

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



FERNANDO GUIMARÃES

Influência da lesão da área septal do cérebro de ratos
sobre os linfócitos T ($CD4^+$ e $CD8^+$) do baço e efeitos
sistêmicos induzidos pelo tumor de Walker 256

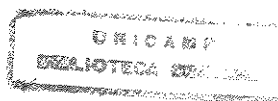
Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Fernando Guimarães
aprovada pela Comissão Julgadora
20/03/2000

Tese apresentada ao Instituto de Biologia
para obtenção do título de Doutor em
Biologia Funcional e Molecular na área de
Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. GILBERTO D'ASSUNÇÃO FERNANDES

Campinas, 2000

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE



UNIDADE BC
 N.º CHAMADA: T/UNICAMP
G947i
 E.º 41162
 P.º 278/00
 D.º 11,00
 DATA 17-06-00
 N.º OPD

G947i

CM-00142385-1

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
 BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

Guimarães, Fernando

G947i Influência da lesão da área septal do cérebro de ratos sobre
 linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) do baço e efeitos sistêmicos
 Induzidos pelo tumor Walker 256/Fernando Guimarães. - -
 Campinas, SP: [s.n.], 2000.
 118f. illus.

Orientador: Gilberto D'Assunção Fernandes
 Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas.
 Instituto de Biologia.

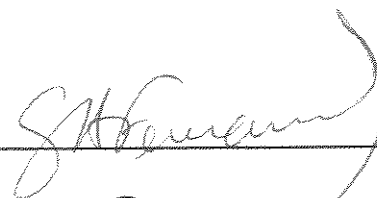
1. Linfócitos T. 2. Área septal. 3. Tumor. I. Fernandes,
 Gilberto D'Assunção. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto
 de Biologia. III. Título.

Campinas, 07 de 07 de 2000.

Banca Examinadora

Titulares:

Prof. Dr. Gilberto d'Assunção Fernandes (orientador)



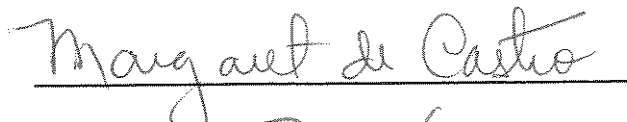
Profa. Dra. Elenice Aparecida de Moraes Ferrari



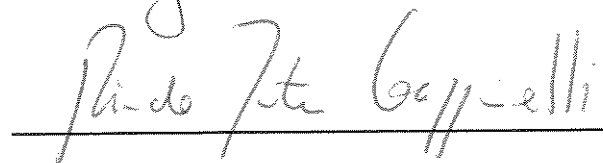
Profa. Dra. Giselle Zenker Justo



Profa. Dra. Margaret de Castro



Prof. Dr. Ricardo Tostes Gazzinelli



Suplentes:

Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos

Profa. Dra. Tereza Cristina Samico Cavalcanti

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

"A pesquisa do câncer encontra-se hoje num estado de total confusão.

Quase se parece com a própria doença: fragmentada e confusa."

(adaptado de Carl Simonton)

AGRADECIMENTOS

A Profª Drª Tereza Cristina S. Cavalcanti, cujo incentivo motivou não somente o início deste trabalho, mas, principalmente, sua conclusão.

Ao Prof. Dr. Ovídio Rettori e Profª Drª Ana Neuza Vieira-Matos, exemplos de dedicação a pesquisa científica.

Ao Prof. Dr. Gilberto d'Assunção Fernandes por ter me dado a oportunidade de me enveredar pelos caminhos da imunologia.

A Profª Drª Giselle Zenker Justo, pela disponibilidade para as freqüentes trocas de idéias relacionadas a imunologia de tumores.

Ao Dr. Francisco Fazzano do Laboratório de Reprodução Humana do CAISM e Dr. Ricardo Zollner do Laboratório da Disciplina de Alergia e Imunologia, nos quais foram realizadas as microscopias de fluorescência.

Aos companheiros do Laboratório de Fisiologia Clínica/NMCE e Laboratório de Pesquisas Bioquímicas/CAISM, especialmente Roberto, Jamilson e o Sr. Amilton.

Aos companheiros de curso de pós-graduação Fernando e José Eduardo.

A Judite, pelas correções dos diversos rascunhos deste trabalho e companheira de todos os momentos.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	I
ÍNDICE DE TABELAS.....	III
RESUMO.....	IV
SUMMARY.....	VI
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Estruturas límbico-hipotalâmicas e a resposta imune.....	1
1.2. A área septal do cérebro.....	6
1.3. A área septal do cérebro e a resposta adrenocortical.....	8
1.4. O tumor de Walker 256 como desafio imunológico.....	11
2. OBJETIVOS.....	18
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1. Animais.....	19
3.2. Procedimento cirúrgico para lesão da área septal.....	19
3.3. Avaliação da área lesada.....	20
3.4. Tumor de Walker 256, A e Ar.....	22
3.5. Administração das células tumorais.....	23
3.6. Estudo da fisiopatologia e padronização do número de inoculações do tumor de Walker 256 em ratos com lesão da área septal.....	23
3.6.1. Condições experimentais.....	23
3.6.2. Protocolo experimental: oito inoculações sc com tumor de Walker 256 A.....	24
3.6.3. Protocolo experimental: uma e quatro inoculações sc com tumor de Walker 256 Ar.....	25
3.6.4. Parâmetros fisiológicos avaliados e cálculo do balanço fracional de sódio.....	25
3.6.5. Sincronização dos dados.....	26
3.6.6. Autópsias.....	27

3.7. Frequência de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ em ratos com lesão septal.....	27
3.7.1. Condições experimentais.....	27
3.7.2. Protocolo experimental.....	28
3.7.3. Experimento com ratos adrenalectomizados.....	28
3.7.4. Parâmetros avaliados durante o crescimento dos tumores.....	29
3.7.5. Coleta de sangue e baço.....	30
3.7.6. Determinação das subpopulações de linfócitos T no baço.....	31
3.7.6.1. Preparação do tecido.....	31
3.7.6.2. Contagem das subpopulações de linfócitos T.....	32
3.7.7. Corticosterona.....	33
3.8. Análise estatística.....	34
4. RESULTADOS.....	36
4.1. Lesão da área septal.....	36
4.2. Aspectos fisiopatológicos e padronização do número de inoculações do tumor de Walker 256 em ratos com lesão da área septal.....	36
4.2.1. Evolução dos tumores e dos efeitos sistêmicos em ratos lesados com oito inoculações do tumor de Walker 256 A.....	36
4.2.2. Balanço de sódio.....	41
4.2.3. Balanço de água.....	45
4.2.4. Excreção osmolar.....	47
4.2.5. Evolução dos tumores e dos efeitos sistêmicos em ratos lesados com uma ou quatro inoculações do tumor de Walker 256 Ar (experimentos pilotos).....	48
4.2.6. Autópsias dos ratos com múltiplas inoculações (Walker 256 A e Ar).....	49

4.3. Influência da lesão septal sobre os linfócitos T no baço de ratos durante o crescimento do tumor de Walker 256 Ar.....	50
4.3.1. Determinação do crescimento e regressão dos tumores.....	50
4.3.1.1. Autópsias dos grupos SW. LW. S e L.....	53
4.3.1.2. Determinação dos linfócitos T, subtipos CD4 ⁺ e CD8 ⁺ , no baço.....	54
4.3.1.3. Corticosterona sérica.....	57
4.3.1.4. Correlação entre CD4 ⁺ /CD8 ⁺ e corticosterona sérica.....	57
4.3.2. Influência da corticosterona na resposta de linfócitos T durante o crescimento do tumor de Walker 256 Ar (ratos adrenalectomizados).....	59
4.3.2.1. Determinação do crescimento ou regressão dos tumores.....	59
4.3.2.2. Autópsias dos grupos CW e AW.....	61
4.3.2.3. Determinação dos linfócitos T, subtipos CD4 ⁺ e CD8 ⁺ , no baço de ratos adrenalectomizados.....	62
4.3.2.4. Corticosterona sérica nos grupos CW e AW.....	64
5. DISCUSSÃO.....	65
5.1. Aspectos fisiopatológicos do tumor de Walker 256 em ratos com lesão da área septal.....	65
5.2. Adequação do modelo experimental tumoral para o estudo da resposta imune em ratos septais.....	70
5.3. Estudo da frequência de linfócitos T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ no baço de ratos septais portadores de tumor.....	72
6. CONCLUSÕES.....	83
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85
8. ANEXO 1.....	103

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1.	Esquema do aparelho estereotáxico.....	21
FIGURA 2.	Esquema resumindo os grupos experimentais e procedimentos.....	35
FIGURA 3.	Seção coronal do cérebro de rato com lesão septal.....	37
FIGURA 4.	Alterações do peso corpóreo e da excreção de sódio em ratos com lesão septal e portadores de oito inoculações sc do tumor de Walker 256 A.....	40
FIGURA 5.	Balanco fracional de sódio em ratos com lesão septal e portadores de oito inoculações sc do tumor de Walker 256 A.....	40
FIGURA 6.	Variações do volume de urina em ratos com lesão septal e portadores de oito inoculações sc do tumor de Walker 256 A.....	45
FIGURA 7.	Retenção hídrica dos grupos SW8 e LW8.....	46
FIGURA 8.	Peso médio dos tumores (crescimento tumoral) nos ratos cirurgia simulada (SW) portadores de uma inoculação sc do tumor de Walker 256 Ar.....	51
FIGURA 9.	Peso médio dos tumores (crescimento tumoral) nos ratos com lesão septal (LW) portadores de uma inoculação sc do tumor de Walker 256 Ar.....	51
FIGURA 10.	Relação CD4 ⁺ /CD8 ⁺ no baço de ratos cirurgia simulada (SW) e portadores de uma inoculação sc do tumor de Walker 256 Ar.....	56
FIGURA 11.	Relação CD4 ⁺ /CD8 ⁺ no baço de ratos com lesão septal (LW) e portadores de uma inoculação sc do tumor de Walker 256 Ar.....	56
FIGURA 12.	Concentração sérica de corticosterona em ratos cirurgia simulada (SW) e portadores de uma inoculação sc do tumor de Walker 256 Ar.....	58
FIGURA 13.	Concentração sérica de corticosterona em ratos com lesão septal (LW) e portadores de uma inoculação sc do tumor de Walker 256 Ar.....	58

FIGURA 14. Peso médio dos tumores (crescimento tumoral) nos ratos controles (CW) portadores de uma inoculação sc do tumor de Walker 256 Ar.....	60
FIGURA 15. Peso médio dos tumores (crescimento tumoral) nos ratos adrenalectomizados (AW) portadores de uma inoculação sc do tumor de Walker 256 Ar.....	60
FIGURA 16. Relação CD4 ⁺ /CD8 ⁺ no baço de ratos controles (CW) e adrenalectomizados (AW), portadores de uma inoculação sc do tumor de Walker 256 Ar.....	63
FIGURA 17. Concentração sérica de corticosterona em ratos controles (CW) e adrenalectomizados (AW), portadores de uma inoculação sc do tumor de Walker 256 Ar.....	64
FIGURA 18. Possível relação entre os efeitos renais primários induzidos pelo tumor de Walker 256 em ratos intactos e a resposta diurética secundária observada em ratos com lesão da área septal.....	69

ÍNDICE DE TABELAS

TABELA 1.	Duração média dos períodos sub-clínico (sCP) e clínico (PC) em ratos com lesão septal e portadores de oito inoculações sc do tumor de Walker 256 A.....	21
TABELA 2.	Peso corpóreo de ratos com lesão septal e portadores de oito inoculações do tumor de Walker 256 A.....	42
TABELA 3.	Excreção renal de sódio de ratos com lesão septal e portadores de oito inoculações sc do tumor de Walker 256 A.....	42
TABELA 4.	Excreção osmolar de ratos com lesão septa e portadores de oito inoculações sc do tumor de Walker 256 A.....	47
TABELA 5.	Duração média dos períodos sub-clínico (sCP) e clínico (PC) em ratos com lesão septal e portadores de quatro inoculações sc do tumor de Walker 256 A.....	49
TABELA 6.	Taxa de crescimento tumoral em ratos cirurgia simulada (SW) e com lesão septal (LW) portadores de uma inoculação sc do tumor de Walker 256 Ar.....	52
TABELA 7.	Pesos relativos dos órgãos de ratos cirurgia simulada (SW) e com lesão septal (LW) portadores de uma inoculação sc do tumor de Walker 256 Ar.....	54
TABELA 8.	Percentuais de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ no baço de ratos cirurgia simulada (SW) e com lesão septal (LW) portadores de uma inoculação sc do tumor de Walker 256 Ar.....	55
TABELA 9.	Taxa de crescimento tumoral em ratos adrenalectomizados (AW) e portadores de uma inoculação sc do tumor de Walker 256 Ar.....	61
TABELA 10.	Pesos relativos dos órgãos de ratos adrenalectomizados (AW) e portadores de uma inoculação sc do tumor de Walker 256 Ar.....	62
TABELA 11.	Percentuais de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ no baço de ratos adrenalectomizados (AW) e portadores de uma inoculação sc do tumor de Walker 256 Ar.....	63

RESUMO

Alguns trabalhos relataram a participação de estruturas límbicas na modulação da resposta imune. Com relação aos núcleos septais, a lesão ampla desta área alterou a resposta humoral de ratos imunizados com hemácias de carneiro, enquanto a lesão septal medial inibiu a resposta mitogênica *in vitro* de linfócitos T. Neste trabalho, investigou-se a influência da área septal do cérebro sobre as freqüências de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ no baço de ratos durante o desenvolvimento tumoral. Para isso, ratos com a área septal do cérebro lesada através de cirurgia estereotóxica (LW) e ratos controles (cirurgia simulada, SW) foram comparados após receberem uma inoculação subcutânea (sc) do tumor de Walker 256 Ar (variante celular com elevado índice de regressão, obtida a partir das células tumorais de Walker 256 A). A possibilidade da atividade adrenocortical mediar os efeitos septais foi verificada pela dosagem de corticosterona sérica. Também foi investigada a influência da lesão septal sobre os efeitos sistêmicos tais como, anorexia, ganho de peso corpóreo, retenção renal de sódio e água induzidos pelo tumor (modelo de inoculação multifocal com células tumorais de Walker 256 A), visto a possibilidade de variações destes parâmetros fisiológicos servirem como uma indicação indireta da atividade imunológica. Com relação aos efeitos sistêmicos tumorais foi observado que a lesão septal causou uma redução temporária na retenção de sódio e água induzida pelo tumor, possivelmente como consequência da inibição da liberação do hormônio antidiurético. Duas semanas após a inoculação do tumor de Walker 256 Ar foram identificadas regressões tumorais em 46,2 % do grupo SW e 57,1 %

do grupo LW. Tanto no grupo SW como no LW o percentual de linfócitos T CD4⁺ nos ratos cujos tumores não regrediram (SW = $19,5 \pm 1,4$ %; LW = $23,8 \pm 1,6$ %) foi significativamente menor que naqueles com regressão tumoral (SW = $29,3 \pm 2,4$ %; LW = $31,4 \pm 1,6$ %). Como consequência a relação CD4⁺/CD8⁺ também foi significativamente menor nos ratos cujos tumores não regrediram (SW = $0,91 \pm 0,07$; LW = $1,20 \pm 0,07$) que naqueles com regressão tumoral (SW = $1,45 \pm 0,1$; LW = $1,59 \pm 0,1$). Concluiu-se que as variações nas frequências de linfócitos T, bem como na relação CD4⁺/CD8⁺ estiveram associadas ao desenvolvimento tumoral e não foram afetadas pela lesão ampla da área septal. Através de um experimento com ratos adrenalectomizados foi observado que o crescimento contínuo ou a regressão dos tumores, bem como a resposta imune celular associada a estes eventos, não foram influenciados pela atividade adrenocortical.

ABSTRACT

Some studies have shown the influence of limbic-hypothalamic areas on the immune response modulation. Concerning the septal nucleus, the whole lesion of this limbic area impaired the humoral immune response of rats immunized with sheep red blood cells, while lesions of the medial septal nucleus produced a long-lasting inhibition of T lymphocyte proliferation induced by mitogens. The proposal of the present study was to investigate the influence of septal area lesion on frequencies of splenic T CD4⁺ and T CD8⁺ lymphocytes, during tumor development. Therefor, septal-lesioned rats (LW), obtained through stereotaxic surgery, were compared with sham-operated rats (SW), after one subcutaneous (sc) inoculation of Walker 256 Ar tumor cells (a cell variant obtained from Walker 256 A tumor, distinguished by presenting a high regression incidence). The adrenocortical activity in the mediation of septal lesion effects was evaluated by assessing serum corticosterone. The influence of septal lesion on systemic effects induced by the tumor, like body weight gain and, sodium and water renal retention was also investigated (by using the multifocal sc inoculation model of Walker 256 A cells). It was suggested that changes in these parameters would help as an indirect indication of the immunological function alterations. Concerning the systemic effects, sodium and fluid retention induced by the Walker 256 A tumor was temporarily reduced in animals with septal area lesions. This effect was possibly a result of an inhibition of antidiuretic hormone release. By using the Walker 256 Ar tumor cells, it was observed tumor regressions in 46.2 % of the SW group and 57.1 % of the LW group two weeks after sc inoculation. In

both groups SW and LW, the frequency of splenic T CD4⁺ lymphocytes was significantly reduced in rats which tumors did not regress (SW = 19.5 ± 1.4 %; LW = 23.8 ± 1.6 %) compared with rats with tumor regression (SW = 29.3 ± 2.4 %; LW = 31.4 ± 1.6 %). As a consequence, the CD4⁺/CD8⁺ ratio was also significantly reduced in rats without tumor regression (SW = 0.91 ± 0.07 ; LW = 1.20 ± 0.07) in relation to those with tumor regression (SW = 1.45 ± 0.1 ; LW = 1.59 ± 0.1 %). Therefore, septal area lesion did not affect the frequencies of T lymphocytes. Nevertheless, the alterations observed in the frequencies of T lymphocytes, as well as in CD4⁺/CD8⁺ ratio were associated with tumor development (continuous growth or regression). It was also observed that tumor continuous growth or tumor regression, as well as the immune response associated with these events were not affected by adrenocortical activity.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Estruturas límbico-hipotalâmicas e a resposta imune

Um dos principais recursos utilizados em estudos sobre a integração dos sistemas nervoso e imunológico é o de observar a influência de lesões em áreas específicas do cérebro durante a ativação imune. O hipotálamo, certamente, pelo papel que desempenha na regulação neuroendócrina e atividade autônoma, é um dos centros cerebrais mais estudados. Além das lesões cirúrgicas de estruturas cerebrais, procedimentos como a estimulação elétrica ou a determinação da atividade de centros específicos no cérebro mostraram que a ação combinada de várias estruturas, muitas delas hipotalâmicas e, ainda, do sistema límbico e formação reticular influenciam na atividade imunológica (BESEDOVSKY et alii, 1977; KORNEVA, 1987; SAPHIER et alii, 1987; ABRAMSKY et alii, 1987 e KATAYMA et alii, 1987).

A ação imunomoduladora do hipotálamo é, freqüentemente, discutida em termos da regulação da atividade do eixo hipófise-adrenal e conseqüente liberação de esteróides adrenocorticais. Tal fato fundamenta-se no conhecimento de que, durante a resposta imune primária, em ratos e camundongos tratados com antígenos solúveis ou células não replicantes (hemácias), observa-se o aumento da corticosterona sérica (quinto ao oitavo dia), acompanhando a produção de anticorpos (BESEDOVSKY & SORKIN, 1977 e FERNANDES, 2000). Foi sugerido que a ação hormonal estaria relacionada à supressão de células imunes que não estivessem comprometidas com a resposta

imunológica, sem, no entanto, afetar a expansão clonal das células competentes (BESEDOVSKY & SORKIN, 1977). Assim, TYREY & NALBANDOV (1972) consideraram o aumento da atividade do eixo hipófise-adrenal um mecanismo razoável para explicar a diminuição de anticorpos circulantes em ratos com lesão do hipotálamo anterior. Estes mesmos autores observaram que este efeito poderia ser efetivamente bloqueado tanto com a hipofisectomia como com a adrenalectomia dos ratos.

REY et alii (1984) mostraram que os glicocorticóides modificam o número de células esplênicas e a atividade de linfócitos B secretores de imunoglobulinas, segundo a relação inversa à sua concentração plasmática. Neste sentido, propuseram que os mecanismos imunomoduladores associados aos glicocorticóides estariam operando dinamicamente e constantemente, o que explicaria variações circadianas observadas em linfócitos circulantes e outras funções imunes.

