhamos observado alterações no peso do timo dos animais adrenalectomizados, seus órgãos linfóides possivelmente se tornaram mais aptos a reconhecer e responder com maior intensidade à presença de um antígeno.

Estes efeitos foram alcançados como consequência da ausência de corticosterona circulante, embora tenhamos observado um aumento deste hormônio -em relação ao animal inoculado com solução salina fisiológica (figura 9)- quando o animal adrenalectomizado foi estimulado com um. Este curioso aumento se deve, possivelmente, ao fato de existirem glândulas adrenais acessórias, descritas em ratos, especialmente adultos, que sobreviveram à adrenalectomia bilateral, através da hipertrofia compensatória de um tecido extra-adrenal, localizado em sua maior parte no tecido adiposo peri-adrenal e peri-renal e no retroperitoneo (WEISZ, HORVATH & KADAS, 1959).

O aumento no peso da adeno-hipófise dos animais adrenalectomizados (tabela 2) pode indicar ou um aumento de síntese hormonal, ou uma consequência do fenômeno "rebote" descrito por ROCHA (1985). Observamos também, uma profunda alteração no eixo tireoidiano, caracterizada pela diminuição de tiroxina circulante (figura 8) e diminuição do peso da tiróide (tabela 2).

Todas estas mudanças têm a finalidade de manter a homeostasia do animal, que foi desequilibrada pela retirada de glândulas de suma importância para o organismo, assim como pela introdução de um antígeno em seu meio interno.

III- EFEITO DA "SHAM"-CIRURGIA NO COMPLEXO HIPOCAMPAL SOBRE A RESPOSTA IMUNE PRIMÁRIA DE RATOS.

Este experimento foi realizado com o objetivo de analisar se a manipulação, o estresse cirúrgico e o trauma mecânico, causado pela simples introdução do eletrodo no sistema nervoso central, não desencadeariam desarranjos funcionais significativos.

ROCHA (1985) demonstrou que o estresse cirúrgico, ou simplesmente a anestesia, em camundongos, induz depleção de linfócitos no linfonodo e baço, timócitos imaturos e células não-T não-B na medula óssea. Estes efeitos foram máximos nas primeiras 24-48 hs após o estresse, sendo que um período de 1-3 semanas de pós-operatório foi necessário para plena recuperação das populações de células linfóides.

FORNI (1984) demonstrou também que camundongos "sham"-operados, com lesões cerebrais não-específicas ou com lesão hipotalâmica, apresentaram diminuição da atividade NK após 7 dias de cirurgia. Os camundongos "sham"-operados, e aqueles com lesão não-específica, retornaram a níveis semelhantes aos dos animais

controles não-tratados após 2 e 3 semanas respectivamente, enquanto que a mudança persistiu nos camundongos com lesão hipotalâmica.

Estes dados da literatura, juntamente com resultados obtidos de grupos pilotos, nos levaram a utilizar o período de 25-30 dias de pós-operatório nos animais submetidos à lesão estereotáxica.

Os resultados obtidos neste experimento demonstraram ser, de extrema importância, a manutenção da resposta imune primária (figura 10), bem como dos níveis de corticosterona (figura 13) -em concordância com resultados de "sham"-estimulação (DUNN & ORR, 1984) e "sham"-cirurgia em gatos (FENDLER, KARMOS & TELEGDY, 1961)- fato esse que nos permitiu utilizar este grupo como controle dos grupos lesados dos experimentos posteriores.

IV- EFEITO DE LESÕES NO COMPLEXO HIPOCAMPAL NA RESPOSTA IMUNE PRIMÁRIA DE RATOS.

Baseado em diversas observações, pode-se enfatizar que a neuroimunomodulação é, pelo menos parcialmente, mediada por mudanças na concentração de hormônios circulantes que podem efetuar alterações na função intrínseca de linfócitos, interagindo com receptores específicos de membrana (WEIGENT & BLALOCK, 1987). Em contraposição, CROSS et al (1980 e 1984) tem mostrado que lesões no hipotálamo anterior causam diminuições nas respostas de linfócitos e na atividade NK, não estando estes

efeitos relacionados à mudanças nos níveis de corticosterona circulantes, embora estes experimentos tenham sido realizados no período em que os animais ainda estavam sob influência do estresse cirúrgico.