Entretanto, a elevação da corticosterona não justificou a redução no número de células do tecido linfóide (timócitos) e a diminuição da resposta mitogênica de esplenócitos em ratos com lesão pré-óptica hipotalâmica anterior, visto que nos ratos controles, apesar da concentração aumentada da corticosterona, a resposta mitogênica foi normal (CROSS et alii, 1980 e ROSZMAN et alii, 1985). A diminuição da resposta mitogênica em ratos com lesão do hipotálamo anterior foi relacionada, posteriormente, ao aumento da atividade de macrófagos supressores naturais presentes no baço (ROSZMAN et alii, 1982), sugerindo uma ação neuromoduladora qualitativa. Outro efeito

observado após a lesão do hipotálamo anterior e considerado independente da atividade supressora de macrófagos foi a diminuição da atividade citotóxica das células “natural killer” (NK) (CROSS et alii, 1984 e ROSZMAN et alii, 1985). Por outro lado, ratos com lesões da amígdala e hipocampo apresentaram um aumento da resposta proliferativa de esplenócitos e timócitos em relação aos grupos controles (CROSS et alii, 1982 e ROSZMAN et alii, 1985), reforçando o conceito de que a neuroimunomodulação é a capacidade do sistema nervoso central inibir ou facilitar a resposta imune.

Um argumento favorável à mediação endócrina predominante, mas não exclusiva, na modulação neuroimune foi o fato da remoção da hipófise reverter alguns dos efeitos inibitórios da lesão do hipotálamo anterior e todos os efeitos facilitadores das lesões da amígdala e hipocampo (CROSS et alii, 1982 e ROSZMAN et alii, 1985).

BELLUARDO et alii (1987) observaram que em camundongos, o controle hipotalâmico da imunidade natural seria diferenciado para a atividade das células NK e a atividade citotóxica natural. Assim, enquanto a lesão medial do hipotálamo, incluindo os núcleos ventromedial e dorsomedial, diminuiu a atividade citotóxica das células NK, as lesões medial, anterior e posterior do hipotálamo aumentaram a atividade citotóxica natural. Tais resultados não mostraram relação com as alterações induzidas pelas lesões hipotalâmicas na secreção de prolactina e hormônio de crescimento pela hipófise e corticosterona pelas adrenais (BELLUARDO et alii, 1987). Por outro lado, WRONA et alii (1994), ao lesarem o hipotálamo medial de ratos, não encontraram qualquer influência sobre

a atividade das células NK, o que foi discutido em termos das espécies animais utilizadas e das diferenças técnicas de cada um dos estudos.

O hipotálamo lateral também parece influenciar na função imune. Em ratos, a lesão bilateral desta área, causou variações temporárias da atividade das células NK, a qual apresentou-se diminuída nos segundo e décimo primeiro dias após a lesão, mas aumentada no quinto dia (WRONA et alii, 1994).

Os estudos com lesões hipotalâmicas não se limitaram aos efeitos diretos sobre a atividade imunológica, mas se estenderam à proliferação de tecidos neoplásicos. Assim, após a lesão medial do hipotálamo, incluindo os núcleos ventromedial, dorsomedial e arqueado, foi observado o aumento da proliferação celular tanto do tumor ascítico de Yoshida em ratos, como dos tumores ascíticos de Ehrlich e L1210 em camundongos (BINDONI et alii, 1980 e BINDONI et alii, 1981). Embora BINDONI et alii (1986) refiram que a lesão medial do hipotálamo iniba permanentemente a atividade citotóxica das células NK, consideraram que o aumento da proliferação das células tumorais em camundongos e ratos lesados não foi um efeito exclusivo da resposta imune deficiente, mas também devido a eliminação da ação inibitória que o hipotálamo medial exerce sobre a proliferação celular.

MORI et alii (1993), após observarem a redução da resposta mitogênica à fitohemaglutinina e o aumento da velocidade de crescimento de tumores implantados no tecido subcutâneo de ratos com lesão bilateral do hipotálamo anterior, realizaram um estudo mais detalhado da imunidade celular e da memória imunológica. Neste estudo encontraram diminuídas a relação $CD4^+/CD8^+$ e a

atividade citotóxica das células NK, além da expressão de antígenos do complexo de histocompatibilidade principal da classe II (MHC II) em ratos lesados, sugerindo a participação do hipotálamo anterior no controle das respostas imunológicas mediada por células e de memória (MORI et alii, 1993).

A literatura ainda é escassa em relatos de trabalhos experimentais que relacionem a área septal do cérebro à função imunológica. As informações obtidas até o momento sugerem que ocorra a inibição da resposta imune como efeito da lesão da área septal, todavia, aspectos como a amplitude da área lesada, tempo experimental após a lesão e a natureza do desafio ou ainda, do parâmetro imunológico avaliado devem ser considerados. Neste sentido, PARADA (1991) detectou o comprometimento da resposta imune humoral de ratos com lesão ampla da área septal. Este estudo mostrou que a lesão reduziu significativamente a produção da imunoglobulina G (IgG) e alterou a dinâmica de aparecimento da imunoglobulina M (IgM) após a inoculação dos ratos com hemácias de carneiro. O emprego da técnica de "plaque forming colony" (PFC) confirmou os efeitos da lesão septal sobre a IgM, mostrando ainda, que a produção desta imunoglobulina poderia estar diminuída em lesões amplas, extra-septais, ou até mesmo, estimulada nas lesões parciais da área septal (dados não publicados de Fernandes, G. A.).

LABEUR et alii (1991) baseados na influência das vias colinérgicas centrais sobre a função imunológica, propuseram o estudo da resposta mitogênica de linfócitos obtidos a partir do baço e timo de ratos com lesão do núcleo septal medial. Assim, encontraram a resposta proliferativa de linfócitos T

(responsivos a concanavalina A, fitohemaglutinina e *Phytolacca americana*) inibida até 25 dias após a lesão. Todavia, transcorridos 40 dias após a lesão septal medial, estes autores observaram um total restabelecimento desta função. Em contraste, a proliferação de linfócitos B (responsivos a lipopolissacarídeos de *E. coli*) não foi afetada pela lesão do núcleo septal medial (LABEUR et alii, 1991).

1.2. A área septal do cérebro

A área septal do cérebro corresponde a uma região do sistema límbico quase totalmente rodeada por líquido cerebroespinal, já que está localizada entre os ventrículos laterais na porção dorsal anterior da comissura anterior e ventral do corpo caloso (COVIÁN, 1966). Para esta região convergem vias aferentes de diversas origens em direção ao sistema límbico. Assim, a área septal recebe impulsos periféricos de origem sensorial, somática e visceral, além de impulsos do córtex cerebral e do próprio sistema límbico, gerando descargas septais que se propagam para estruturas subcorticais, como o hipocampo, amígdala e hipotálamo (JONASON et alii, 1973; NEGORO et alii, 1973; GAGE & OLTON, 1975; NYASKAS & BOHUS, 1979; FELDMAN & COMFORTI, 1980; FELDMAN et alii, 1982 e BURSTEIN & GIESLER, 1989).

Sendo parte integrante do sistema límbico, a área septal participa da elaboração de diversos tipos de comportamentos afetivos e motivacionais, inclusive aqueles relacionados à homeostasia do sódio e da água (HARVEY & HUNT, 1965; NEGRO-VILAR & ANTUNES-RODRIGUES 1965; COVIAN, 1966; BLASS et alii, 1974; GORDON & JOHNSON, 1980; McCANN et alii, 1997 e SAAD

et alii, 1998). A contribuição da área septal nas respostas fisiológicas, como alterações da pressão arterial, ritmo cardíaco e respiratório, é considerada em termos dos efeitos que exerce sobre o hipotálamo (MOGENSON, 1976). Durante a desidratação, a ação septal também se dá através do hipotálamo, quando pela estimulação dos núcleos supraópticos ocorre a liberação do hormônio anti-diurético e conseqüentemente a conservação de água (BRIDGE, 1976).

Em experimentos de autoestimulação, a área septal aparece como sendo de intensa gratificação, levando a estados de motivação ou tranquilidade suficientes para que estímulos dolorosos ou nocivos sejam ignorados (COVIÁN, 1966). Por outro lado, a lesão ampla da área septal causa alterações no comportamento do rato, descritas como hiperreatividade, hiperemotividade e agressividade, que são designadas genericamente como "síndrome septal" ou "raiva septal" (BLANCHARD et alii, 1979 e ALBERT & CHEW, 1980). Ratos lesados reagem aos estímulos comuns, presentes na rotina de manutenção de um biotério, de maneira exagerada e abrupta, saltando para fora da gaiola descontroladamente ao serem manuseados ou atacando o experimentador e objetos, como o próprio bebedouro, quando estes são movimentados dentro de seu raio de ação.

A síndrome septal é entendida, atualmente, como o aumento exagerado nos comportamentos de defesa e ataque do rato, que podem ocorrer juntos ou separadamente quando o septo é lesado amplamente ou em suas porções lateral e anterior ventral (BLANCHARD et alii, 1979; ALBERT & BRAYLEY, 1979 e ALBERT & CHEW, 1980). As alterações de comportamento se iniciam tão logo o

rato se recupere da anestesia e tendem a diminuir com o tempo, sendo que a recuperação é facilitada pela habituação prévia dos animais à manipulação, estabelecimento de uma rotina rígida ou mesmo pelo uso de algumas drogas (BLANCHARD et alii, 1979; ALBERT & CHEW, 1980 e POPLAWSKY & ISAACSON, 1990).

1.3. A área septal do cérebro e a resposta adrenocortical

As primeiras evidências sugerindo a participação da área septal nos mecanismos que modulam a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e consequentemente a liberação da corticosterona são do início da década de setenta. Em uma série de experimentos Seggie e colaboradores observaram que ratos com lesão da área septal apresentavam hipertrofia das adrenais após serem submetidos a testes de comportamento e ainda, que o comportamento hiperreativo de ratos lesados variava ao longo do dia, tal qual a resposta adrenocortical de ratos normais (SEGGIE & BRONW, 1971; SEGGIE et alii, 1974a e SEGGIE et alii, 1974b).

Naquela ocasião, os resultados obtidos em experimentos envolvendo a área septal ou outras estruturas relacionadas a integração septo-hipotálamo, causavam divergências sobre como a área septal poderia influenciar na função adrenal. Foi observado que a lesão do fórnix modificava a flutuação diurna da corticosterona, igualando os períodos de baixa e alta concentração plasmática (MOBERG et alii, 1971). Além disso, também foi verificado que este efeito era temporário, com os períodos de baixa e alta concentração da corticosterona

plasmática se restabelecendo após três semanas (LENGVÁRI & HALÁSZ, 1973). Já em outro estudo, com ratos também lesados no fórnix e na área septal, não houve mudanças na flutuação diurna da corticosterona (WILSON & CRITCHLOW, 1974).

SEGGIE & BRONW (1971) ao avaliarem a flutuação basal da corticosterona no plasma de ratos com lesão septal, obtiveram uma concentração cinco vezes maior nos ratos lesados que nos controles, durante o período de baixa concentração. Visto que ratos normais respondem com maior intensidade a estímulos estressantes justamente no período de menor concentração de corticosterona (ADER & FRIEDMAN 1968), foi sugerido que em ratos septais esta resposta estaria exacerbada (SEGGIE & BRONW, 1971).

Alguns trabalhos mostraram que as próprias condições de alojamento poderiam influenciar na função adrenocortical de ratos normais. Neste sentido, variações na flutuação diurna da corticosterona, observadas em ratos com lesão septal, poderiam ser efeito da resposta exagerada a estímulos ambientais diversos ocorridos casualmente e não necessariamente da influência da área septal sobre o ritmo circadiano da corticosterona (PLAUT & GROTA, 1971).

Tal hipótese, testada por SEGGIE et alii (1974a), mostrou, por fim, que ratos com lesão da área septal, quando mantidos em ambiente rigorosamente controlado, apresentaram a flutuação circadiana basal da corticosterona idêntica a de ratos intactos ou cirurgia-simulada. Todavia, frente a estímulos ambientais, a resposta adrenocortical de ratos com lesão septal seria mais intensa que a de ratos normais, principalmente no período de menor concentração de

corticosterona (SEGGIE et alii 1974a e SEGGIE et alii, 1974b). Portanto, a relação funcional entre a área septal e o hipotálamo não envolveria o controle do ritmo circadiano da corticosterona, mas sim a modulação do limiar de ativação e a magnitude da atividade do eixo hipófise-adrenal (SEGGIE et alii, 1974a; SEGGIE et alii, 1974b e UHLIR et alii, 1974). Outrossim, em relação à síndrome septal, as alterações endócrinas de ratos lesados parecem ser antes uma consequência, do que a causa do comportamento hiperreativo (BROWN et alii, 1974).

A ação septal na modulação da função adrenocortical ainda deve ser considerada em relação às subdivisões da área septal. Impulsos somatossensoriais que geram a liberação de corticosterona, como por exemplo a estimulação do nervo ciático, chegam ao hipotálamo anterior retransmitidos pelo núcleo septal medial, após seguirem um circuito neural que envolve o hipocampo ventral, fímbria, fórnix pré-comissural e o núcleo septal lateral (FELDMAN & CONFORTI, 1980). Assim, se a lesão do núcleo septal medial reduziu a liberação de corticosterona, induzida pela estimulação do nervo ciático de ratos anestesiados, a estimulação elétrica do núcleo septal medial causou o aumento da corticosterona (FELDMAN & CONFORTI, 1980 e FELDMAN et alii, 1982).

DUNN (1987) estudou quais subdivisões da área septal afetariam de maneira diferente a função adrenocortical. Neste caso, a estimulação elétrica dos núcleos septais lateral dorsal e lateral ventral de ratos anestesiados, aumentou a concentração de corticosterona no plasma, enquanto a estimulação do núcleo septal medial a diminuiu (DUNN, 1987). Os motivos para a divergência em relação aos resultados de FELDMAN et alii (1982) não foram

determinados, tendo sido discutidos segundo as particularidades de cada um dos protocolos experimentais e pelo fato da estimulação elétrica da banda diagonal de Broca, localizada imediatamente abaixo do núcleo septal medial, também ter induzido o aumento da corticosterona no plasma (DUNN, 1987). Estes resultados mostraram que, assim como o hipocampo e o complexo amigdalóide, a área septal é outra estrutura límbica que serve como um agregado de núcleos subservindo funções distintas (DUNN & WHITENER, 1986), devendo ser considerada, pelo menos, nos seus componentes medial e lateral.

1.4. O tumor de Walker 256 como desafio imunológico

O modelo experimental que utiliza o tumor de Walker 256 em ratos de laboratório é amplamente utilizado em estudos da fisiopatologia do câncer (TOAL et alii, 1961; MORRISON, 1971; GUAITANI et alii, 1982 e TAYEK & BRASEL, 1990).

Neste modelo experimental, assim como ocorre em humanos (Easrtern Cooperative Oncology Group, 1980; RUSTGI, 1987; GRAF et alii, 1991 e PASQUALETTI et alii, 1991), o câncer usualmente cresce por um período de tempo muito variável sem que qualquer alteração fisiológica seja notada no hospedeiro. Porém, uma vez que os primeiros sinais de distúrbios homeostáticos apareçam no hospedeiro, a evolução clínica da doença ocorre rapidamente. A descontinuidade na evolução da doença e, conseqüentemente, a variabilidade individual característica do câncer são decorrentes de fatores desconhecidos, embora, freqüentemente, sejam relacionados às alterações genéticas associadas

ao desenvolvimento tumoral, à disseminação metastática e à falência dos mecanismos de proteção do hospedeiro, sejam aqueles responsáveis pela manutenção da homeostasia como o próprio sistema imunológico.

No modelo experimental de Walker 256, após uma inoculação subcutânea de células tumorais tomadas a partir de uma mesma suspensão e administradas em um grupo homogêneo de ratos, observa-se uma grande variabilidade no tempo para que os hospedeiros manifestem os efeitos sistêmicos induzidos pelo tumor. Como consequência, a evolução clínica de ratos portadores do tumor de Walker 256 da linhagem A (Walker 256 A) ocorre de modo não linear, ou seja, com um período inicial de duração variável, designado como sub-clínico (sCP), no qual o tumor cresce aparentemente sem causar qualquer distúrbio fisiológico no hospedeiro, passando subitamente para um período, designado como clínico (CP), quando ocorrem rápidas e severas alterações homeostáticas que levam o hospedeiro à morte (RETTORI et alii, 1995).

Os distúrbios homeostáticos usualmente associados ao câncer se manifestam como alterações na ingestão de alimento e água, no controle hidrossalino, nas funções neurovegetativas, imunológicas e outras (BAILLIE et alii, 1965; TCAKS, 1974; BLACKBURN et alii, 1977; GARATTINI et alii, 1980 e SCOTT, 1991). Em ratos portadores do tumor de Walker 256 A o início do CP é identificado pela anorexia, cuja progressão, inicialmente lenta, é paradoxalmente acompanhada pelo ganho de peso corpóreo causado pela retenção de sódio e água (RETTORI et alii, 1995).

RETTORI et alii (1995) observaram que apesar da variabilidade na

duração do sCP, o início do CP estaria associado à disseminação metastática em ratos portadores de uma inoculação subcutânea do tumor de Walker 256 A. Tal hipótese foi avaliada ao se reproduzir a disseminação metastática do tumor, administrando-se simultaneamente múltiplas inoculações subcutâneas com células de Walker 256 A. Como resultado, a duração e a variabilidade do sCP diminuíram, os efeitos sistêmicos foram sincronizados e antecipados, passando a ocorrer com reduzida massa tumoral total e na ausência de metástases (RETTORI et alii, 1995).

A capacidade do crescimento multifocal do tumor de Walker 256 induzir os efeitos sistêmicos também foi verificada ao se administrar múltiplas inoculações subcutâneas da subpopulação *Ar* desse tumor. A subpopulação *Ar* do tumor de Walker 256 (Walker 256 *Ar*) foi obtida a partir do tumor de Walker 256 A pelo Dr. Rettori, quando, para a manutenção da linhagem tumoral crescendo sob a forma ascítica, realizou sucessivas passagens de células tumorais através da inoculação na cavidade peritoneal do rato. O tumor de Walker 256 *Ar* mostra-se menos agressivo quanto à capacidade de induzir os efeitos sistêmicos tumorais e apresenta um elevado índice de regressões espontâneas quando uma única inoculação subcutânea por rato é utilizada (GUIMARÃES et alii, 1995).

Os resultados obtidos com as múltiplas inoculações do tumor de Walker 256 foram interpretados em termos das possíveis interações entre fatores desconhecidos de origem tumoral (mediadores humorais) e os mecanismos de proteção do hospedeiro (sistema imune, homeostasia) e, assim, o aumento no número de células tumorais proliferantes proporcionado pelo crescimento

multifocal, levaria a um desequilíbrio, com a antecipação dos efeitos sistêmicos e morte do hospedeiro (RETTORI et alii, 1995).

O sistema imunológico apareceria como um dos mecanismos com grande importância na preservação da homeostasia do hospedeiro e consequentemente na prevenção dos efeitos sistêmicos induzidos pelo tumor. Rettori e Vieira-Matos mostraram que ratos com o sistema imune suprimido por irradiação, quando inoculados com o tumor de Walker 256, manifestaram os efeitos sistêmicos ainda mais rapidamente (em 1 ou 2 dias) indo a óbito em apenas 4 a 6 dias, quando a massa tumoral total ainda era muito pequena (comunicação pessoal).

Através do modelo experimental que utiliza múltiplas inoculações sc com células tumorais de Walker 256 foi possível, por exemplo, se estudar o comprometimento da excreção hidrossalina, um dos efeitos sistêmicos freqüentemente associados ao desenvolvimento de tumores (TACAKS, 1974 e BLACKBURN et alii, 1977). Assim, através da inoculação multifocal, os resultados obtidos nestes estudos sugeriram a ação de mediadores humorais e, ainda, indicaram que a retenção de sódio induzida pelo tumor de Walker 256 seria conseqüência de um efeito tubular renal primário (RETTORI et alii, 1996), antes que um efeito secundário, causado por uma hiperfunção adrenal ou seqüestro de sal pelo tumor em crescimento (TOAL et alii, 1961 e MORRISON, 1968).

Já foram mencionados anteriormente relatos da literatura sobre a utilização de linhagens tumorais de ratos e camundongos em animais com lesões hipotalâmicas (BINDONE et alii, 1980; BINDONE et alii, 1986 e MORI et alii,

1993). Nestes modelos experimentais os efeitos das lesões hipotalâmicas foram estudados em relação à resposta imune e a proliferação das células tumorais. Com relação ao tumor de Walker 256, a possibilidade do sistema imune influenciar na manifestação dos efeitos sistêmicos induzidos pelo tumor, como foi demonstrado em ratos irradiados, tornam esse modelo atraente para estudos de neuroimunomodulação. Neste sentido, variações no tempo para manifestação ou na intensidade dos efeitos sistêmicos tumorais, em ratos com lesões límbico-hipotalâmicas específicas, poderiam ser uma indicação indireta do comprometimento da função imune.