No entanto, a ablação de núcleos límbicos específicos pode resultar em suficientes mudanças na concentração de hormônios, alterando, conseqüentemente, a resposta imune.

Várias estruturas límbicas são áreas integradas que têm a capacidade de facilitar ou inibir liberação de ACTH, dependendo da fonte primária de estimulação, do estado da atividade hormonal endógena e das áreas da citoarquitetura que estão sendo ativadas (DUNN & ORR, 1984).

Inúmeros estudos, utilizando-se do modelo de hipocampectomia total por sucção, demonstraram ser o hipocampo responsável pelo elemento inibidor da atividade hipófise-adrenal, pois esta cirurgia causou aumento significativo nos níveis de corticóides circulantes (KNIGGE & HAYS, 1963 e WILSON et al, 1980). Em vista de que este efeito foi alcançado 1 a 3 meses após a operação, pôde-se concluir que sua ação inibitória é tônica e não é compensada neste período por outras estruturas (FELDMAN & CONFORTI, 1980).

FELDMAN et al (1980) demonstraram também que a hipocampectomia dorsal ou ventral não alteraram os níveis basais de corticosterona plasmática, embora a resposta de

corticosterona ao estresse e à administração de dexametasona tenham sido alteradas na hipocampectomia dorsal.

Além do eixo adrenal, a estimulação do complexo hipocampal em cães, causou aumento significativo da atividade tiroídiana, via liberação de TSH, prevenida pela hipofisectomia (SHIZUME et al, 1962).

Como consequência destas alterações hormonais, lesões do hipocampo causaram aumento no número e na atividade blastogênica de linfócitos esplênicos e tímicos, mediada por hormônios da hipófise, pois a hipofisectomia reverteu estas alterações (CROSS et al, 1982).

Além disso, lesões com ácido kainícico na área hipocampal, produziram uma mudança na função imune, caracterizada pela facilitação da produção de IgG e IgM e redução dos títulos de IgA, 2 a 5 semanas após a cirurgia e possivelmente até por mais tempo (NANCE & RAYSON, 1987).

Entretanto, sabendo-se das diferenças estruturais e funcionais das áreas do complexo hipocampal (MEIBACH & SIEGEL, 1977), e como não se encontrou na literatura dados correlacionando estas áreas com suas respectivas influências na neuroimunomodulação, realizamos este experimento com a finalidade de demonstrar tal correlação. Os dados do presente estudo nos revelaram portanto, que os efeitos da neuroimunomodulação, na função de linfócitos esplênicos, variam de acordo com a área do complexo hipocampal que foi lesada.

A interrupção da principal via emergente do complexo hipocampal, a fímbria hipocampal, que modula diferentes núcleos hipotalâmicos, acarretou uma diminuição na resposta imune humoral (figura 14).

Os níveis de corticosterona obtidos destes animais (figura 17) estão em concordância com o estudo realizado por FELDMAN & CONFORTI (1980), autores esses que também demonstraram que a secção da fímbria hipocampal não causa alterações nos níveis de corticosterona.

Portanto, esta supressão da resposta imune pode ser devida a fatores como opióides endógenos ou sistema neurovegetativo simpático/parassimpático. É bem conhecida uma ligação neuroanatômica entre sistema nervoso central e tecidos imunocompetentes, demonstrada pela presença de fibras simpáticas e pela liberação de noradrenalina no baço, que pode ser a responsável por efeitos supressores na resposta imune (BESEDOVSKY et al, 1979 e FELTEN, et al, 1987).

Já na lesão mista, que atingiu parte do hipocampo (parte das porções CA2 e CA3) e parte da fímbria hipocampal, houve um aumento da resposta imune (figura 14), concomitantemente a alterações hormonais significativas.

Portanto, esta pequena região lesada pode ter importância para a manutenção dos fenômenos descritos na literatura. Nela pode estar contido o componente inibidor da atividade do eixo hipófise-adrenal (KNIGGE & HAYS, 1963) e a lesão incompleta da área pode ter causado um efeito

estimulatório local, resultando na diminuição de corticosterona circulante (figura 17). Além disso, pode estar havendo o mesmo efeito no eixo hipófise-tiróide, pois como foi descrito por SHIZUME et al (1962), a estimulação do complexo hipocampal de cães causou um aumento da atividade tiroidiana.

Já a lesão parcial de hipocampo (parte do campo CA1) não causou alterações significativas em nenhum dos parâmetros fisiológicos estudados, demonstrando que esta região não tem papel importante na neuroimunomodulação.

Desta maneira, podemos concluir que o complexo hipocampal demonstrou ter importante papel na neuroimunomodulação, embora cada estrutura que o compõe contribua de forma diferente neste processo.

V- EFEITO DA ADRENALECTOMIA NA RESPOSTA IMUNE PRIMÁRIA EM RATOS COM LESÕES NO COMPLEXO HIPOCAMPAL.

Como já descrevemos anteriormente, o complexo hipocampal é responsável pela regulação de vários eixos glandulares -ao modular os diferentes núcleos hipotalâmicos (RAISMAN & FIELD, 1971)- e, em particular, o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (DALLMAN et al, 1987), e que funciona como componente inibidor deste eixo (KNIGGE & HAYS, 1963 e WILSON et al, 1980).

Após a conclusão do experimento anterior, onde demonstramos a influência do complexo hipocampal sobre

a resposta imune primária, desejávamos evidenciar o papel das glândulas adrenais nos efeitos observados.

Através dos resultados deste experimento, podemos concluir que, embora a adrenalectomia altere a resposta imune primária de linfócitos esplênicos de ratos (figura 6), ela reverteu a diminuição da resposta observada em ratos com lesões na fimbria hipocampal, bem como o aumento em ratos com lesão mista (figura 18).

Portanto, uma adrenal intacta é necessária para a manutenção da resposta imune primária em ratos com lesões no complexo hipocampal. Além disso, parte destes efeitos podem ter sido obtidos pela alteração do eixo tireoidiano, que apresentou diminuição nos níveis circulantes de tiroxina (figura 20), embora este dado isolado não explique completamente os resultados observados.

Os resultados deste estudo revelam que os efeitos da neuroimunomodulação variam de acordo com a área do complexo hipocampal lesada, que é parcialmente abolida pela adrenalectomia, indicando que estes efeitos são mediados, pelo menos em parte, por hormônios oriundos das glândulas adrenais, além dos hormônios tireoidianos e também da influência do sistema nervoso simpático.

VI. SUMÁRIO E CONCLUSÕES

Este trabalho teve por objetivo investigar a importância do complexo hipocampal na resposta imune primária de ratos.

Os resultados obtidos na sequência experimental descrita permitem as seguintes conclusões:

1. Durante a resposta imune primária de ratos, frente um antígeno particulado T-dependente, ocorrem mudanças hormonais significativas, caracterizadas pelos aumentos de corticosterona e tiroxina circulantes. Estas modificações podem ter como finalidade a regulação, por um mecanismo de retroalimentação, da duração e, possivelmente, até da amplitude da resposta imune.

2. A ablação cirúrgica das glândulas adrenais causou profundas alterações no curso da resposta imune, ou seja, a ausência de corticosterona circulante causou um aumento de IgM-PFC anti-hemácias de carneiro 30 e 40 dias após adrenalectomia. Além disso, foram observadas mudanças em outros eixos hormonais (tiroxina e possivelmente hormônios adeno-hipofisários), que podem ter a finalidade de manter a homeostasia do animal, quebrada pela ausência destas glândulas e pela introdução de um antígeno no organismo.

3. Os animais submetidos a sham-cirurgia tiveram resposta imune semelhante aos normais, embora tenhamos observado alterações na celularidade do baço, níveis de tiroxina e pesos de glândulas, possivelmente devido ao estresse cirúrgico. Entretanto, os níveis de

corticosterona se mantiveram normais, o que nos permitiu utilizar este grupo como controle dos grupos lesados.