Os mecanismos imunológicos mobilizados durante a instalação e o crescimento do tumor de Walker 256 são pouco conhecidos, apesar de alguns trabalhos mostrarem o desenvolvimento de certa resistência ou mesmo, imunização ao tumor por ratos que foram submetidos a um contato imunogênico prévio (BUINAUSKAS et alii, 1966, PEREIRA & GUSTALE, 1992 e GUIMARÃES et alii, 1995). Todavia, as tentativas de se demonstrar a presença de anticorpos circulantes contra o tumor de Walker 256 não foram conclusivas, conferindo à imunidade humoral um papel secundário (DINH & BRASSARD, 1967; MEYERS, 1975; MOTA & RESKALLAH-IWASSO, 1981 e GUIMARÃES et alii, 1995).

Considera-se que a resposta imune celular mediada pelos linfócitos T específicos, seja de fundamental importância frente ao desafio imunológico contra as neoplasias (HEBERMAN, 1992 e GARZETTI et alii, 1992). Tal hipótese baseou-se no fato dos linfócitos T mobilizarem a resposta imunológica responsável pela rejeição de tecidos transplantados e a destruição de células

UNICAMP

alteradas pela presença de patógenos, incluindo as neoplasias associadas a vírus (BEVERLEY, 1990 e TZYU-CHOU WU, 1994). Foi demonstrado ainda, que a transferência de anticorpos obtidos a partir de camundongos que se tornaram imunes a determinados tipos de tumores experimentais, não conferiu imunidade aos camundongos receptores, enquanto a transferência das células T induziu a rejeição tumoral nos receptores (BEVERLEY, 1990; KLEIN, 1995 e HEBERMAN, 1992).

Foi sugerido que, assim como ocorreria durante a resposta imune celular em sistemas não tumorais, frente ao desafio tumoral os linfócitos T CD4⁺ responderiam proliferando e secretando várias citocinas, as quais, entre outras funções, ativariam um dos principais mecanismos efetores contra tumores, ou seja, a citotoxicidade mediada pelos linfócitos T CD8⁺ (HEBERMAN, 1992). Assim, durante a rejeição de tumores, os linfócitos T CD4⁺ são requeridos principalmente durante a fase inicial do processo, enquanto, as células T CD8⁺ atuam durante toda a rejeição tumoral e, embora as células T CD4⁺ sejam importantes para induzir a atividade citotóxica específica às células T CD8⁺, a transferência de células T CD8⁺ competentes freqüentemente induz imunidade aos indivíduos receptores (MELIEF, 1992).

Muitos esforços têm sido feitos no sentido de se compreender melhor o papel dos linfócitos T, subtipos CD4⁺ e CD8⁺, no reconhecimento de antígenos tumorais, no controle do crescimento ou mesmo, na promoção da regressão de tumores (HEIKE et alii, 1996; SPEISER et alii, 1997; VIERBBOOM et alii, 1997; SHRIKANT & MESCHER, 1999 e FARRAR et alii, 1999).

Atualmente, atribui-se aos linfócitos T CD4⁺ um papel central na ativação dos mecanismos efetores de que o sistema imune dispõe para combater os tumores (TOPOLIAN, 1994; PARDOLL & TOPALIAN, 1998 e STAVELEY-O'CARROLL et alii 1998). Evidências recentes indicam que a atividade "auxiliadora" dos linfócitos T CD4⁺ depende da interação destas células com as células apresentadoras de antígenos (APCs), o que é fundamental para a apresentação dos antígenos tumorais aos linfócitos T CD8⁺ e, conseqüentemente, para a indução da atividade citotóxica destas células (linfócitos T CD8⁺ citotóxicos ou CTLs) (PARDOLL & TOPALIAN, 1998). Além disso, independentemente dos linfócitos T CD8⁺, os linfócitos T CD4⁺ ativariam outros mecanismos efetores, induzindo a produção de óxido nítrico e ânion superóxido pelos macrófagos e promovendo a degranulação de eosinófilos no local do tumor (PARDOLL & TOPALIAN, 1998). Portanto, a quantificação dos linfócitos T no sangue ou em órgãos linfóides, bem como a determinação da relação entre o número de células de cada um dos subtipos (relação CD4⁺/CD8⁺) são parâmetros importantes para a avaliação da ação coordenada destas células durante a atividade imune celular associada ao desenvolvimento de neoplasias (MELIEF, 1992). Mediante a avaliação destes parâmetros, CASTELLO et alii (1986) associaram a diminuição no número de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e da relação CD4⁺/CD8⁺ às lesões iniciais do carcinoma cervical humano, enquanto MANARA et alii (1996) encontraram um número significativamente maior de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em pacientes que responderam melhor ao tratamento quimioterápico, com a diminuição do tamanho do tumor cervical.

2. OBJETIVO

Foi proposta deste estudo investigar a participação da área septal do cérebro na modulação da resposta de linfócitos T durante o desenvolvimento subcutâneo do tumor de Walker 256. A possibilidade de ocorrer mediação neuroendócrina na modulação da resposta imunológica (via atividade eixo hipotálamo-hipófise-adrenal) foi verificada pela dosagem de corticosterona sérica. Também foi objetivo deste trabalho investigar a influência da lesão septal sobre os efeitos sistêmicos induzidos pelo tumor de Walker 256, visto a possibilidade de variações de parâmetros fisiológicos afetados durante o desenvolvimento tumoral servirem como uma indicação indireta de alterações do sistema imunológico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Em todos os experimentos realizados foram utilizados ratos albinos da linhagem Wistar fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP. Estes animais foram mantidos no biotério do Laboratório de Fisiologia Clínica do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE/FCM/UNICAMP) em gaiolas coletivas, recebendo alimento e água à vontade até a ocasião da cirurgia para lesão da área septal do cérebro, realizada na oitava semana de vida. Após o ato cirúrgico os ratos passaram a ser mantidos em gaiolas individuais e dentro das condições experimentais, conforme descrito a seguir.

3.2. Procedimento cirúrgico para lesão da área septal

Tanto a simulação cirúrgica quanto a lesão ampla da área septal do cérebro foram realizadas mediante anestesia do rato com éter etílico. Após a anestesia e tricotomia da região cirúrgica, o rato foi posicionado no aparelho de estereotaxia para pequenos animais do tipo Kriegh-Johnson. Com bisturi, fez-se uma incisão longitudinal na pele e tecido subcutâneo, afastando-se o periósteo lateralmente. Com auxílio de esferas de algodão embebidas em água oxigenada limpou-se a calota craniana, tornando evidente as suturas coronal e sagital, bem como o ponto de cruzamento entre elas, o bregma. Baseado no Atlas de PAXINOS & WATSON (1986) foram tomadas, a partir do bregma, as coordenadas para perfuração de dois orifícios na calota craniana, utilizando-se para isso as

escalas milimétricas do aparelho estereotáxico. As perfurações, feitas com broca esférica de aço, foram localizadas a partir do bregma a 1 mm de distância no sentido anterior e lateralmente a 1 mm tanto à direita como à esquerda. Através de cada um dos orifícios foi introduzida uma cânula com 1mm de diâmetro fixada ao aparelho estereotáxico, que permitiu direcioná-la para a região desejada. Utilizando-se uma inclinação ântero-posterior de 15° e lateral de 5°, ora a direita ora a esquerda, a cânula foi introduzida até uma profundidade de 7 mm em relação à calota craniana (Figura 1).

Após seu posicionamento a cânula foi conectada a uma bomba de vácuo e uma pressão negativa de 10 mm de Hg foi aplicada durante 10 segundos. Para completa lesão da área septal a profundidade da cânula foi modificada através de movimentos rápidos com amplitude de aproximadamente 1 mm durante o período de aspiração. Após este procedimento, a pele foi suturada e tratada com antisséptico. Os animais submetidos a simulação cirúrgica passaram pelo mesmo procedimento exceto pela aspiração.

3.3. Avaliação da área lesada

O controle das lesões foi realizado ao término dos experimentos, por ocasião da morte dos animais lesados, quando os cérebros foram removidos e congelados para posteriormente serem cortados em histocriótomo. Os cortes foram realizados no plano coronal com espessura de 20 a 30 μ m e corados com azul de toluidina. A extensão da lesão foi avaliada pela observação desses

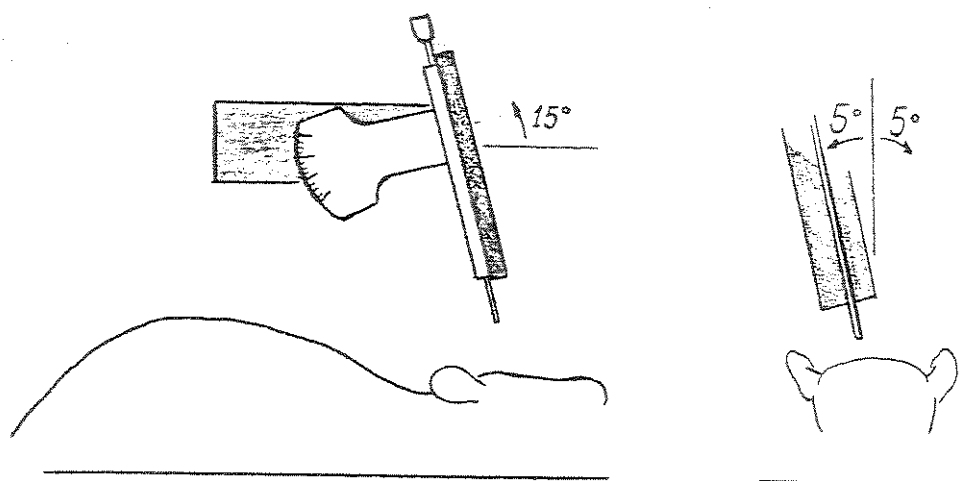
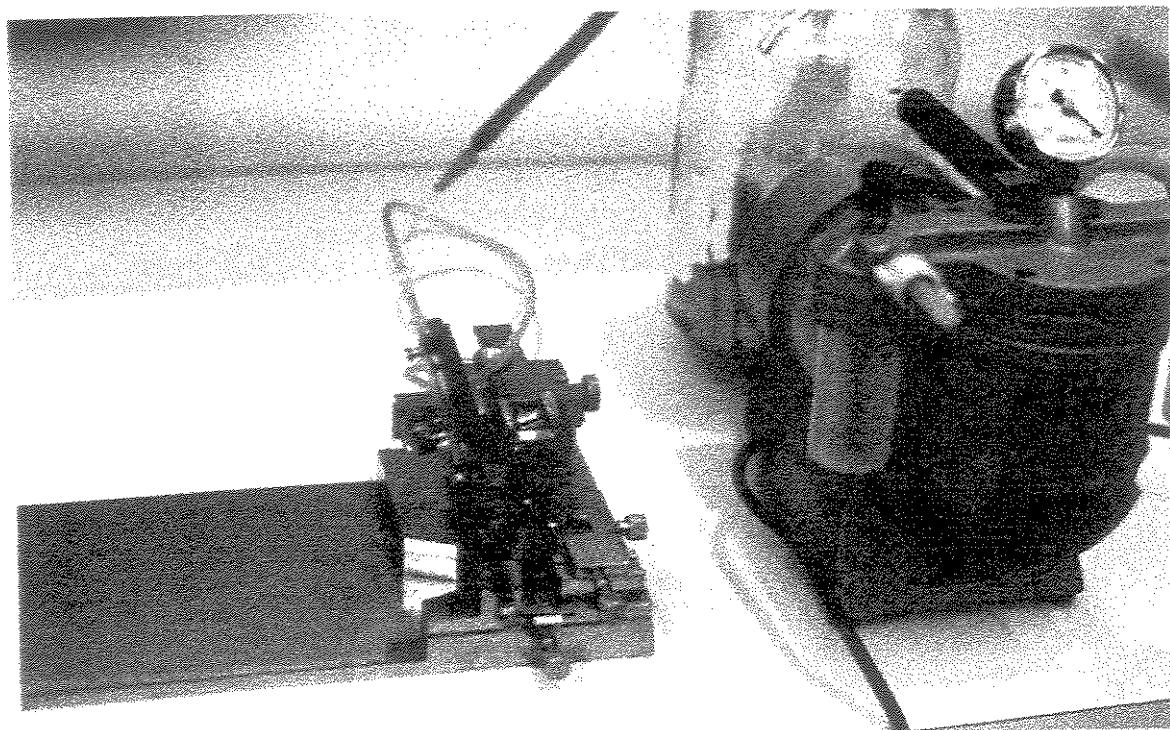


Figura 1. Aparelho estereotático e esquema do posicionamento da cânula em relação ao rato para aspiração da área septal do cérebro.

cortes em lupa estereoscópica, projetando-se a imagem da lesão sobre esquemas de planos coronais retirados do atlas de PAXINOS & WATISON (1986), segundo os níveis de observação, que variaram de -0,80 mm a 1,60 mm em relação ao bregma .

3.4. *Tumor de Walker 256, A e Ar*

As células tumorais de Walker 256 A e a subpopulação Ar crescem como células ascíticas quando inoculadas na cavidade peritoneal (via intraperitoneal, ip) de ratos, sendo facilmente mantidas através de passagens sucessivas entre indivíduos. Estas células ainda podem ser estocadas congeladas em nitrogênio líquido quando misturadas à glicerina (5:1, v/v) para posterior utilização. Para a reativação das células tumorais congeladas, todo o conteúdo de um frasco (1 mL), descongelado a temperatura ambiente, deve ser inoculado na cavidade peritoneal de um rato. A proliferação das células tumorais, que no início desse processo é mais lenta, exige pelo menos 4 passagens sucessivas entre os ratos hospedeiros para expressar o máximo da atividade proliferativa na cavidade peritoneal, quando as células tumorais passam a se duplicar a intervalos de 14 a 16 horas.

Neste trabalho, as suspensões de células tumorais de Walker 256 A ou Ar foram obtidas retirando-se líquido ascítico da cavidade peritoneal de ratos (doadores) utilizados para a manutenção dessas células tumorais. Após retirado, o líquido ascítico foi prontamente diluído em aproximadamente três vezes o seu próprio volume com solução Ringer-lactato. Tal diluição prévia previniu a

formação de coágulos, mantendo a suspensão mais homogênea. O número e a viabilidade das células tumorais foram determinados através de contagem em hemocítômetro empregando-se solução 0,01% de azul tripan e a concentração de trabalho definitiva, igual a 16×10^6 células/mL, foi preparada diluindo-se a suspensão de células tumorais em solução Ringer-lactato.

3.5. Administração das células tumorais

As células tumorais, A ou Ar de Walker 256, foram administradas através de uma ou múltiplas inoculações simultâneas de 0,25mL da suspensão de células descrita acima (4×10^6 células por sítio de inoculação) no tecido subcutâneo do dorso dos ratos (via subcutânea, sc).

A subpopulação de células tumorais e o número de inoculações usadas estão descritos a seguir no delineamento de cada experimento. A figura 2, no final deste capítulo, resume esquematicamente as principais diferenças e procedimentos adotados nestes experimentos.

3.6. Estudo da fisiopatologia e padronização do número de inoculações do tumor de Walker 256 em ratos com lesão da área septal

3.6.1. Condições experimentais

Os primeiros experimentos realizados visaram o estudo da fisiopatologia do tumor de Walker 256 em ratos com lesão septal, e ainda, através de alguns grupos experimentais pilotos, a padronização do número de inoculações com

células tumorais a serem usadas posteriormente no estudo da imunologia celular dos ratos lesados. Assim, tais experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisas Bioquímicas do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM/UNICAMP) onde, após o ato cirúrgico, os animais foram mantidos em gaiolas metabólicas, alojados em ambiente com temperatura controlada em 22 ± 1 °C, fotoperíodo de 12 horas (iluminação das 6:00 às 18:00 horas), recebendo ração para ratos Labina/Purina moída e água à vontade. Nestas condições, seguiu-se um período de 25 a 30 dias antes da inoculação das células tumorais, para recuperação pós-cirúrgica e habituação dos ratos à rotina experimental, que de outra forma poderia ser estressante para os ratos lesados (PAPLOWSKY & ISAACSON, 1990).

3.6.2. *Protocolo experimental: oito inoculações sc com tumor de Walker 256 A*

Neste experimento 39 ratos foram distribuídos em quatro grupos, sendo que, aqueles tratados com células tumorais, receberam oito inoculações sc simultâneas do tumor de Walker 256 A, como segue: grupo **SW8**, com 7 ratos cirurgia-simulada portadores de tumores; grupo **LW8**, com 15 ratos lesados portadores de tumores; grupo **SRA**, com 7 ratos cirurgia-simulada, sem tumor, submetidos à restrição alimentar; grupo **LRA**, 10 ratos lesados, sem tumor, submetidos à restrição alimentar.

A restrição da alimentação baseou-se no fornecimento de alimento aos grupos SRA e LRA, segundo a média diária de alimento ingerido pelos ratos dos grupos SW8 e LW8 durante o período de hipofagia induzida pelo tumor.

3.6.3. Protocolo experimental: uma e quatro inoculações sc com tumor de Walker 256 Ar

Este experimento foi realizado com caráter exploratório para se avaliar a evolução clínica de ratos lesados quando submetidos a uma condição de menor agressividade no que se refere à capacidade do tumor induzir os efeitos sistêmicos. Tal condição foi proporcionada pela inoculação sc da subpopulação Ar do tumor de Walker 256 em quatro grupos experimentais, como segue: grupo **SW1**, com 5 ratos cirurgia-simulada que receberam uma inoculação de células tumorais; grupo **LW1**, com 4 ratos lesados que receberam uma inoculação de células tumorais; grupo **SW4**, com 3 ratos cirurgia-simulada que receberam quatro inoculações de células tumorais; grupo **LW4**, com 4 ratos lesados que receberam quatro inoculações de células tumorais.

3.6.4. Parâmetros fisiológicos avaliados e cálculo do balanço fracional de sódio

Os ratos foram avaliados diariamente quanto ao peso corpóreo, consumo de alimento e volume de urina produzida. Também foram determinadas a osmolalidade da urina, através da variação do ponto de congelamento e a concentração de sódio na urina pela fotometria de chama.

O balanço fracional de sódio foi calculado segundo a equação

$$\frac{(Na^{+}in - Na^{+}ex) \times 100}{Na^{+}in}$$

onde Na^{+in} é a ingestão de alimento (g/dia) x o conteúdo de sódio na ração (mEq/g) e Na^{+ex} é o volume de urina (mL/dia) x a concentração de sódio (mEq/mL) determinada pela fotometria de chama.

3.6.5. Sincronização dos dados

Apesar da inoculação sc multifocal do tumor de Walker 256 proporcionar a sincronização dos efeitos sistêmicos tumorais, alguma variação temporal na evolução clínica, entre os indivíduos portadores de tumores de um mesmo grupo, ainda pode persistir. Isso ocorre em consequência dos efeitos sistêmicos não se iniciarem exatamente no mesmo dia e evoluírem muito rapidamente dividindo o período clínico em duas fases, uma moderada e outra grave, com duração variável. Com tal variação, o cálculo simples das médias a partir de dados tomados diariamente, poderia ocultar informações importantes, visto que animais de um mesmo grupo poderiam se encontrar em diferentes momentos do desenvolvimento tumoral.

Portanto, para análise conjunta de dados de um grupo experimental RETTORI et alii (1995) propuseram um método para cálculo de “médias sincronizadas”, semelhante àquele utilizado em estudos do potencial de ação de nervos ou em registros eletrocardiográficos.

A aplicação deste método na análise dos parâmetros fisiológicos de ratos portadores de tumores, depende inicialmente da identificação de pontos de sincronização. Neste trabalho quatro pontos de sincronização foram estabelecidos, como segue: 1. o dia da inoculação das células tumorais (dia 0);

2. o último dia livre dos efeitos sistêmicos, definido principalmente pelo início da anorexia; 3. o último dia com efeitos sistêmicos moderados, marcado pelo agravamento da anorexia e dos distúrbios hidrossalinos; 4. o último dia de vida.

Após estabelecidos, tais pontos de sincronização definiram os limites entre os períodos sub-clínico e clínicos, possibilitando o cálculo da duração média desses períodos, bem como das médias diárias dos parâmetros fisiológicos avaliados através de um programa de computação desenvolvido no Serviço de Processamento de Dados do CAISM.

3.6.6. Autópsias

Com a morte natural foram realizadas as autópsias dos ratos portadores de tumores para identificação de possíveis metástases e pesagem de toda massa tumoral formada.

3.7. Frequência de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ em ratos com lesão septal

3.7.1. Condições experimentais

Após a lesão cirúrgica da área septal, os ratos foram mantidos em gaiolas individuais, no biotério do Laboratório de Fisiologia Clínica no Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental (NMCE/FCM/UNICAMP). Além das condições de temperatura de 25 ± 1 °C, fotoperíodo de 12 horas (iluminação das 6:00 às 18:00 horas) e fornecimento de alimento (ração Purina) e água à vontade, foram tomados cuidados especiais quanto aos horários e circulação de pessoas no

biotério para que se estabelecesse uma rotina rigorosa. Todos os procedimentos de tratamento e coleta de dados foram realizados diariamente no período das 7:30 às 9:00 horas pela mesma pessoa. Nestas condições, seguiu-se um período de 25 a 30 dias antes da inoculação das células tumorais.

3.7.2. Protocolo experimental

Neste experimento 51 ratos foram distribuídos em quatro grupos, sendo que, aqueles tratados com células tumorais, receberam uma única inoculação sc da subpopulação *Ar* do tumor de Walker 256, como segue: grupo **SW**, 13 ratos cirurgia-simulada e portadores de tumor; grupo **LW**, 14 ratos com lesão septal e portadores de tumor; grupo **S**, 12 ratos cirurgia-simulada (sem tumor); grupo **L**, 12 ratos com lesão septal (sem tumor).

3.7.3. Experimento com ratos adrenalectomizados

Após concluídos os grupos S, L, SW e LW, um experimento com ratos adrenalectomizados foi proposto para se verificar a influência da corticosterona na resposta de linfócitos T e no crescimento tumoral.

Este experimento foi realizado no biotério do Laboratório de Pesquisas Bioquímicas (CAISM/UNICAMP), onde 11 ratos controles (grupo **CW**) e 16 ratos adrenalectomizados cirurgicamente (grupo **AW**) foram mantidos sob condições de temperatura controlada em 22 ± 1 °C, fotoperíodo de 12 horas (iluminação das 6:00 às 18:00 horas), recebendo ração para ratos Labina/Purina e água à vontade, exceto os ratos adrenalectomizados que receberam solução salina 1%.

Porém, ao contrário do experimento anterior com ratos lesados, nenhum procedimento especial foi adotado para se evitar estímulos nocivos que levassem ao aumento da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e, conseqüentemente, ao aumento da liberação de corticosterona. Após cinco dias da adrenalectomia todos os ratos receberam uma única inoculação sc das células tumorais de Walker 256 Ar.

3.7.4. Parâmetros avaliados durante o crescimento dos tumores

Os ratos foram avaliados diariamente quanto ao peso corpóreo, dimensões e grau de aderência dos tumores à musculatura dorsal dos hospedeiros. O diâmetro percutâneo dos tumores, obtido diariamente pelo cálculo da média entre a maior dimensão do tumor e sua medida transversal, possibilitou a estimativa do peso tumoral, dada por uma curva empírica que relaciona dimensão do tumor (mm) ao seu peso (g) (Anexo 1). Possíveis correções nas curvas de crescimento foram realizadas após as autópsias, quando os tumores foram dissecados e pesados. Tais procedimentos permitiram diferenciar tumores instalados, em franco crescimento, daqueles que após alguns dias de crescimento passaram a regredir.

O peso médio dos tumores foi calculado para os ratos de um mesmo grupo experimental, porém, separando-se aqueles que apresentaram tumores crescendo continuamente daqueles com regressão tumoral. As médias foram obtidas através do cálculo de médias sincronizadas dos dados obtidos diariamente. Para isso, foram estabelecidos os seguintes pontos de

sincronização: 1. o dia da inoculação das células tumorais; 2. o primeiro dia da detecção do tumor pela palpação; 3. o dia em que o tumor atingiu o peso de 1g; 4. o dia que o tumor passou a regredir; 5. o último dia de vida.

3.7.5. Coleta do sangue e baço

Definida a situação do crescimento ou da regressão dos tumores (a partir do décimo quarto dia após a inoculação sc do tumor) os ratos passaram a ser sacrificados. Assim, sempre ao redor das 8:00 horas, cada rato por sua vez, foi retirado do biotério, levado ao laboratório, anestesiado com éter etílico para coleta de sangue, através de punção cardíaca e remoção cirúrgica do baço. Para se prevenir a elevação da corticosterona causada pela mudança de ambiente, anestesia com éter e o próprio manuseio dos ratos, todo o procedimento (desde a retirada do animal do biotério até o término da coleta de sangue) foi realizado em no máximo 90 segundos.

Após este procedimento, seguiu-se a autópsia dos animais experimentais, quando foram removidos e pesados o timo, o baço, as adrenais e toda massa tumoral. Os valores foram indicados como peso relativo do órgão ($\text{peso do órgão (g)} \times 100 / \text{peso corpóreo (g)}$). Possíveis metástases em linfonodos foram verificadas nesta ocasião.

3.7.6. Determinação das subpopulações de linfócitos T no baço

As subpopulações de linfócitos T, CD4⁺ e CD8⁺, presentes no baço foram determinadas pela técnica de imunofluorescência indireta, segundo descrito por SHU e colaboradores (1993).

3.7.6.1. Preparação do tecido

Após a remoção do baço, o órgão inteiro foi homogeneizado pressionando-o através de uma peneira de aço inoxidável com um êmbolo de seringa. O tecido homogeneizado foi recolhido em uma placa de Petri mantida sobre gelo moído, contendo meio RPMI-1640 (Sigma Chemical Co., St Louis, MO). A suspensão celular foi transferida para um tubo de ensaio contendo 10 mL de meio RPMI-1640 gelado e centrifugada a 150 x g por 10 minutos a 4 °C (centrífuga Beckman J2-21, rotor JS7.5).

O sobrenadante foi descartado vertendo-se o tubo de ensaio e o precipitado celular foi ressuspenso em 10 mL de solução de lise (NH₄Cl 0,144 M, Tris 0,017 M, pH 7,4). Para uma lise satisfatória das hemácias esta suspensão foi mantida por 12 a 15 minutos em banho de gelo. Após este período, a suspensão celular foi centrifugada a 150 x g por 10 minutos a 4 °C e o precipitado de esplenócitos obtido foi lavado 2 vezes com meio RPMI-1640 a 150 x g por 10 minutos a 4 °C. Após a última centrifugação os esplenócitos foram ressuspenso em 1 a 2 mL de meio RPMI-1640 e o número e a viabilidade das células foi determinado em hemocítômetro, através da exclusão do corante de azul tripam.

3.7.6.2. *Contagem das subpopulações de linfócitos T*

Conhecidos o número e a viabilidade das células na suspensão de esplenócitos, 2×10^6 células foram transferidas para microtubos (eppendorf 1,5 mL) e lavadas com meio RPMI-1640 a $150 \times g$ por 10 minutos a 4°C (centrífuga Beckman J2-21, rotor JS7.5 com adaptador para microtubos).

As células esplênicas foram ressuspensas suavemente em $50\ \mu\text{L}$ do anticorpo monoclonal para linfócitos T CD4^+ (mouse anti-rat CD4 IgG, Serotec-MCA55G) diluído 1:35 em meio RPMI-1640, ou em $50\ \mu\text{L}$ do anticorpo monoclonal para linfócitos T CD8^+ (mouse anti-rat CD8 IgG, Serotec-MCA48G) diluído 1:50 em meio RPMI-1640. O ensaio foi realizado em triplicata para cada um dos anticorpos. Após um período de incubação de 30 minutos no escuro a 4°C , os microtubos foram centrifugados e as células lavadas uma vez com meio RPMI-1640 a $150 \times g$ por 10 minutos a 4°C .

A seguir, as células foram incubadas por 30 minutos no escuro, a 4°C , com $50\ \mu\text{L}$ do anticorpo de detecção conjugado com fluoresceína (Sheep FITC conjugated anti mouse IgG, Sigma-F2266) diluído 1:50 em meio RPMI-1640. Ao término do período de incubação, as células foram lavadas uma vez com meio RPMI-1640 a $150 \times g$ por 10 minutos a 4°C para remoção do excesso de anticorpo não ligado. As células foram então ressuspensas em $50\ \mu\text{L}$ de soro bovina fetal, mantidos em banho de gelo e protegidas da luz até o momento da microscopia.

A contagem das células totais e marcadas foi realizada em microscópio de fluorescência (filtro 510-560, FT580, LP590) a partir de montagens a fresco, com aproximadamente 25 μ L das suspensões celulares sendo colocadas entre lâmina e lamínula. O percentual de células marcadas foi determinado após a contagem de pelo menos 250 células totais por lâmina.

3.7.7. Corticosterona

As concentrações séricas da corticosterona foram determinadas por radioimunoensaio (RIA). Este ensaio baseia-se na reação de competição entre o hormônio presente no soro (concentração desconhecida) e o hormônio marcado com isótopo de hidrogênio, trício (^3H), pelo sítio de ligação a um anticorpo anti-corticosterona.

O complexo antígeno-anticorpo foi precipitado, separado das formas livres e a radioatividade medida em contador de radiação β . Os valores das dosagens foram obtidos pela interpolação dos valores de radiação emitida do hormônio marcado, expressos em contagem por minuto (CPM), em uma curva padrão. Esta curva foi obtida pelo radioimunoensaio de alíquotas de corticosterona com concentrações conhecidas, relacionando radiação expressa em CPM e a concentração em ng/mL. Foram utilizadas soluções padrões com concentrações de 0,1, 0,5, 2,5, 10, 50 e 250 ng/mL. O coeficiente de variação entre os diferentes ensaios realizados foi de 11,56% e o coeficiente de variação intra-ensaio foi de 4,0 %.

3.8. *Análise estatística*

Os resultados foram expressos através da média $\pm$ erro padrão da média. Cada variável estudada foi avaliada, primeiramente, quanto a distribuição normal dos dados obtidos, através da comparação gráfica dos desvios das médias (resíduos) em relação a uma curva padrão (distribuição normal) estimada a partir do valor de z , e ainda, quanto a homogeneidade das variâncias, através do teste de Levene's. Uma vez satisfeitas as pressuposições de distribuição normal e, principalmente, homogeneidade das variâncias (homocedasticidade) para o parâmetro estudado (VIEIRA & HOFMANN, 1989), adotou-se o teste t student para comparação da diferença entre médias de dois tratamentos, ou a análise de variância (ANOVA) entre médias de vários tratamentos, seguida do teste LSD (diferença mínima significativa). Por outro lado, na ausência de homocedasticidade empregou-se o teste de Kruskal-Wallis seguido da comparação múltipla de distribuição livre (GAD & WEIL, 1989) para a identificação dos tratamentos com diferença significativa. Para a análise estatística de retas de regressão utilizou-se o teste F de Durbin-Watson. O nível de significância adotado foi de 5% ($P < 0,05$). Os programas utilizados foram: Statistica for Windows (Copyright ©1990-1995 Microsoft Corporation-StatSoft, Inc.1995) e Microstat.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

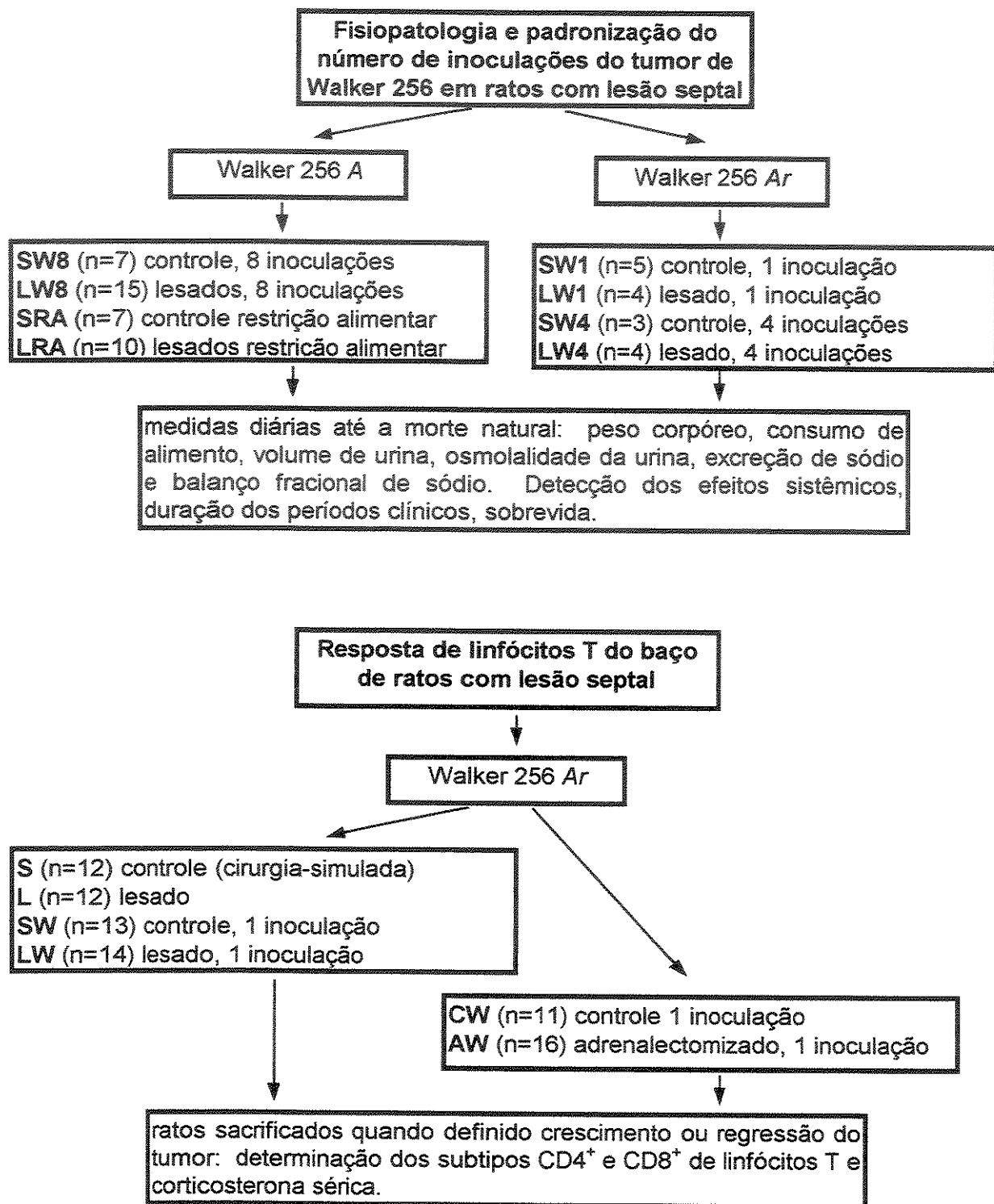


Figura 2. Esquema resumindo os grupos experimentais e os principais procedimentos adotados para cada um destes grupos.

4. RESULTADOS

4.1. Lesão da área septal

Conforme esperado, a lesão provocada pela aspiração cirúrgica da área septal do cérebro foi bastante abrangente. A figura 3 ilustra o aspecto mais frequente da lesão indicando, esquematicamente, a extensão rostro-caudal com as principais estruturas incluídas na área lesada, como o núcleo septal medial e os núcleos septais laterais dorsal, intermediário e ventral. Também foram lesados o núcleo septo-hipotalâmico, núcleo septo-hipocampal e parcialmente, a projeção septal do fórnix. O limite posterior máximo da lesão ficou localizado nos núcleos septo-fimbrial e septo-triangular. Em vários animais pequena porção do corpo caloso e putamen caudato também foram lesadas, sendo estas estruturas respectivamente os limites superior e lateral da área lesada.

4.2. Aspectos fisiopatológicos e padronização do número de inoculações com o tumor de Walker 256 em ratos com lesão da área septal do cérebro

4.2.1. Evolução dos tumores e dos efeitos sistêmicos em ratos lesados com oito inoculações do tumor de Walker 256 A

A partir da inoculação subcutânea, as células tumorais de Walker 256 A cresceram continuamente, o que foi confirmado, após 2 ou 3 dias, pela palpação de pequenos nódulos (menores do que 8 mm) nos sítios de inoculação.

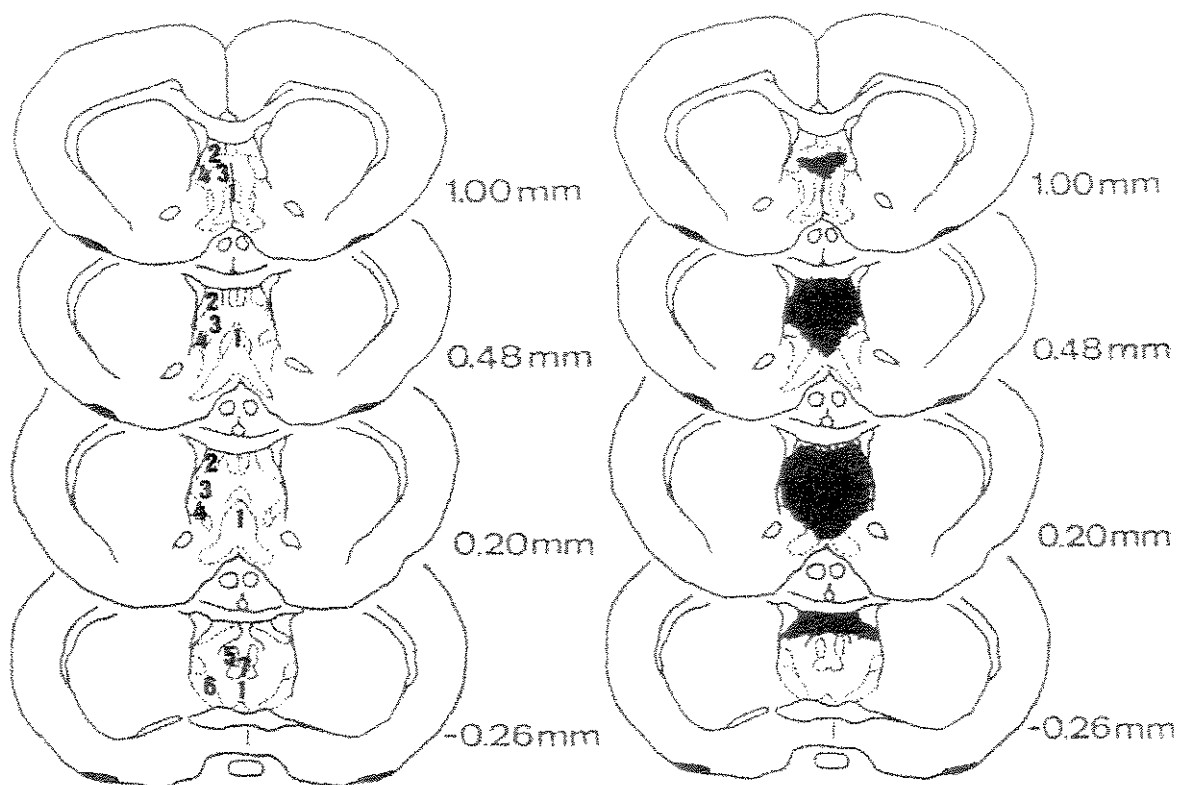


Figura 3. No alto, seção coronal (20-30 μ m) do cérebro de rato lesado, corado com azul de toluidina, seguido pela representação esquemática de diferentes planos do cérebro (-0,26 mm a 1,00 mm em relação ao bregma) indicando a extensão rostro-caudal da área lesada. A lesão incluiu o núcleo septal medial (1), os núcleos septais lateral dorsal (2), intermediário (3) e ventral (4), o núcleo septo-fimbrial (5), o núcleo septo-hipotalâmico (6), o núcleo septal triangular (7) e a projeção septal do fornix.

A evolução clínica subsequente seguiu o padrão não linear semelhante àquele conhecido para ratos submetidos à múltiplas inoculações do tumor de Walker 256, independentemente do grupo experimental considerado. Assim, tanto nos ratos com a área septal do cérebro lesada (LW8) como nos controles (SW8), o período inicial de crescimento dos tumores ocorreu livre de efeitos sistêmicos (período sub-clínico, sCP), passando subitamente a um período sintomático (período clínico, CP). A tabela 1 mostra a duração média em dias destes dois períodos.

Tabela 1. Duração média em dias do período sub-clínico (sCP), período clínico (CP) e sobrevida (SV) de ratos que receberam oito inoculações subcutâneas do tumor de Walker 256 A (4×10^6 cél/inoculação). Grupos controle cirurgia simulada (SW8) e com lesão da área septal do cérebro (LW8).

	Tempo (dias)	
	SW8 (n = 7)	LW8 (n = 15)
SCP	3,0±0,2 ^a	2,6±0,1 ^a
CP	7,7±0,6 ^a	7,0±0,3 ^a
SV	10,7±0,6 ^a	9,6±2,5 ^a

Médias na mesma linha, seguidas de letras distintas, diferem significativamente ($P < 0,05$); teste LSD.

O início do CP ocorreu entre o segundo e terceiro dia após a inoculação das células tumorais, quando se desenvolveram alterações em mecanismos homeostáticos fundamentais, caracterizando os efeitos patognomônicos do tumor de Walker 256 com inibição do apetite, paradoxalmente acompanhado do ganho de peso corpóreo, causado pela retenção de sódio e água. A manifestação súbita e progressiva destas alterações estão indicadas na figura 4. A ingestão média diária de alimento é dada pelos grupos cirurgia simulada (SRA) e lesado (LRA) sem tumor e submetidos a restrição alimentar (Figura 4 B), pois estes grupos refletem a ingestão de alimento tanto do grupo SW8 quanto do LW8.