4. O complexo hipocampal demonstrou ter profunda influência na neuroimunomodulação da função de linfócitos esplênicos, embora cada estrutura que o compõe contribua de forma diferente. Ratos com lesão de fímbria hipocampal tiveram sua resposta imune suprimida, possivelmente devido a fatores como opióides endógenos ou sistema neurovegetativo simpático/parassimpático, já que os níveis de corticosterona e tiroxina se mantiveram semelhantes ao controle. Aqueles com lesão mista, atingindo parte do hipocampo (porções CA2 e CA3) e parte da fímbria hipocampal, apresentaram aumento da resposta imune como efeito resultante da diminuição de corticosterona e aumento de tiroxina . Já aqueles com lesão parcial de hipocampo (porção CA1) não apresentaram alterações significativas nos parâmetros fisiológicos observados.

5. Embora a adrenalectomia altere a resposta imune primária de ratos, ela reverteu parcialmente a diminuição da resposta observada em ratos com lesão de fímbria hipocampal e o aumento em ratos com lesão mista, demonstrando que parte dos efeitos que as lesões causaram na resposta imune foi devido a hormônios oriundos das glândulas adrenais.

Os resultados obtidos, analisados em conjunto, coincidem com estudos descritos na literatura sobre a comunicação bidirecional entre os sistemas imune e neuroendócrino e com a existência de estruturas extra-hipotalâmicas que interferem nesta rede de interações.

Portanto, podemos concluir que as diferentes regiões dentro do complexo hipocampal têm diversos graus de importância na neuroimunomodulação. Os efeitos desta interação mostraram ser, pelo menos em parte, mediados por hormônios provenientes das glândulas adrenais, não descartando, no entanto, a influência de outros eixos glandulares, assim como a do sistema nervoso simpático.

VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDISON, T. - On The constitutional and local effects of diseases of the supra-renal capsules. London, Highley (1855).

BERCZI, I.; NAGY, E.; KOVACS, K. & HORVATH, E. - Regulation of humoral immunity in rats by pituitary hormones. **Acta Endocrinol. 98: 506-513 (1981).**

BESEDOVSKY, H.; DEL REY, A. & SORKIN, E. - Immune-neuroendocrine interations. **J. Immunol. 135: 750s-754s (1985).**

BESEDOVSKY, H.; DEL REY, A.; SORKIN, E.; DA PRADA, M.; BURRI, R. & HONEGGER, C. - The immune response evokes changes in brain noradrenergic neurons. **Science 221: 564-565 (1983).**

BESEDOVSKY, H.; DEL REY, A.; SORKIN, E.; DA PRADA, M. & KELLER, H.H. - Immunoregulation mediated by the sympathetic nervous system. **Cell. Immunol. 48: 346-355 (1979).**

BESEDOVSKY, H.; DEL REY, A.; SORKIN, E. & DINARELLO, C.A. - Immunoregulatory feedback between Interleukin-1 and glucocorticoid hormones. **Science 233: 632-634 (1986).**

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. 56: 622-628 (1985).**

BESEDOVSKY, H. & SORKIN, E. - Network of immune-neuroendocrine interactions.

Clin. Exp. Immunol. 27: 1-12 (1977).

BESEDOVSKY, H.; SORKIN, E.; FELIX, D. & HAAS, H. - Hypothalamic changes during the immune response.

Eur. J. Immunol. 7: 323-325 (1977).

BESEDOVSKY, H.; SORKIN, E.; KELLER, M. & MÜLLER, J.- Changes in blood hormone levels during the immune response.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 150: 466-470 (1975).

BLALOCK, J.E.; HARBOUR-McMENAMIN, D. & SMITH, E.M. - Peptide hormones shared by the neuroendocrine and immunologic systems.

J. Immunol. 135: 858s-861s (1985).

BUCKINGHAM, J.C. & HODGES, J.R. - Interrelationships of pituitary and plasma corticosterone in adrenalectomized and stressed, adrenalectomized rats.