Durante o sCP (até o dia 3) a ingestão de alimento permaneceu estável passando a diminuir progressiva e irreversivelmente durante o CP (a partir do dia 3). Apesar da redução na ingestão de alimento ter sido idêntica para todos os grupos experimentais, os ratos dos grupos SRA e LRA perderam peso, enquanto os ratos dos grupos SW8 e LW8 (portadores de tumores) apresentaram ganho de peso corpóreo (Figura 4 A). Durante o CP também ocorreu a diminuição da concentração de sódio na urina dos ratos (Figura 4 C). Entretanto, diferente do que foi observado nos ratos submetidos à restrição alimentar, ou seja, redução da concentração de sódio na urina em decorrência do agravamento do período de hipofagia nos últimos dias do CP, nos ratos com tumores esta redução da concentração de sódio foi antecipada. Além disso, a redução da concentração de sódio na urina dos ratos do grupo LW8 não foi tão acentuada quanto a do grupo SW8, com diferença significativa durante o início do CP (dias 4, 5 e 6).

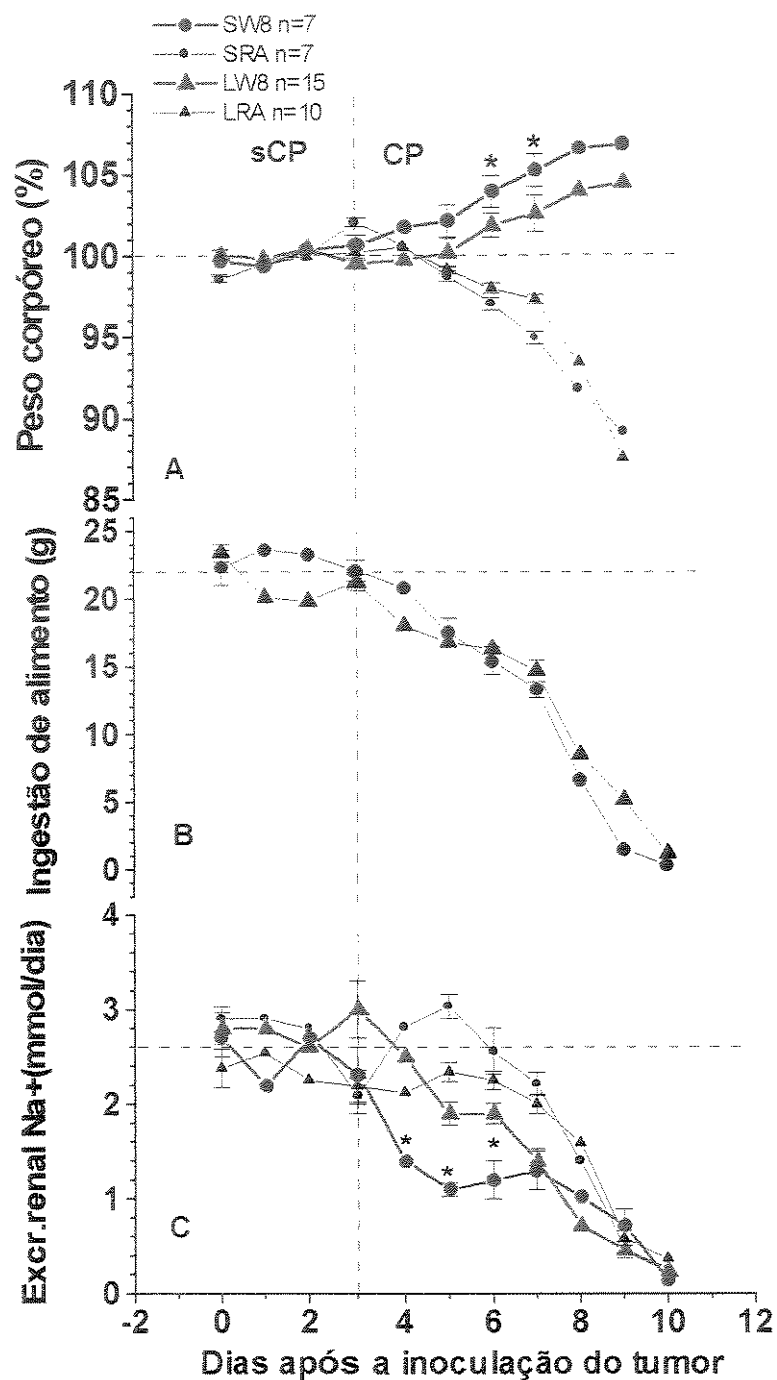


Figura 4. Alterações do peso corpóreo e da excreção renal de Na⁺ em ratos portadores de oito inoculações sc do tumor de Walker 256 A (4×10^6 cél./inoculação) grupos cirurgia simulada (SW8) e com lesão septal (LW8), comparados com ratos controles, sem tumor e submetidos a restrição alimentar, grupos cirurgia simulada (SRA) e com lesão septal (LRA). A ingestão média diária de alimento é dada pelos grupos SRA e LRA. * indica diferença significativa ($P < 0,05$, teste LSD) entre os grupos LW8 e SW8.

O ganho de peso corpóreo dos ratos do grupo LW8, também não foi tão acentuado quanto aquele do grupo SW8 sendo esta diferença significativa no sexto e sétimo dia após a inoculação das células tumorais (Figura 4 A).

As tabelas 2 e 3 resumem os resultados do peso corpóreo e da concentração de sódio na urina dos ratos dos grupos SW8 e LW8, os quais foram comparados aos respectivos grupos controles submetidos à restrição alimentar (SRA e LRA). Assim, o grupo SW8 apresentou diferenças significativas em relação ao grupo SRA a partir do quinto dia para o peso corpóreo (Tabela 2) e quarto dia para a excreção de sódio (Tabela 3), enquanto com o grupo LW8 tais diferenças (LW8 em relação ao LRA) só ocorreram a partir do sexto dia para o peso corpóreo (Tabela 2) e sétimo dia para a excreção de sódio (Tabela 3).

4.2.2. Balanço de Sódio

Antes do início dos efeitos sistêmicos, a partir do terceiro dia, a filtração renal de sódio dos ratos que receberam oito inoculações do tumor de Walker 256 A, grupos LW8 e SW8, não foi diferente daquela observada nos ratos submetidos a restrição alimentar, grupos SRA e LRA (Figura 5). Durante este período (sCP) o balanço fracional de sódio foi aproximadamente de 25%, indicando que cerca de 75% do sódio ingerido foi excretado através dos rins.

Tabela 2. Peso corpóreo (%), de ratos portadores de oito inoculações sc do tumor de Walker 256 A (4×10^6 cél./inoculação), grupos cirurgia simulada (SW8) e com lesão septal (LW8), comparados com ratos controles, sem tumor e submetidos a restrição alimentar, grupos cirurgia simulada (SRA) e com lesão septal (LRA).

Dia	Peso corpóreo (%)			
	SW8 (N = 7)	SRA (N = 7)	LW8 (N = 15)	LRA (N = 10)
4	101,8±0,6 ^a	100,5±0,4 ^{ab}	99,8±0,5 ^b	100,5±0,4 ^{ab}
5	102,2±1,0 ^a	98,7±0,3 ^b	100,2±0,9 ^{ab}	99,2±0,2 ^b
6	104,0±1,0 ^a	97,1±0,3 ^c	101,9±0,7 ^b	98,1±0,3 ^c
7	105,3±1,1 ^a	95,3±0,3 ^c	102,7±1,1 ^b	97,4±0,3 ^c

Médias na mesma linha, seguidas de letras distintas, diferem significativamente ($P < 0,05$); teste LSD.

Tabela 3. Excreção renal de sódio (mmol/dia), de ratos portadores de oito inoculações sc do tumor de Walker 256 A (4×10^6 cél./inoculação), grupos cirurgia simulada (SW8) e com lesão septal (LW8), comparados com ratos controles, sem tumor e submetidos a restrição alimentar, grupos cirurgia simulada (SRA) e com lesão septal (LRA).

Dia	Excreção renal de Na ⁺ (mmol/dia)			
	SW8 (N = 7)	SRA (N = 7)	LW8 (N = 15)	LRA (N = 10)
4	1,4±0,2 ^c	2,8±0,2 ^a	2,6±0,2 ^{ab}	2,1±0,1 ^b
5	1,1±0,41 ^c	2,8±0,2 ^a	1,9±0,1 ^b	2,3±0,1 ^b
6	1,3±0,2 ^c	2,5±0,2 ^a	1,8±0,1 ^b	2,2±0,1 ^{ab}
7	1,3±0,2 ^b	2,2±0,1 ^a	1,4±0,1 ^b	2,1±0,1 ^a

Médias na mesma linha, seguidas de letras distintas, diferem significativamente ($P < 0,05$); teste LSD.

Após o terceiro dia, quando os efeitos sistêmicos passaram a se manifestar nos ratos portadores de oito inoculações do tumor de Walker 256 A e, conseqüentemente, com a diminuição da ingestão de alimento, as diferenças na filtração renal de sódio tornaram-se bastante claras entre os grupos SW8, LW8 e os grupos submetidos a restrição da alimentação, SRA e LRA.

Nos grupos SRA e LRA o balanço fracional de sódio diminuiu, indicando que a fração de sódio ingerido que passou a ser excretada pelos rins aumentou, chegando a valores maiores que 100% após o sétimo dia (Figura 5). Este aumento progressivo da excreção renal de sódio em ratos sob restrição alimentar representa a resposta fisiológica esperada em virtude da diminuição do peso corpóreo destes animais.

Por outro lado, nos ratos SW8 e LW8 foi observada uma resposta diferente da fisiológica, quando o balanço fracional de sódio passou a aumentar, indicando a diminuição da fração de sódio excretada pelos rins até valores próximos a 40% (Figura 5, dia 8). Entretanto, este aumento do balanço fracional de sódio foi diferente entre os grupos LW8 e SW8 durante o início do CP. Neste sentido, foi observado que o grupo SW8 passou a ser significativamente diferente de seu grupo controle sem tumor e submetidos a restrição alimentar, grupo SRA, a partir do quarto dia após a inoculação das células tumorais ($SW8 = 47,6 \pm 6,4\%$ e $SRA = 4,5 \pm 8,3\%$, $P < 0,05$), enquanto que com o grupo LW8 isso somente aconteceu em relação ao grupo LRA, a partir do quinto dia ($LW8 = 25,7 \pm 4,8\%$ e $LRA = 10,5 \pm 3,9\%$; $P < 0,05$). Além disso, o balanço fracional de sódio do grupo LW8 foi significativamente menor que o do grupo SW8 entre o quarto e sexto dia após a

inoculação das células tumorais (dia 4: SW8 = $47,6 \pm 6,4\%$ e LW8 = $13,8 \pm 5,2\%$; dia 5: SW8 = $57,5 \pm 3,5\%$ e LW8 = $25,7 \pm 4,8\%$; dia 6: SW8 = $54,4 \pm 3,8\%$ e LW8 = $32,1 \pm 4,4\%$; $P < 0,05$) (Figura 5).

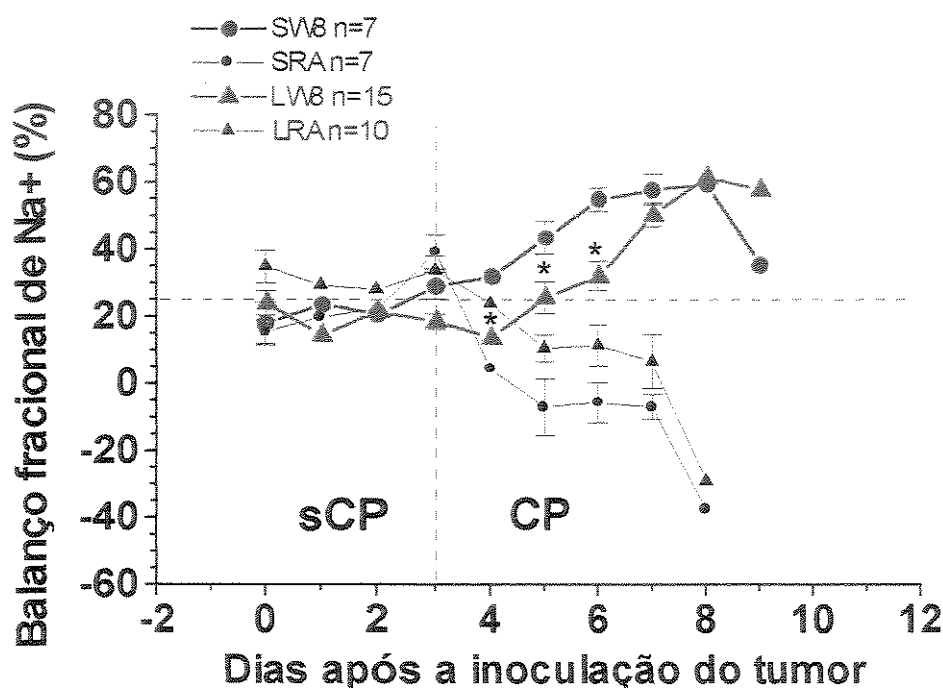


Figura 5. Balanço fracional de sódio em ratos portadores de oito inoculações sc do tumor de Walker 256 A (4×10^6 cél./inoculação), grupos cirurgia simulada (SW8) e com lesão septal (LW8), comparados com ratos controles, sem tumor e submetidos a restrição alimentar, grupos cirurgia simulada (SRA) e com lesão septal (LRA). O balanço fracional de sódio foi calculado como $(Na^{+in} - Na^{+ex}) \times 100 / Na^{+in}$, onde Na^{+in} é a ingestão de alimento (g/dia) x o conteúdo de sódio na ração (mEq/g) e Na^{+ex} é o volume de urina (mL/dia) x a concentração de sódio na urina (mEq/mL). * indica diferença significativa ($P < 0,05$, teste LSD) entre os grupos LW8 e SW8.

4.2.3. Balanço de água

Uma evidência indireta de alterações no balanço de água acompanhando a retenção de sódio nos ratos com tumores foi obtida pela análise da variação do peso corpóreo e do volume de urina. Assim, os ratos submetidos a restrição alimentar, grupos SRA e LRA, apresentaram aumento do volume diário de urina durante o CP, em consequência da diminuição do peso corpóreo observado nestes animais (Figura 6). Já nos ratos portadores do tumor de Walker 256 A, embora a produção diária de urina tenha sido significativamente reduzida no grupo SW8 (até -0,85 mL/100g do peso corpóreo) e aumentada no grupo LW8 (até 4,5 mL/100g do peso corpóreo) (Figura 6), ambos os grupos apresentaram aumento do peso corpóreo, indicando retenção hídrica.

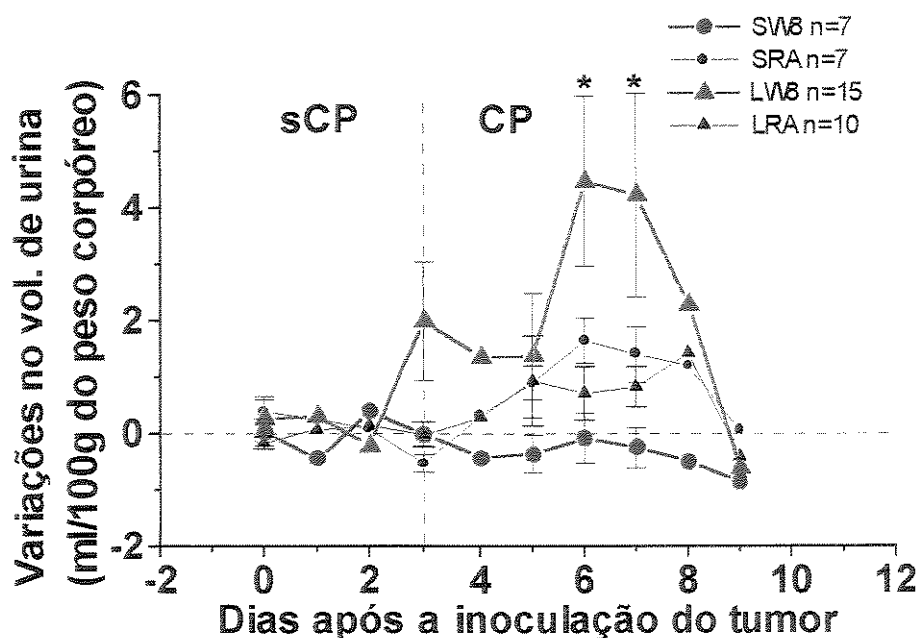


Figura 6. Variação do volume de urina em ratos portadores de oito inoculações sc do tumor de Walker 256 A (4×10^6 cél./inoculação), grupos cirurgia simulada (SW8) e com lesão septal (LW8), comparados com ratos controles, sem tumor e submetidos a restrição alimentar, grupos cirurgia simulada (SRA) e com lesão septal (LRA). * indica diferença significativa ($P < 0,05$, teste LSD) entre os grupos LW8 e SW8.

O fenômeno da retenção hídrica dos ratos portadores de tumores, bem como a diminuição temporária na retenção hídrica dos animais com lesão da área septal foi representado na figura 7, ao se subtrair do peso corpóreo médio (%) dos grupos SW8 e LW8 os pesos corpóreos médios (%) dos grupos SRA e LRA (SW8 menos SRA e LW8 menos LRA) apresentados na figura 4.

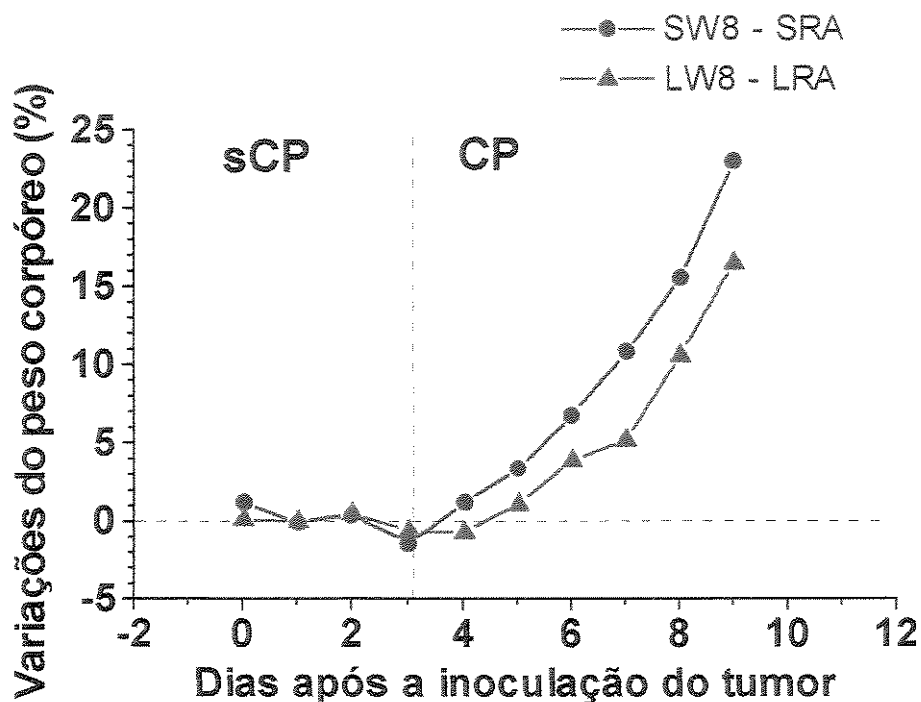


Figura 7. Retenção hídrica dos grupos SW8 e LW8, representada pelos valores obtidos com a subtração do peso corpóreo (%) dos grupos submetidos à restrição alimentar do peso corpóreo (%) dos grupos com tumores: SW8 - SRA e LW8 - LRA.

4.2.4. Excreção osmolar

A excreção osmolar foi determinada no sentido de se detectar possíveis alterações no balanço glomérulo-tubular dos ratos com lesão septal e portadores de múltiplas inoculações do tumor de Walker 256 A. Na tabela 4 encontram-se os valores médios da excreção osmolar durante o sCP e o CP dos grupos SRA, LRA, SW8 e LW8.

Não houve variação significativa na excreção osmolar entre os períodos sCP e CP, afastando a possibilidade de que alterações no balanço glomérulo-tubular pudessem justificar a menor reabsorção de sódio dos ratos lesados em relação aos controles portadores de tumor durante o CP.

Tabela 4. Comparação da excreção osmolar (mOsm/dia) entre os períodos clínico (CP, média dos valores obtidos entre os dias 5 a 7) e sub-clínico (sCP) de ratos portadores de oito inoculações sc do tumor de Walker 256 A (4×10^6 cél./inoculação), grupos cirurgia simulada (SW8) e com lesão septal (LW8), além de ratos controles, sem tumor e submetidos a restrição alimentar, grupos cirurgia simulada (SRA) e com lesão septal (LRA).

	Excreção osmolar (Mosm / dia)	
	SCP	CP
SW8 (n = 7)	35,2±2,1 ^a	33,3±2,9 ^a
SRA (n = 7)	35,4±2,8 ^a	36,3±2,3 ^a
LW8 (n = 15)	45,3±2,1 ^a	41,3±1,6 ^a
LRA (n = 10)	32,6±2,1 ^a	31,1±1,7 ^a

Médias na mesma linha, seguidas de letras distintas, diferem significativamente ($P < 0,05$); teste LSD.

4.2.5. Evolução dos tumores e dos efeitos sistêmicos em ratos lesados com uma ou quatro inoculações do tumor de Walker 256 Ar (experimentos pilotos)

A instalação e o crescimento da subpopulação *Ar* do tumor de Walker 256 foram confirmados tanto nos grupos cirurgia-simulada (SW1 e SW4) como nos grupos lesados (LW1 e LW4), entre o quarto e quinto dia após a administração das células tumorais, independentemente do número de inoculações sc (se uma ou quatro inoculações) utilizadas. Nesta ocasião, pequenos nódulos (menores que 8 mm) passaram a ser palpados nos sítios de inoculação das células tumorais, com exceção de um rato do grupo SW4, no qual apenas um nódulo (entre quatro inoculações) foi detectado. Após aproximadamente 19 dias de crescimento, com os tumores atingindo em média 30 mm de diâmetro (aproximadamente 6,2g), foram detectadas regressões tumorais em 80% dos ratos controles e 25% dos ratos lesados portadores de um único tumor. No grupo LW1, além do reduzido percentual de regressão tumoral, houve o desenvolvimento dos efeitos sistêmicos, ou seja do CP, em um dos ratos, a partir do décimo dia após a inoculação das células tumorais.

A tabela 5 mostra a duração média em dias dos períodos clínicos para os grupos LW4 e SW4. Em todos os ratos portadores de quatro tumores de Walker 256 *Ar* a evolução clínica seguiu o padrão não linear já descrito, com o início do CP ocorrendo entre o oitavo e décimo dia após a inoculação das células tumorais.

Tabela 5. Duração média em dias do período sub-clínico (sCP), período clínico (CP) e sobrevida (SV) de ratos que receberam quatro inoculações subcutâneas do tumor de Walker 256 Ar (4×10^6 cél/inoculação). Grupos controle (CW4) e com lesão da área septal do cérebro (LW4).

	Tempo (dias)	
	SW4 (n = 3)	LW4 (n = 4)
SCP	9,0±1,0 ^a	10,0±0,0 ^a
CP	11,5±0,5 ^a	11,2±1,9 ^a
SV	20,5±1,5 ^a	21,2±1,9 ^a

Médias na mesma linha, seguidas de letras distintas, diferem significativamente ($P < 0,05$); teste LSD.

4.2.6. Autópsias dos ratos com múltiplas inoculações (Walker 256 A e Ar)

As autópsias dos ratos portadores de múltiplas inoculações do tumor de Walker 256 revelaram o predomínio de metástases incipientes em linfonodos axilares e inguinais. Em vários ratos, principalmente dos grupos que receberam quatro inoculações do tumor de Walker 256 Ar também foram encontradas metástases na região do pericárdio, em linfonodos próximos ao timo e na cavidade abdominal, em linfonodos da cadeia para-aórtica, porém com tamanho muito reduzido, inviabilizando qualquer ação mecânica capaz de prejudicar a função de órgãos próximos. A massa tumoral total, retirada da região dos sítios de inoculação das células tumorais na ocasião das autópsias, foi de aproximadamente 8% do peso corpóreo dos ratos (SW8=8,9% $\pm$ 2,1, LW8=7,9% $\pm$ 1,0, SW4=6,5% $\pm$ 5,0 e LW4=9,0% $\pm$ 0,7).

4.3. Influência da lesão septal sobre os Linfócitos T no baço de ratos durante o crescimento do tumor de Walker 256 Ar

4.3.1. Determinação do crescimento e regressão dos tumores

Os tumores do grupo cirurgia simulada (SW) e do grupo com lesão septal (LW) tornaram-se palpáveis entre o terceiro e quinto dia após a inoculação única das células tumorais de Walker 256 da subpopulação Ar, quando passaram a ser medidos diariamente para estimativa do peso tumoral. Assim, após um período de aproximadamente duas semanas com crescimento contínuo de todos os tumores, foram identificadas duas populações distintas entre os ratos de ambos os grupos. Uma população na qual os tumores passaram a regredir, enquanto que na outra continuaram a crescer. As figuras 8 e 9 mostram as curvas de peso médio dos tumores dos grupos SW e LW, respectivamente, e permitem a visualização das situações de regressão ou não regressão dos tumores. Por volta do décimo quarto dia foram detectadas regressões em 6 ratos (46,2 %) do grupo SW, quando o peso médio dos tumores havia atingido $2,4\text{g} \pm 0,7$ (Figura 8), enquanto no grupo LW ocorreram regressões tumorais em 8 ratos (57,1 %), quando o peso médio dos tumores havia atingido $3,1\text{g} \pm 0,7$ (Figura 9). Além disso, os resultados indicados na tabela 6 mostram diferenças no período de crescimento dos tumores que regrediram em relação aos que não regrediram.

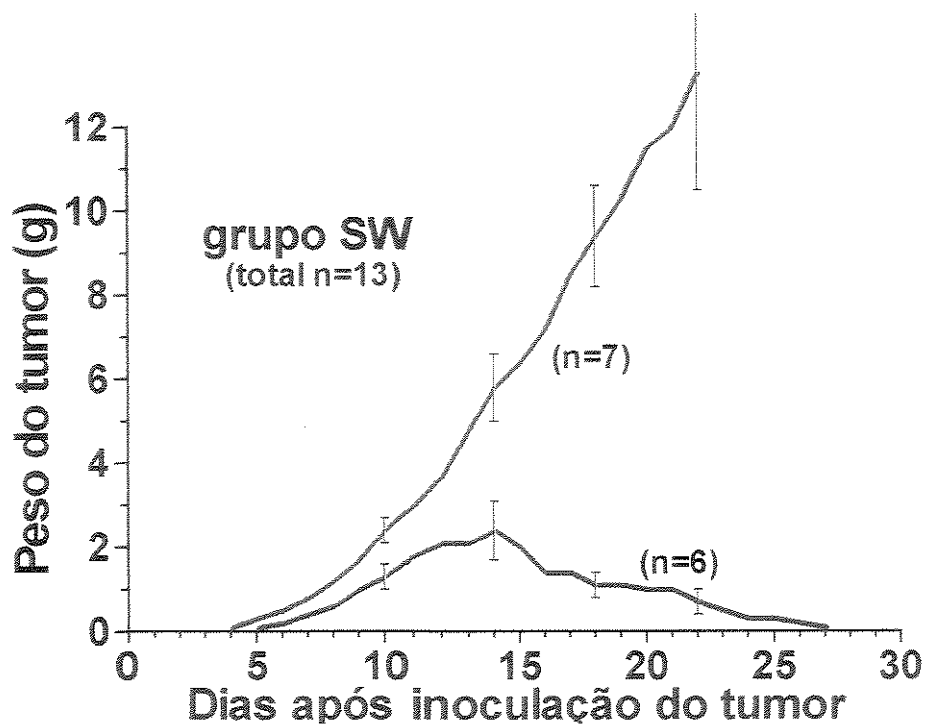


Figura 8. Peso médio dos tumores nos ratos do grupo cirurgia simulada com uma inoculação sc de células tumorais de Walker 256 Ar (4×10^6 cél) (SW, n=13). A estimativa diária do peso tumoral permitiu detectar ratos com tumores em regressão (n=6) ou crescimento tumoral contínuo (n=7).

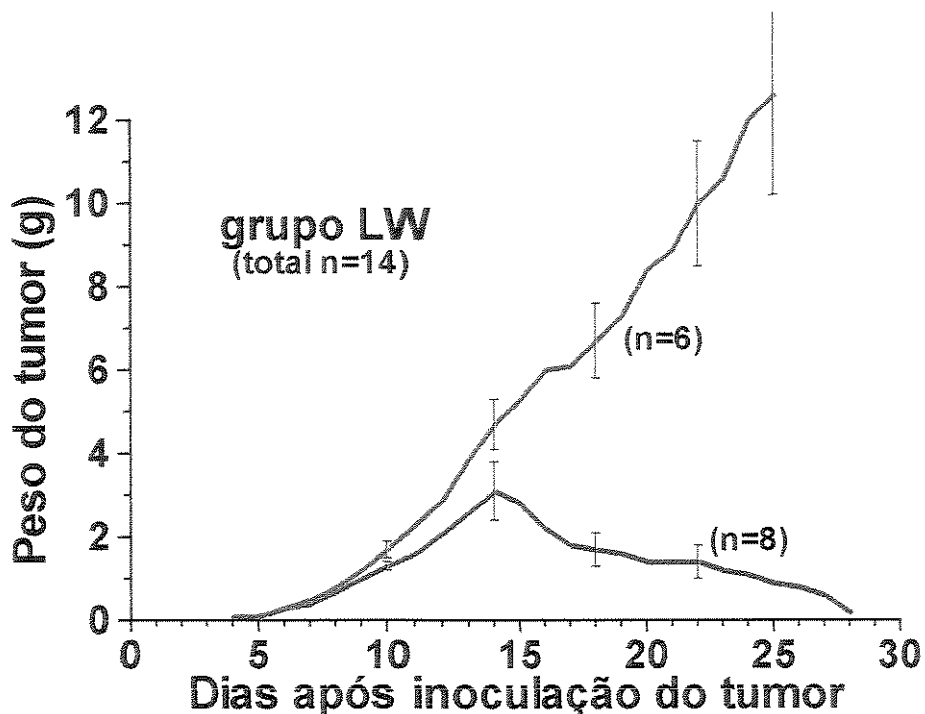


Figura 9. Peso médio dos tumores nos ratos do grupo com a área septal lesada e uma inoculação sc de células tumorais de Walker 256 Ar (4×10^6 cél) (LW, n=14). A estimativa diária do peso tumoral permitiu detectar ratos com tumores em regressão (n=8) ou crescimento tumoral contínuo (n=6).

Tabela 6. Tempo médio (dias) necessário para que os tumores fossem detectados por palpação e atingissem 1 g, além da taxa de crescimento tumoral (g/dia) em ratos com uma inoculação sc do tumor de Walker 256 Ar (4×10^6 cel.), grupos cirurgia simulada (SW) e com lesão da área septal (LW).

	SW (n = 13)		LW (n = 14)	
	Tumores que não regrediram (n=7)	Tumores que regrediram (n=6)	Tumores que não regrediram (n=6)	Tumores que regrediram (n=8)
1 ^o palpação (dias)	3,9±0,3 ^b	5,0±0,4 ^a	3,5±0,2 ^b	4,1±0,3 ^{ab}
Peso de ≥ 1 g (dias)	7,7±0,4 ^a	8,5±0,7 ^a	8,0±0,3 ^a	9,6±1,4 ^a
Taxa de crescimento (g/dia)	0,60±0,08 ^a	0,31±0,08 ^b	0,52±0,04 ^{ab}	0,33±0,09 ^b

Médias na mesma linha, seguidas de letras distintas, diferem significativamente ($P < 0,05$); teste LSD.

Em geral, os tumores que não regrediram foram detectados antes que os tumores que regrediram, sendo esta diferença significativa entre os ratos do grupo SW e ainda, atingiram o peso de 1g em menor tempo. A taxa de crescimento tumoral (calculada para o período do 5^o ao 13^o dia após a inoculação sc) confirmou que no grupo SW a velocidade de crescimento dos tumores que não regrediram foi significativamente maior que a dos tumores que regrediram (Tabela 6).

4.3.1.1. Autópsias dos grupos SW, LW, S e L

Nas autópsias dos grupos SW e LW foram encontradas metástases exclusivamente nos ratos cujos tumores não regrediram, ocorrendo predominantemente na região do pericárdio, em linfonodos próximos ao timo e na cavidade abdominal, em linfonodos da cadeia para-aórtica.

Essas metástases apresentaram tamanho reduzido, sem ação mecânica capaz de prejudicar a função de órgãos próximos. A massa tumoral total, retirada da região do sítio de inoculação das células tumorais na ocasião das autópsias, foi de aproximadamente 3% do peso corpóreo dos ratos (SW = $2,85 \pm 0,6$ % e LW = $3,10 \pm 0,6$ %) (Tabela 7). Nos ratos dos grupos SW e LW, cujos tumores não regrediram, além das metástases, também foi observada hipertrofia do baço, tanto em relação aos ratos cirurgia simulada (S) e lesados (L) sem tumor, como em relação aos ratos cirurgia simulada (SW) e lesados (LW) com regressão tumoral (Tabela 7).

Tabela 7. Médias dos pesos relativos (%) dos tumores, baços, adrenais e timos de ratos dos grupos cirurgia simulada (SW) e lesado (LW) que receberam uma inoculação subcutânea de células tumorais de Walker 256 Ar (4×10^6 cel.) e grupos cirurgia simulada (S) e lesado (L) sem tumor.

Peso relativo do órgão (%)						
Tumor	S (n = 12)	L (n = 12)	SW (n = 13)		LW (n = 14)	
			Tumores que não regrediram (n=7)	Tumores que regrediram (n=6)	Tumores que não regrediram (n=6)	Tumores que regrediram (n=8)
Tumor			2,85±0,6 ^a		3,10±0,6 ^a	
Baço	0,19±0,01 ^c	0,18±0,001 ^c	0,45±0,05 ^a	0,21±0,001 ^c	0,43±0,033 ^b	0,22±0,023 ^c
Adrenal	0,01±0,0001 ^a	0,01±0,0001 ^a	0,02±0,0002 ^a	0,01±0,0001 ^a	0,01±0,0001 ^a	0,01±0,001 ^a
Timo	0,04±0,0002 ^a	0,05±0,0004 ^a	0,06±0,0006 ^a	0,06±0,0004 ^a	0,05±0,012 ^a	0,05±0,0006 ^a

Médias na mesma linha, seguidas de letras distintas, diferem significativamente ($P < 0,05$); teste Kruskal-Wallis seguido da comparação múltipla de distribuição livre.

4.3.1.2. Determinação dos linfócitos T, subtipos CD4⁺ e CD8⁺, no baço

Definida a condição de regressão tumoral ou de crescimento contínuo (a partir do décimo sexto dia após a inoculação sc), os ratos dos grupos SW e LW, bem como os ratos dos grupos sem tumor, cirurgia simulada (S) e lesado (L), passaram a ser sacrificados para contagem dos subtipos CD4⁺ e CD8⁺ de linfócitos T no baço.

As médias dos percentuais de células T CD4⁺ e T CD8⁺ nos grupos SW e LW foram calculadas separadamente para os ratos que apresentaram regressão tumoral ou não. Assim, estão indicados na tabela 8 os percentuais médios das células T CD4⁺, T CD8⁺ e as médias da relação CD4⁺/CD8⁺.

Tabela 8. Percentuais médios dos subtipos CD4⁺ e CD8⁺ de linfócitos T e relação CD4⁺/CD8⁺ observados nos baços de ratos cirurgia simulada (S), ratos com lesão da área septal (L) e ratos com uma inoculação sc de células tumorais de Walker 256 Ar (4×10^6 cel.), grupos cirurgia simulada (SW) e com lesão da área septal (LW).

	S (n = 12) (n=12)	L (n = 12) (n=12)	SW (n = 13)		LW (n = 14)	
			Tumores que não regrediram (n=7)	Tumores que regrediram (n=6)	Tumores que não regrediram (n=6)	Tumores que regrediram (n=8)
T CD4 ⁺ (%)	31,3±1,7 ^a	31,2±4,4 ^a	19,5±1,4 ^c	29,3±2,4 ^{ab}	23,8±1,6 ^{bc}	31,4±1,6 ^a
T CD8 ⁺ (%)	18,2±2,6 ^a	17,3±3,8 ^a	21,4±1,6 ^a	20,4±1,8 ^a	19,8±1,8 ^a	20,1±1,3 ^a
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,73±0,1 ^a	1,82±0,1 ^a	0,91±0,07 ^c	1,45±0,1 ^{ab}	1,20±0,07 ^b	1,59±0,1 ^a

Médias na mesma linha, seguidas de letras distintas, diferem significativamente (P<0,01); teste LSD.

A comparação dos grupos sem tumor S e L mostrou que, dentro do período experimental, a lesão da área septal não modificou as frequências das células T CD4⁺ e T CD8⁺ (Tabela 8). Todavia, quando comparados aos ratos inoculados com células tumorais de Walker 256 Ar, verificou-se que o percentual de células T CD4⁺ foi significativamente menor (P<0,01) nos ratos dos grupos SW e LW, cujos tumores não regrediram. Como consequência desta redução na frequência dos linfócitos T CD4⁺ a relação CD4⁺/CD8⁺ nestes animais, também, foi significativamente menor (P<0,01) que a dos ratos que apresentaram regressão tumoral (Tabela 8). Por outro lado, tanto no grupo SW (Figura 10) como no grupo LW (Figura 11) a regressão tumoral esteve associada a valores normais da relação CD4⁺/CD8⁺

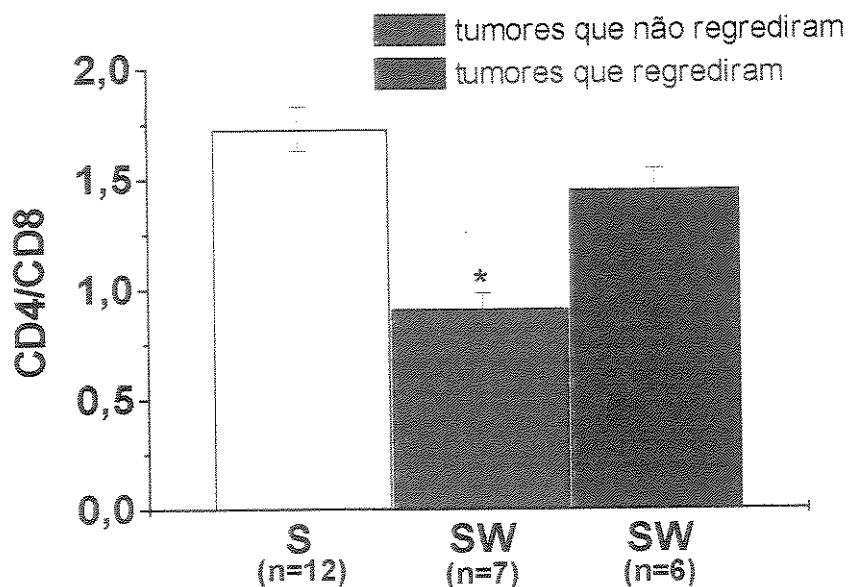


Figura 10. Relação $CD4^+/CD8^+$ em ratos cirurgia simulada, grupos sem tumor (S, n = 12) e com uma inoculação sc de células tumorais de Walker 256 Ar (4×10^6 cel.) (SW, n = 13) * indica diferença significativa ($P < 0,01$; teste LSD) entre os ratos com tumores que não regrediram (SW, n = 7) e os demais (SW, n = 6 e S)

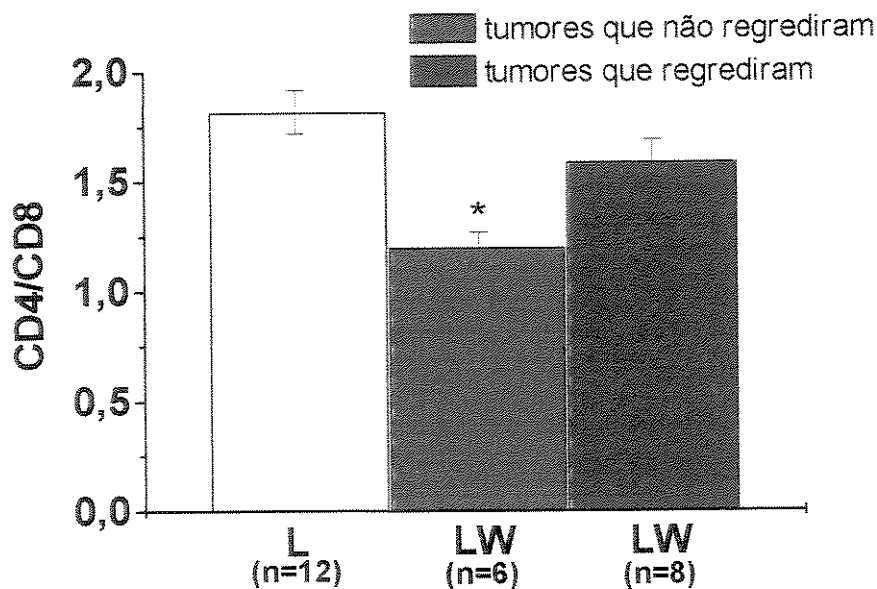


Figura 11. Relação $CD4^+/CD8^+$ em ratos com lesão da área septal, grupos sem tumor (L, n = 12) e com uma inoculação sc de células tumorais de Walker 256 Ar (4×10^6 cel.) (LW, n = 14) * indica diferença significativa ($P < 0,01$; teste LSD) entre os ratos com tumores que não regrediram (LW, n = 6) e os demais (LW, n = 8 e L)

4.3.1.3. Corticosterona sérica

Foram considerados como valores séricos basais da corticosterona, aqueles obtidos com os grupos sem tumor, ou seja, grupo cirurgia simulada (S, n = 12) e grupo com lesão da área septal (L, n = 12). Assim, foram determinados os valores de $27,3 \pm 5,3$ ng / mL para o grupo S e $20,3 \pm 2,8$ ng / mL para o grupo L. Os valores máximos, significativamente maiores ($P < 0,05$) que os basais, foram observados nos ratos que não apresentaram regressão tumoral, sendo no grupo SW (n = 7) de $74,6 \pm 28,5$ ng / mL (Figura 12) e no grupo LW (n = 6) de $220,6 \pm 61,2$ ng / mL (Figura 13). Nos ratos com regressão tumoral os valores da corticosterona sérica foram semelhantes aos valores basais, sendo no grupo SW (n = 6) de $17,9 \pm 3,7$ ng / mL e no grupo LW (n = 8) de $25,4 \pm 5,9$ ng / mL.