J. Endocr. 63: 213-222 (1974).

CLAMAN, H.N. - How corticosteroids work.

J. Allergy and Clin. Immunol. 55: 145-151 (1975).

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).

CROSS, R.J.; BROOKS, W.H.; ROSZMAN, T.L. & MARKESBERY, W.R. - Hypothalamic - immune interactions: Effect of hypophysectomy on neuroimmunomodulation.

J. Neur. Sci. 53: 557-566 (1982).

- CROSS, R.J.; MARKESBERY, W.R.; BROOKS, W.H. & ROSZMAN, T.L. - Hypothalamic - immune interactions: Neuromodulation of NK activity by lesioning of the anterior hypothalamus. *Immunol.* 51: 399-405 (1984).
- CUPPS, T.R.; GERRARD, T.L.; FALKOFF, R.J.M.; WHALEN, G. & FAUCI, A.S. - Effects on in vitro corticosteroids on B cell activation, proliferation and differentiation. *J. Clin. Investigation* 75: 754-761 (1985).
- DALLMAN, M.F.; AKANA, S.F.; CASCIO, C.S.; DARLINGTON, D.N.; JACOBSON, L. & LEVIN, N. - Regulation of ACTH secretion: variations on a theme of B. *Recent Progress in Hormones Res.* 43: 113-173 (1987).
- DAMASCO, M.C. & PEDRAZZINI, M.E.J.C. - Corticosterone secretion by rats after adrenalectomy. *Acta. Physiol. Latinoam.* 35: 415-417 (1985).
- DE GROOT, J. - The rat forebrain in stereotaxic coordinates. *Trans. Royal Neth. Acad. Sci.* 52(4): 1-40 (1959).
- DEL REY, A.; BESEDOVSKY, H.; SORKIN, E.; DA PRADA, M. & ARRENBRECHT, S.. - Immunoregulation mediated by the sympathetic nervous system, II. *Cell. Immunol.* 63: 329-334 (1981).
- DOUGHERTY, T.F. - Effect of hormones on lymphatic tissue. *Physiol. Rev.* 32(4): 379-402 (1952).
- DOUGHERTY, T.F. - In The lymphocyte and lymphocytic tissue. p 112. Ed. Reduck, J.W.. New York, Hoeber (1960).

DUNN, J.D. & ORR, S.E. - Differential plasma corticosterone responses to hippocampal stimulation.

Exp. Brain Res. 54: 1-6 (1984).

FAUCI, A.S. - Mechanisms of corticosteroid action on lymphocyte subpopulations. I- Redistribution of circulation T and B lymphocytes to the bone marrow.

Immunol. 28:669-679 (1975).

FELDMAN, S. & CONFORTI, N. - Participation of the dorsal Hippocampus in the glucocorticoid feedback effect on adrenocortical activity.

Neuroendocrinology 30: 52-55 (1980).

FELTEN, D.L.; FELTEN, S.Y.; CARLSON, S.L.; OLSCHOWKA, J.A. & LIVNAT, S. - Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue.

J. Immunol. 135(2):755s-765s (1985).

FELTEN, D.L.; FELTEN, S.Y.; BELLINGER, D.L.; CARLSON, S.L.; ACKERMAN, K.D.; MADDEN, K.S.; OLSCHOWKI, J.A. & LIVNAT, S.- Noradrenergic sympathetic neural interactions with the immune system: structure and function.

Immunol. Rev. 100: 225-260 (1987).

FENDLER, K.; KARMOS, G. & TELEGDY, G. - The effect of hippocampal lesion on pituitary-adrenal function.

Acta. Physiol. Hung. 20: 283-297 (1961).

FILATEROV, A.A. & FILATEROVA, L.P. - Role of the paraventricular and ventromedial hypothalamic nuclear areas in the regulation of the pituitary-adrenocortical system.

Brain Res. 342: 135-140 (1985).