4.3.1.4. Correlação entre $CD4^+/CD8^+$ e corticosterona sérica.

A diminuição da relação $CD4^+/CD8^+$ nos ratos com tumores que não regrediram pareceu estar associada ao aumento da corticosterona sérica. Porém, ao se analisar a relação $CD4^+/CD8^+$ em função da concentração de corticosterona obteve-se um coeficiente de determinação de $r^2 = 0,55$ para o grupo SW (n = 13, $P < 0,01$) e de $r^2 = 0,15$ para o grupo LW (n = 14, ns), indicando uma correlação fraca entre estes eventos.

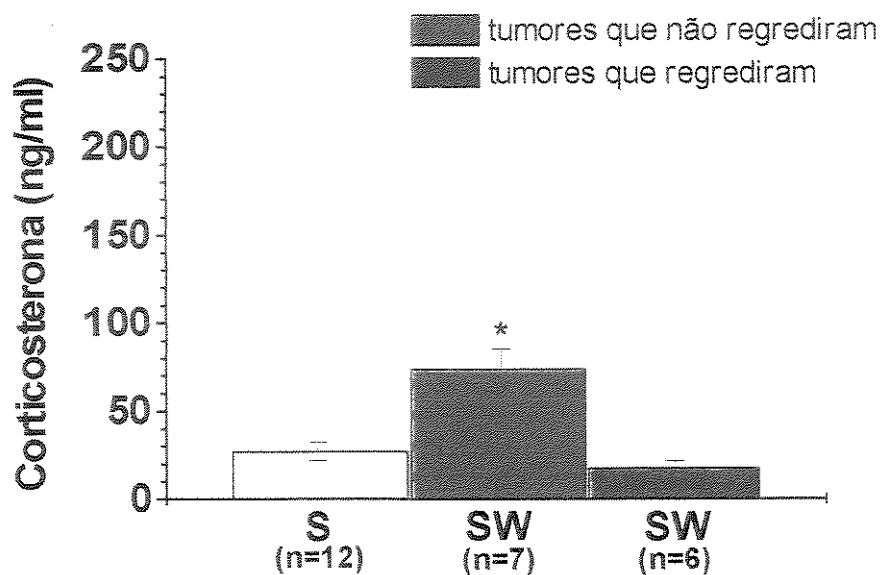


Figura 12. Corticosterona sérica em ratos cirurgia simulada, grupos sem tumor (S, n = 12) e com uma inoculação sc de células tumorais de Walker 256 Ar (4×10^6 cel.) (SW, n = 13). * indica diferença significativa ($P < 0,05$; teste Kruskal-Wallis seguido da comparação múltipla de distribuição livre) entre os ratos com tumores que não regrediram (SW, n = 7) e os demais (SW, n = 6 e S)

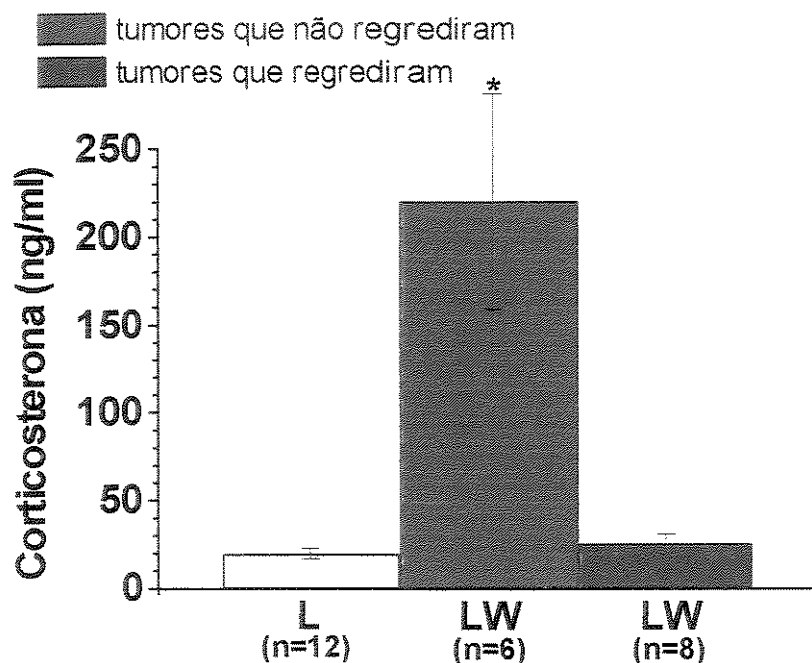


Figura 13. Corticosterona sérica em ratos com lesão da área septal, grupos sem tumor (L, n = 12) e com uma inoculação sc de células tumorais de Walker 256 Ar (4×10^6 cel.) (LW, n = 14). * indica diferença significativa ($P < 0,05$; teste Kruskal-Wallis seguido da comparação múltipla de distribuição livre) entre os ratos com tumores que não regrediram (LW, n = 6) e os demais (LW, n = 8 e L)

4.3.2. Influência da corticosterona na resposta de linfócitos T durante o crescimento do tumor de Walker 256 Ar (Ratos adrenalectomizados)

4.3.2.1. Determinação do crescimento ou regressão dos tumores

Os tumores do grupo controle (CW) e do grupo adrenalectomizados (AW) tornaram-se palpáveis entre o terceiro e quinto dia após a inoculação sc das células tumorais de Walker 256 da subpopulação Ar, quando passaram a ser medidos diariamente para a estimativa do peso tumoral. Assim, após um período superior a dez dias com crescimento contínuo dos tumores, foram identificadas regressões tumorais em 7 ratos (63,6 %) do grupo CW, quando o peso médio dos tumores havia atingido $2,1 \pm 0,4$ g (Figura 14) e em 10 ratos (62,5 %) do grupo AW, quando o peso médio dos tumores havia atingido $2,4 \pm 0,3$ g (Figura 15).

Os resultados indicados na tabela 9 mostram diferenças no período de crescimento dos tumores que regrediram em relação aos que não regrediram. Neste sentido, tanto no grupo CW como no AW, os tumores que não regrediram foram detectados pela palpação antes que os tumores que regrediram e atingiram o peso de 1g em menor tempo, apresentando, conseqüentemente, uma velocidade de crescimento significativamente maior que a dos tumores que regrediram.

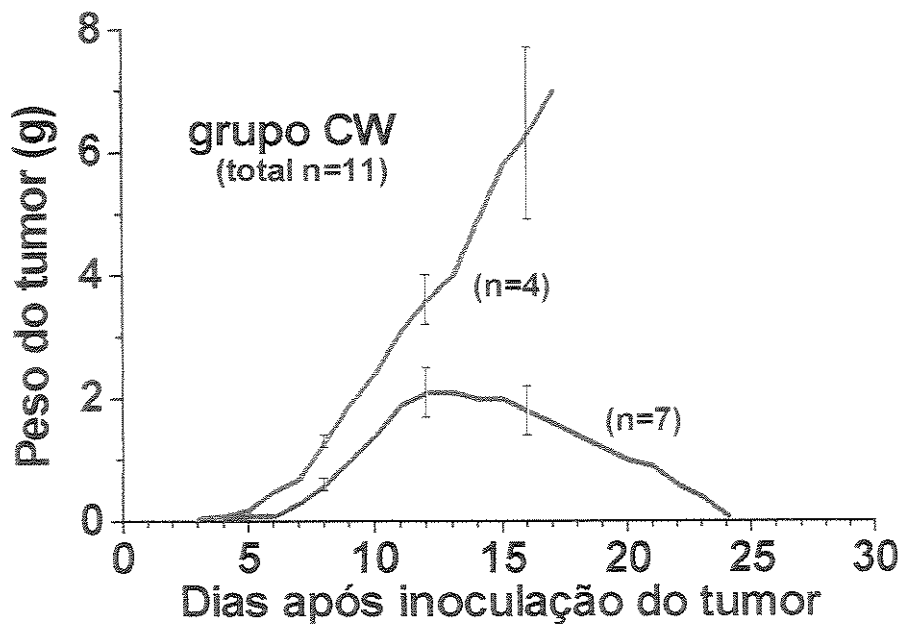


Figura 14. Peso médio dos tumores nos ratos do grupo controle com uma inoculação sc e células tumorais de Walker 256 Ar (CW, n = 11). A estimativa diária do peso tumoral permitiu detectar ratos com tumores em regressão (n = 7) ou não (n = 4).

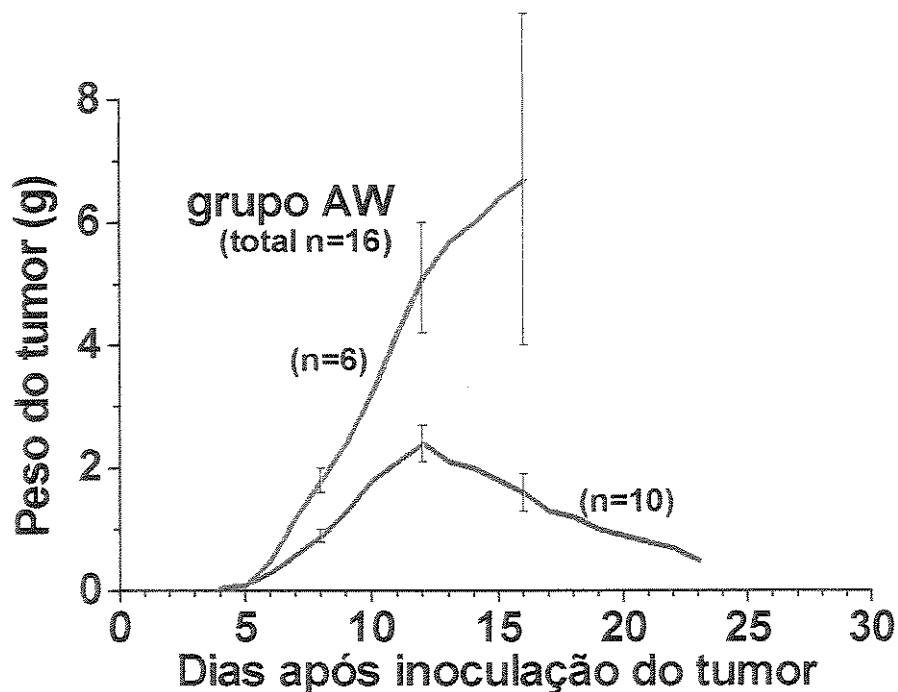


Figura 15. Peso médio dos tumores nos ratos do grupo adrenalectomizado com uma inoculação sc de células tumorais de Walker 256 Ar (AW, n = 16). A estimativa diária do peso tumoral permitiu detectar ratos com tumores em regressão (n = 10) ou não (n = 6).

Tabela 9. Tempo médio (dias) necessário para que os tumores fossem detectados por palpação e atingissem 1 g, além da taxa de crescimento tumoral (g/dia) em ratos com uma inoculação sc do tumor de Walker 256 Ar (4×10^6 cel.), grupos controle (CW) e adrenalectomizado (AW).

	CW (n = 11)		AW (n = 16)	
	Tumores que não regrediram (n=4)	Tumores que regrediram (n=7)	Tumores que não regrediram (n=6)	Tumores que regrediram (n=10)
1º palpação (dias)	3,3±0,3 ^c	4,4±0,2 ^a	3,8±0,2 ^b	4,1±0,1 ^{ab}
Peso de ≥1g (dias)	8,0±0,4 ^{bc}	9,4±0,4 ^a	6,8±0,2 ^c	8,7±0,4 ^{ab}
Taxa de crescimento (g/dia)	0,51±0,06 ^{ab}	0,31±0,06 ^b	0,75±0,13 ^a	0,33±0,04 ^b

Médias na mesma linha, seguidas de letras distintas, diferem significativamente ($P < 0,05$); teste LSD.

4.3.2.2. Autópsias dos grupos CW e AW

Nas autópsias dos grupos CW e AW foram encontradas metástases predominantemente em linfonodos axilares e inguinais. Estas metástases apresentaram tamanho reduzido e sem ação mecânica capaz de prejudicar a função de órgãos próximos. A massa tumoral total, retirada da região do sítio de inoculação das células tumorais na ocasião das autópsias, foi de aproximadamente 3 % do peso corpóreo dos ratos (CW = $2,85 \pm 0,7$ % e AW = $3,23 \pm 0,8$ %). Também foi observada a hipertrofia significativa do baço dos ratos cujos tumores não regrediram em relação aos que apresentaram regressão tumoral, tanto no grupo CW como no AW e ainda, a hipertrofia significativa do timo dos ratos do grupo AW (adrenalectomizados) em relação aos CW (controles) (Tabela 10).

Tabela 10. Média dos pesos relativos (%) dos tumores, baços e timos dos grupos controle (CW) e adrenalectomizado (AW) que receberam uma inoculação subcutânea de células tumorais de Walker 256 Ar (4×10^6 cel.).

	Peso relativo do órgão (%)			
	CW (n = 11)		AW (n = 16)	
	Tumores que não regrediram (n=7)	Tumores que regrediram (n=4)	tumores que não regrediram (n=10)	tumores que regrediram (n=6)
Tumor	2,85±0,7^a		3,23±0,8^a	
Baço	0,61±0,1^a	0,30±0,01^d	0,55±0,08^a	0,30±0,02^b
Timo	0,18±0,01^b	0,18±0,01^b	0,25±0,02^a	0,30±0,01^a

Médias na mesma linha, seguidas de letras distintas, diferem significativamente ($P<0,05$); teste Kruskal-Wallis seguido da comparação múltipla de distribuição livre.

4.3.2.3. Determinação dos linfócitos T, subtipos CD4⁺ e CD8⁺, no baço de ratos adrenalectomizados

A tabela 11 indica as médias dos percentuais de células T CD4⁺ e T CD8⁺ encontradas nos baços de ratos dos grupos CW e AW, quando ocorreu ou não regressão dos tumores. A frequência das células T CD4⁺ manteve a tendência, já observada nos experimentos anteriores, de ser menor nos animais que apresentaram crescimento contínuo dos tumores. Como consequência, a relação CD4⁺/CD8⁺ destes animais foi significativamente menor ($P<0,05$) que a daqueles com regressão tumoral, tanto no grupo CW como no grupo AW (Figura 16). A tabela 11 também indica um aumento global de linfócitos T nos ratos do grupo AW com regressão tumoral, significativo ($P<0,05$) para os linfócitos T CD4⁺.

Tabela 11. Percentuais médios dos subtipos CD4⁺ e CD8⁺ de linfócitos T e relação CD4⁺/CD8⁺, observado nos baços de ratos com uma inoculação sc das células tumorais de Walker 256 Ar (4×10^6 cel.), grupos controle (CW) e adrenalectomizados (AW).

	CW (n = 11)		AW (n = 16)	
	tumores que não regrediram (n=4)	tumores que regrediram (n=7)	tumores que não regrediram (n=6)	Tumores que regrediram (n=10)
CD4 ⁺ (%)	29,7±3,2 ^b	36,9±1,8 ^b	27,3±2,3 ^b	51,2±4,4 ^a
CD8 ⁺ (%)	25,4±2,7 ^a	24,2±3,1 ^a	30,9±6,6 ^a	32,3±3,4 ^a
CD4 ⁺ /CD8 ⁺	1,18±0,1 ^{bc}	1,59±0,1 ^{ac}	1,00±0,1 ^b	1,67±0,2 ^a

Médias na mesma linha, seguidas de letras distintas, diferem significativamente ($P < 0,05$); teste LSD.

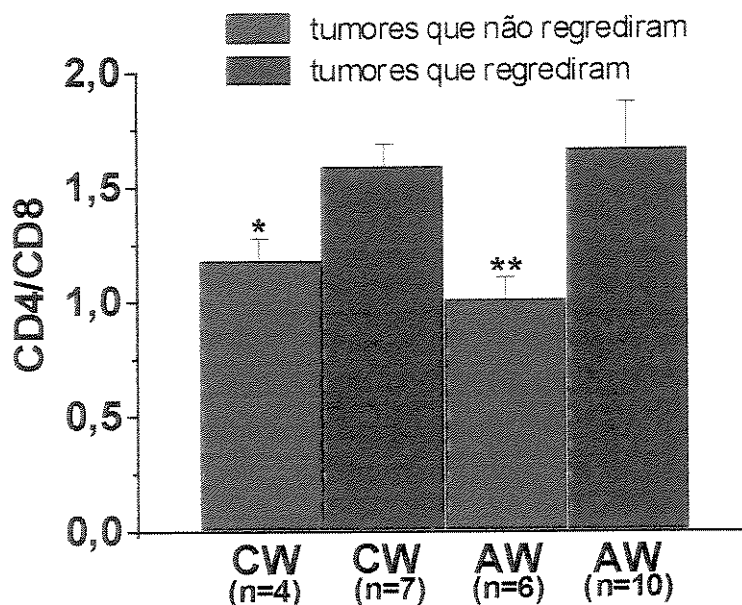


Figura 16. Relação CD4⁺/CD8⁺ em ratos com uma inoculação sc do tumor de Walker 256 Ar (4×10^6 cel.), grupos controle (CW, n = 11) e adrenalectomizado (AW, n = 16). * indica diferença significativa entre os ratos com regressão e sem regressão tumoral do grupo CW; ** indica diferença significativa entre os ratos com regressão e sem regressão tumoral do grupo AW ($P < 0,05$; t student).

4.3.2.4. Corticosterona sérica nos grupos CW e AW

Conforme esperado, sem o controle rigoroso da rotina dentro do biotério, a concentração sérica da corticosterona foi bastante elevada nos ratos controles (CW). Todavia, esta elevação ocorreu tanto nos ratos que apresentaram regressão tumoral (CW n = 7, $320,0 \pm 39,9$ ng / mL) como naqueles sem regressão tumoral (CW n = 4, $257,2 \pm 32,7$ ng / mL) (Figura 17). No grupo AW as concentrações de corticosterona foram de $14,12 \pm 2,4$ ng / mL nos ratos com regressão tumoral (AW n = 6) e de $15,74 \pm 5,5$ ng / mL nos ratos sem regressão tumoral (AW n = 10) (Figura 17). Estes resultados mostraram que a regressão ou não dos tumores ocorreu independentemente da concentração de corticosterona sérica.

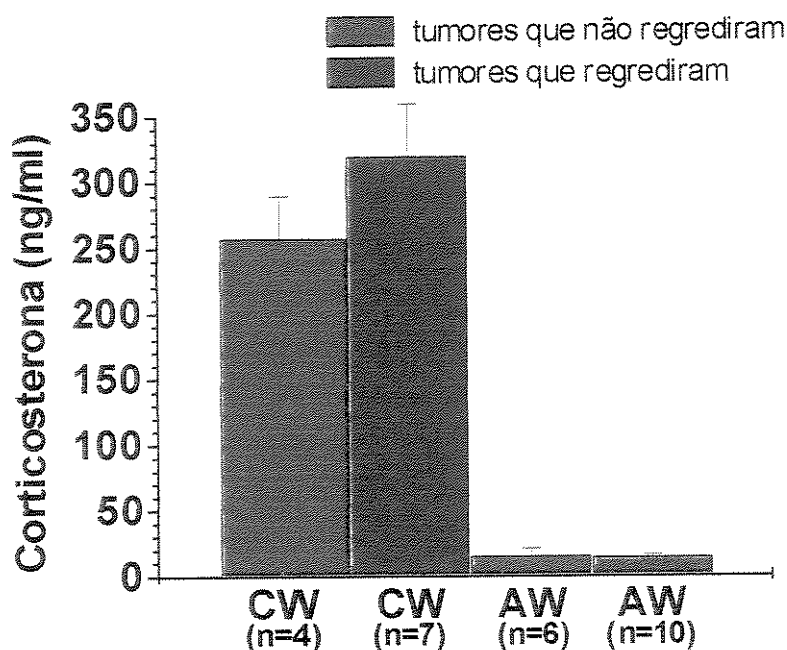


Figura 17. Concentração sérica de corticosterona em ratos com uma inoculação sc do tumor de Walker 256 Ar (4×10^6 cel.), grupos controle (CW, n = 11) e adrenalectomizados (AW, n = 16).