FLOWER, R.J.; PARENTE, L.; PERSICO, P. & SALMON, J.A. - A comparison of the acute inflammatory response in adrenalectomized and sham-operated rats.

Br. J. Pharmac. 87: 57-62 (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. Rev. 18(4): 491-499 (1984).

GILLIS, S.; CRABTREE, G.R. & SMITH, K.A. - Glucocorticoid-induced inhibition of T cell growth factor production. I - The effect on mitogen - induced lymphocyte proliferation.

J. Immunol. 123(4): 1624-1631 (1979).

GROSSMAN, C.J. - Interactions between the gonadal steroids and the immune system.

Science 227: 257-260 (1985).

GUNN, A.; LANCE, E.M.; MEDAWAR, P.B. & NEHLSSEN, S.L. - In hormones and the immune response. Ciba Foundation Study Group n° 36 (Ed by Wolstenholme & Knight) Churchill, London (1970) pag. 68.

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-811s (1985).

HORST, H.J. & FLAD, H.D. - Corticosteroid-Interleukin 2
interactions: inhibition of binding of IL-2 to IL-2
receptors.

Clin. Exp. Immunol. 68: 156-161 (1987).

ISAACSON, R.L. & PRIBRAM, K.H. - The Hippocampus, vol. 2
Neurophysiology and Behaviour (Plenum Press) New York,
N.Y. (1975) pag.415.

ISAKOVIC, K. & JANKOVIC, B.D. - Neuro-endocrine correlates
of immune response. II- Changes in the Lymphatic organs
of brain-lesioned rats.

Int. Arch. Allergy 45: 373-384 (1973).

JANKOVIC, B.D. & ISAKOVIC, K. - Neuro-endocrine correlates
of immune response. I- Effects of brain lesions on
antibody production, Arthus reactivity and delayed
hypersensitivity in the rat.

Int. Arch. Allergy 45: 360-372 (1973).

JERNE, N.K. & NORDIN, A.A. - Plaque formation in agar by
single antibody-producing cells.

Science 140:405 (1963).

- JOHNSON, H.M. & TORRES, B.A. - Regulation of lymphokine production by Arginine, Vasopressin and Oxytocin: Modulation of lymphocyte function by neurohypophyseal hormones.
J. Immunol. 135(2): 773s-775s (1985).
- KELLER, S.E.; WEISZ, J.M.; SCHLEIFER, S.J.; MILLER, N.E. & STEIN, M. - Stress-induced suppression of immunity in adrenalectomized rats.
Science 221: 1301-1304 (1983).
- KIESS, W.; HOLTMANN, H.; BUTENANDT, D. & EIFE, R. - Modulation of lymphoproliferation by human growth hormone.
Eur. J. Pediatr. 140: 47-50 (1983).
- KNIGGE, M.K. & HAYS, M. - Evidence of inhibitive role of hippocampus in neural regulation of corticotropin release.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 114: 67-69 (1963).
- KNIZLEY, H. - The Hippocampus and septal area as primary target sites of corticosterone.
J. Neurochemistry 19: 2737-2745 (1972).
- LEVIN, N.; SHINSAKO, J. & DALLMAN, M.F. - Corticosterone acts on the brain to inhibit adrenalectomy - induced adrenocorticotropin secretion.
Endocrinology 122(2): 694-701 (1988).
- LOPES DA SILVA, F.H. & ARNOLDS, D.E.A.T. - Physiology of the Hippocampus and related structures.
Ann. Rev. Physiol. 40: 185-216 (1978).

- McEWEN, B.S.; KLOST, E.R. & ROSTENE, W. - Adrenal steroid receptors and actions in the nervous system.
Physiol. Rev. 66(4): 1121-1188 (1986).
- MEIBACH, R.C. & SIEGEL, A. - Efferent connections of the Hippocampal formation in the rat.
Brain Res. 124: 197-224 (1977).
- NANCE, D.M. & RAYSON, D. - The effects of lesions in the lateral septal and hippocampal areas on the humoral immune response of adult female rats.
Brain, Behavior and Immunity 1: 292-305 (1987).
- 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-796s (1985).
- PAAVONEN, T.; ANDERSSON, L.C. & ADLERCREUTZ, H. - Sex hormone regulation of in vitro immune response.
J. Exp. Med. 154: 1935-1945 (1981).
- PAYAN, D.G. & GOETZL, E.J. - Modulation of lymphocyte function by sensory neuropeptides.
J. Immunol. 135(2): 783s-786s (1985).
- 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.
Immunol. 16: 217-230 (1969).

- PIERPAOLI, W.; FABRIS, N. & SORKIN, E. - In hormones and the immune response. Ciba Foundation Study Group n°36 (Ed. by Wolstenholme & Knight) Churchill, London (1970) pag. 126.
- RAISMAN, G. - An evaluation of the basic pattern of connections between the limbic system and the Hypothalamus.
Am. J. Anat. 129: 197-202 (1970).
- RAISMAN, G. & FIELD, P.M. - In Frontiers in Neuroendocrinology (Ed. by MARTINI & GANONG) Oxford University Press, N.Y. (1971) pag. 3.
- ROCHA, B. - The effects of stress in normal and adrenalectomized mice.
Eur. J. Immunol. 15: 1131-1135 (1985).
- SAPOLSKY, R.; RIVIER, C.; YAMAMOTO, G.; PLOTSKY, P. & VALE, W. - Interleukin-1 stimulates the secretion of Hypothalamic corticotropin-releasing factor.
Science 238: 522-524 (1987).
- SELYE, H. - General adaptation syndrome and diseases of adaptation.
J. Clin. Endocrinol. 6: 117-230 (1946).
- SHIZUME, K.; MATSUZAKI, F.; IINO, S.; MATSUDA, K.; NAGATAKI, S. & OKINAKA, S. - Effect of electrical stimulation on pituitary-thyroidal function.
Endocrinology 71: 456-463 (1962).

SMITH, E.M.; McMENAMIN, D.H. & BLALOCK, J.E. -

Lymphocyte production of endorphins and endorphin-mediated immunoregulatory activity.

J. Immunol. 135(2): 779s-782s (1985).

SNOW, E.C. - Insulin and growth hormone function as minor growth factors that potentiate lymphocyte activation.

J. Immunol. 135(2): 776s-778s (1985).

SNYDER, D.S. & UNANUE, E.R. - Corticosteroids inhibit murine macrophage Ia expression and Interleukin-1 production.

J. Immunol. 129(5): 1803-1805 (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).

STEIN, M.; KELLER, S.E. & SCHLEIFER, S.J. - Stress and immunomodulation: The role of depression and neuroendocrine function.

J. Immunol. 135(2): 827s-833s (1985).

TYREY, L. & NALBANDOV, A.V. - Influence of anterior hypothalamic lesions on circulating antibody titers in the rat.

Am. J. Physiol. 222(1): 179-185 (1972).

WAHL, S.M.; ALTMAN, L.C. & ROSENSTREICH, D.L. - Inhibition of in vitro lymphokine synthesis by glucocorticosteroids.

J. Immunol. 115(2): 476-481 (1975).

WEIGENT, D.A. & BLALOCK, J.E. - Interactions between the neuroendocrine and immune systems: common hormones and receptors.

Immunol. Rev. 100: 79-108 (1987).

WEISZ, P.; HORVATH, L. & KADAS, T. - Corticosteroid secretion of the accessory adrenals.

Acta. Physiol. Acad. Sci. Hung. 15: 57-59 (1959).

WHITE, A. - In Hormones and Immune Response. Ciba Foundation Study Group N° 36 (Ed. by Wolstenholme & knight) Churchill, London (1970) pag.48.

WILSON, M. & CRITCHLOW, V. - Effect of fornix transection or hippocampectomy on rhythmic pituitary-adrenal function in the rat.

Neuroendocrinology 13: 29-40 (1973/74).

WILSON, M.M.; GREER, S.E.; GREER, M.A. & ROBERTS, L. - Hippocampal inhibition of pituitary - adrenocortical function in female rats.

Brain Res. 197: 433-441 (1980).