5. DISCUSSÃO

5.1. Aspectos fisiopatológicos do tumor de Walker 256 em ratos com lesão da área septal do cérebro.

Foi proposta deste trabalho investigar a participação da área septal do cérebro na modulação da resposta das células T evocada pelo tumor de Walker 256. Entretanto, o estudo prévio da evolução clínica do tumor de Walker 256 em ratos com a área septal do cérebro lesada tornou-se necessário, visto a possibilidade da lesão septal exercer alguma influência sobre os mecanismos fisiológicos envolvidos na manifestação dos efeitos sistêmicos tumorais. Assim, possíveis variações nos efeitos sistêmicos tumorais em ratos lesados, como por exemplo, a antecipação do início destes efeitos ou o agravamento da evolução clínica da doença, poderiam ser utilizadas como uma indicação indireta da influência da lesão septal sobre a função imune ou, por outro lado, influência direta da lesão sobre mecanismos fisiológicos específicos.

Segundo a hipótese proposta por RETTORI et alii (1995) o início da manifestação dos efeitos sistêmicos patognomônicos do tumor de Walker 256 seria consequência de interações opostas, entre efeitos indesejáveis de origem tumoral (por mediação humoral) e efeitos desejáveis representados por mecanismos protetores do hospedeiro que, por exemplo, poderiam elevar a taxa de "clearance" de possíveis mediadores tumorais (RETTORI et alii, 1995). Tal hipótese explicaria o fato do início dos efeitos sistêmicos, em ratos portadores de uma única inoculação do tumor de Walker 256, estar associado à disseminação

metastática e apresentar pouca ou nenhuma correlação com a massa tumoral. Além disso, explicaria a antecipação e a sincronização dos efeitos sistêmicos em ratos portadores de múltiplas inoculações do tumor de Walker 256, ou seja, com o aumento na taxa de crescimento tumoral total, como consequência da inoculação sc multifocal, ocorreria maior produção dos mediadores tumorais que, rapidamente, saturariam a capacidade dos mecanismos de proteção do hospedeiro (RETTORI et alii, 1995).

Para o estudo dos efeitos sistêmicos patognomônicos do tumor de Walker 256 em ratos lesados, optou-se pela inoculação sc multifocal (8 inoculações) das células tumorais da linhagem A. Tal procedimento foi fundamental para este tipo de estudo uma vez que a inoculação multifocal, induziu a antecipação do início dos efeitos sistêmicos tumorais e favoreceu a observação das alterações fisiológicas, por diminuir a variabilidade individual durante a evolução clínica da doença. Em contraste com a inoculação sc em um único sítio (RETTORI et alii, 1995), o uso de oito inoculações simultâneas fez com que os efeitos sistêmicos tumorais iniciassem precocemente em todos os animais experimentais, independentemente da presença da lesão da área septal ou não (Tabela 1). Além disso, nesta ocasião, a influência mecânica dos tumores ou de metástases sobre órgãos foi insignificante, permitindo considerar as alterações fisiológicas observadas como efeitos tumorais a distância.

A análise da evolução clínica dos ratos com tumores dos grupos cirurgia simulada (SW8) e com lesão da área septal (LW8), apenas através dos parâmetros de ganho de peso corpóreo e da excreção de sódio na urina, já

indicaram que o efeito tumoral sobre o balanço hidrossalino dos ratos foi modificado pela lesão da área septal (Figura 4). Nos ratos do grupo SW8 a evolução da ingestão de alimento e do ganho de peso corpóreo durante o desenvolvimento tumoral, ocorreram conforme descrito na literatura quando estudados em ratos intactos (RETTORI et alii, 1995 e RETTORI et alii, 1996). Assim, no grupo SW8 a anorexia induzida pelo tumor esteve paradoxalmente associada ao ganho de peso corpóreo, fenômeno este, ocasionado pela retenção de sódio e água (RETTORI et alii, 1995 e RETTORI et alii, 1996). Conforme esperado, os ratos submetidos à restrição da alimentação e sem tumor, grupos cirurgia simulada (SRA) e com a área septal do cérebro lesada (LRA), perderam peso durante o período de hipofagia. Por outro lado, nos ratos do grupo LW8 os efeitos tumorais sobre a retenção de sódio e água foram temporariamente diminuídos durante o início do CP, causando as diferenças observadas na excreção de sódio e no peso corpóreo desses animais em relação aos SW8. A análise do balanço fracional de sódio (Figura 5) confirmou que a lesão da área septal do cérebro modificou temporariamente o efeito tumoral sobre o balanço hidrossalino dos ratos.

Uma vez que a excreção osmolar dos ratos LW8 não aumentou (Tabela 4), é pouco provável que uma alteração no balanço glomérulo tubular tenha sido a causa da redução na reabsorção renal de sódio desses ratos. Além disso, a excreção de urina aumentada durante o CP nos ratos do grupo LW8 (Figura 6), indicou que houve uma maior eliminação de água, ou seja, uma diurese hídrica. Por isso, parece razoável se atribuir a diminuição da reabsorção de sódio e água

nos ratos com a lesão septal, ao desenvolvimento de uma resposta secundária diurética, a qual seria oposta à resposta secundária antidiurética desenvolvida pelos ratos do grupo SW8 ou mesmo, por ratos intactos portadores do tumor de Walker 256 (RETTORI et alii, 1995 e RETTORI et alii, 1996). Neste caso o hormônio antidiurético (ADH) estaria envolvido. O principal efeito do ADH é a retenção de água, mas este hormônio também induz alguma retenção de sódio (PITTS, 1968). Assim, em ratos intactos o ADH potencializaria a retenção de sódio induzida pelo tumor, enquanto, nos ratos com a lesão da área septal ocorreria a inibição da liberação do ADH e conseqüentemente a produção de maior volume de urina diluída acompanhada pela redução da reabsorção renal de sódio.

Segundo a hipótese proposta por Rettori e colaboradores (RETTORI et alii, 1995 e RETTORI et alii, 1996), a retenção renal de sódio seria induzida por fatores humorais com origem no tumor (Figura 18, II), o que levaria ao aumento da concentração plasmática de sódio e a retenção de água já mencionados (Figura 18, III). De fato, foi observado o aumento significativo na concentração de sódio no plasma de ratos portadores de múltiplas inoculações sc com células tumorais de Walker 256 ($[Na^+]_{\text{plasma}} = 156 \pm 2,3 \text{ mEq}$) quando comparados aos grupos controles submetidos à restrição alimentar ($[Na^+]_{\text{plasma}} = 142 \pm 2,6 \text{ mEq}$) (dados não publicados de Rettori, O.). Assim, em ratos portadores do tumor de Walker 256 ocorreria, provavelmente, uma sinalização fisiológica conflitante para a liberação do ADH, ou seja, a concentração elevada de sódio extracelular (e a osmolalidade), agindo sobre os receptores

hipotalâmicos (Figura 18, IV), induziria a liberação de ADH, enquanto, simultaneamente, o aumento do volume extracelular, agindo através dos receptores vasculares de volume (Figura 18, V), induziria a inibição da liberação desse hormônio.

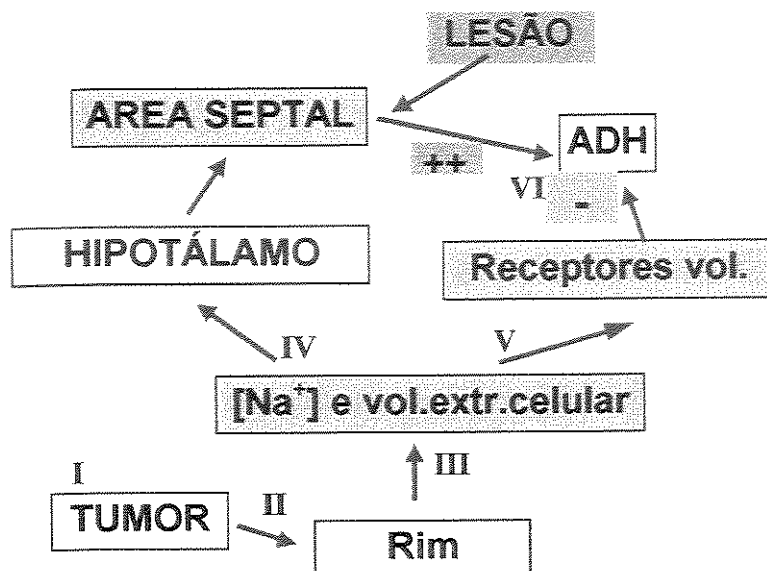


Figura 18. Representação esquemática da possível relação entre os efeitos renais primários induzidos pelo tumor nos ratos SW e a resposta diurética secundária observada nos ratos LW; mais detalhes no texto.

Nos ratos do grupo SW8 a combinação destes sinais fisiológicos resultaria na liberação de ADH, com a produção de menor volume de urina concentrada associada à retenção de sódio. Por outro lado, nos ratos do grupo LW8, a lesão da área septal afetaria, possivelmente, vias relacionadas à liberação de ADH (HAIBARA et alii, 1992) e assim, ocorreria a inibição da liberação deste hormônio

(Figura 18, VI), resultando na produção de maior volume de urina diluída e a diminuição da reabsorção de sódio. De fato, uma menor reabsorção de sódio foi observada nos ratos lesados (Figura 5), corroborando a hipótese de que o papel da área septal na regulação da água, seria o de estimular as células do núcleo supraóptico induzindo a maior liberação de ADH durante a desidratação, levando o animal a conservar água (BRIDGES, 1976). Entretanto, para se confirmar esta proposição novos experimentos, visando a quantificação do hormônio antidiurético devem ser considerados.

5.2. Adequação do modelo experimental tumoral para o estudo da resposta imune em ratos septais.

Durante os estudos da evolução clínica do tumor de Walker 256 em ratos com lesão da área septal, variando-se o número de inoculações sc, bem como as células tumorais utilizadas, se A ou a subpopulação Ar, foi possível se adequar o modelo experimental tumoral ao objetivo proposto para este trabalho.

Como foi mencionado anteriormente a inoculação sc multifocal com as células tumorais de Walker 256 A, favoreceu o estudo dos efeitos sistêmicos tumorais. Entretanto, a possibilidade de se utilizar variações no tempo necessário para o início dos efeitos sistêmicos tumorais, ou ainda, variações na intensidade desses efeitos como indicadores indiretos da função imunológica de ratos com lesão da área septal, não se confirmou através do procedimento de múltiplas inoculações (8 inoculações sc). Tal possibilidade baseou-se no fato de que ratos com o sistema imunológico deprimido por irradiação ionizante, ao serem

inoculados com as células tumorais de Walker 256 A, desenvolvem os efeitos sistêmicos muito precocemente, o que sugere a importância do sistema imune na preservação da homeostasia de ratos portadores do tumor.

Diferente das células tumorais de Walker 256 A, as células da subpopulação *Ar* não induzem os efeitos sistêmicos tumorais quando uma única inoculação sc é administrada em ratos intactos, por outro lado, nestas condições ocorrem freqüentemente, regressões dos tumores (40 a 60% regressões), mesmo após estes atingirem uma massa considerável (GUIMARÃES et alii, 1995).

No experimento piloto, quando foram utilizadas as células tumorais de Walker 256 *Ar* inoculadas em 4 (SW4 e LW4) ou 1 (SW1 e LW1) sítio sc por rato, apenas um rato do grupo LW1, além de todos os ratos dos grupos que receberam quatro inoculações sc (SW4 e LW4) manifestaram os efeitos sistêmicos tumorais. Assim, os resultados preliminares, obtidos a partir dos grupos pilotos inoculados com o tumor de Walker 256 *Ar*, sugeriram que os protocolos experimentais menos agressivos, quanto a capacidade do tumor induzir os efeitos sistêmicos e levar o animal à morte, seriam mais adequados ao estudo da imunologia de ratos com lesão da área septal. Ademais, o menor número de regressões tumorais observados entre os ratos com lesão septal em relação aos animais cirurgia simulada quando uma única inoculação do tumor de Walker 256 *Ar* foi utilizada (grupos LW1 e SW1), sugeriram a possibilidade da regressão tumoral ser utilizada como um parâmetro da influência da área septal sobre o sistema imunológico. Tal observação encorajou a utilização do protocolo de uma inoculação sc com as células tumorais de Walker 256 *Ar*, para o estudo da

relação CD4⁺/CD8⁺ durante a regressão do tumor de Walker 256 e ainda, para verificar a influência da área septal neste processo.

5.3. Estudo da frequência de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ no baço de ratos septais portadores de tumor.

As células tumorais de Walker 256, uma vez administradas no rato, seja através da inoculação subcutânea, peritoneal, ou ainda, através de outras vias menos freqüentes como no tecido muscular ou diretamente em órgãos (IWAMA et alii, 1970; IWAMA de MATTOS, 1979 e IWAMA de MATTOS et alii, 1980), passam a proliferar, sendo raras as regressões de tumores já instalados. De fato, considera-se que o tumor de Walker 256, incluindo a linhagem A utilizada neste trabalho durante a avaliação da lesão septal na manifestação dos efeitos sistêmicos tumorais, apresenta um percentual de instalação e desenvolvimento no organismo do hospedeiro bastante elevado e frequentemente, igual a 100% (IWAMA et alii, 1974; RETTORI et alii, 1995). Porém, ao se utilizar uma única inoculação sc da subpopulação Ar do tumor de Walker 256, apesar da instalação e crescimento iniciais dos tumores, foram observadas várias regressões tanto entre os ratos cirurgia simulada (grupo SW) como entre os ratos lesados (grupo LW). Ainda, em contraste com o que acontece quando uma única inoculação sc do tumor de Walker 256 A é utilizada (RETTORI et alii, 1995) os ratos dos grupos SW e LW portadores de uma inoculação sc da subpopulação Ar não desenvolveram os efeitos sistêmicos tumorais.

Como já foi mencionado anteriormente, a subpopulação Ar foi obtida a

partir da linhagem A do tumor de Walker 256. Ratos portadores do tumor de Walker 256 *Ar* manifestam os efeitos sistêmicos patognômicos preferencialmente quando submetidos à inoculação sc multifocal e, ainda, apresentam um elevado percentual de regressões tumorais quando uma única inoculação sc é utilizada. Este tipo de variação na agressividade de linhagens tumorais já foi descrita anteriormente, por exemplo, para outros dois modelos tumorais em camundongos, o do melanoma B16 e do tumor KHL (TANNOCK, 1983). Nestes modelos, a capacidade das células tumorais produzirem metástases no hospedeiro pode ser modificada conforme as células tumorais venham a ser mantidas sob crescimento *in vivo* ou *in vitro* (TANNOCK, 1983). Além destes modelos tumorais em camundongos, BONNOTTE et alii (1998) estabeleceram duas subpopulações de células tumorais a partir do carcinoma de cólon de ratos, as quais foram designadas como PRO e REG. Semelhante ao que ocorre com as subpopulações A e *Ar* do tumor de Walker 256, a subpopulação PRO apresenta crescimento contínuo no organismo do hospedeiro, produzindo metastases e causando sua morte, enquanto a subpopulação REG, após crescer por duas a três semanas, passa a regredir até seu total desaparecimento (BONNOTTE et alii, 1998). A existência de variantes de uma mesma linhagem tumoral, com capacidades de manifestarem diferentes graus de tumorigenicidade, pode ser explicado pelo fato das células de tumores desenvolvidos apresentarem maior suscetibilidade a mutações. Aceita-se amplamente que os tumores se originam a partir de uma única célula que foge aos mecanismos de controle para a proliferação, porém, é conhecido que os

tumores desenvolvidos apresentam grande heterogeneidade celular, com muitas subpopulações clonais. Sob as pressões seletivas do meio em que o tumor se encontra, algumas dessas subpopulações podem se expandir (TANNOCK, 1983). Com relação às células tumorais de Walker 256 supõem-se que a manutenção da linhagem A crescendo exclusivamente através de passagens sucessivas (mais de 60 passagens, uma a cada quatro dias) no peritônio de ratos, um meio que oferece baixa pressão seletiva, favoreceu o aparecimento da subpopulação Ar utilizada neste experimento.

Os grupos SW e LW, ao contrário do que o experimento piloto sugeriu, mostraram que a lesão septal não tornou os ratos mais suscetíveis ao tumor de Walker 256 Ar, visto que o número de tumores que regrediram (Figuras 8 e 9) foi semelhante e, ainda, a ausência de efeitos sistêmicos em ambos os grupos.

As contagens das subpopulações de células CD4⁺ e CD8⁺ do baço confirmaram as expectativas quanto à importância dos linfócitos T frente ao desafio imunológico proporcionado pelo tumor de Walker 256 Ar. Os resultados obtidos com o grupo SW mostraram que as variações observadas nas populações de linfócitos T do baço, principalmente a diminuição do subtipo CD4⁺, e, conseqüentemente, a diminuição da relação CD4⁺/CD8⁺, estiveram associadas ao crescimento contínuo dos tumores (Tabela 8). De modo semelhante, no grupo LW a diminuição da relação CD4⁺/CD8⁺ esteve antes associada ao crescimento contínuo dos tumores que, propriamente, à lesão ampla da área septal. Nestes grupos, os valores observados para a relação CD4⁺/CD8⁺ durante a regressão tumoral, foram idênticos aos valores controles obtidos a partir dos grupos cirurgia

UNICAMP

simulada (S) e lesado (L) sem tumor (Tabela 8). Assim, com relação à influência da área septal sobre a resposta de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, os resultados apresentados corroboram as observações de LABEUR et alii (1991), ou seja, confirmam a ausência de efeitos crônicos (acima de 40 dias) decorrentes da lesão septal sobre a atividade do sistema imunológico de ratos.

Nos grupos SW e LW o crescimento contínuo dos tumores ocorreu associado à elevação significativa ($P < 0,01$) na concentração de corticosterona sérica, enquanto nos ratos que apresentaram regressão tumoral (Figuras 12 e 13) a concentração deste hormônio foi semelhante aos valores basais obtidos para os grupos sem tumor S e L. Ademais, esta elevação da concentração de corticosterona sérica associada ao crescimento tumoral foi quase três vezes maior no grupo LW que no grupo SW. Por esta razão, as variações da concentração de corticosterona sérica devem ser consideradas sob dois aspectos diferentes. Por um lado, com relação ao controle neuroendócrino e a influência da área septal sobre a atividade adrenocortical; por outro lado, com relação ao desenvolvimento tumoral.

Com relação ao controle neuroendócrino, a diferença da atividade adrenocortical entre os grupos SW e LW é explicada em termos da relação funcional existente entre a área septal e o hipotálamo, a qual envolve a modulação do limiar de ativação e a magnitude da atividade do eixo hipófise-adrenal (SEGGIE et alii, 1974a; SEGGIE et alii, 1974b e UHLIR et alii, 1974). Assim, em consequência da lesão da área septal a atividade adrenocortical nos ratos do grupo LW foi exacerbada em relação ao grupo SW, causando um

incremento na concentração máxima de corticosterona, sem, no entanto, alterar os valores basais deste hormônio (Figuras 12 e 13). A obtenção de valores basais mínimos, como aqueles dos grupos S e L, dependeu do controle rigoroso do ambiente, ou seja, durante o tratamento dos animais cumpriu-se uma rotina estabelecida no sentido de se evitar estímulos estressantes dentro do biotério, segundo proposto por Seggie e colaboradores (SEGGIE et alii, 1974a e SEGGIE et alii, 1974b).

Já com relação ao tumor de Walker 256 *Ar*, o desconhecimento dos mecanismos fisiológicos envolvidos no aumento da concentração de corticosterona sérica torna difícil estabelecer se o crescimento contínuo dos tumores foi a causa ou o efeito da variação hormonal e, neste último caso, se decorrente da supressão imunológica dos animais pela corticosterona.

De um modo geral, os glicocorticóides são associados às neoplasias como agentes protetores do hospedeiro, capazes de inibir a multiplicação celular e estão particularmente relacionados ao tratamento de muitos tipos de linfomas e leucemias (MAINWARING, 1990 e GRUOL et alii, 1997). Por outro lado, alguns experimentos mostraram que o tratamento de camundongos com glicocorticóides favoreceu o crescimento de tumores sólidos e prejudicou o efeito terapêutico de interleucinas como a IL-2, o que foi atribuído à ação imunossupressora do hormônio (KEDAR & KLEIN, 1992).

De fato, foi demonstrado que os glicocorticóides, incluindo a corticosterona, podem inibir a proliferação *in vitro* de linfócitos T e B, além de prejudicar a função de macrófagos e a apresentação de antígenos (GILLIS et alii, 1979a; GILLIS et

alii, 1979b; ROESS et alii, 1982; SNYDER & URANUE, 1982; HOLBROOK et alii, 1983 e BAYBUTT & HOLLSBOER, 1990).

Apesar de haver consenso quanto ao eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) ser uma das principais vias na mediação dos sinais imunomodulatórios, experimentos baseados na exposição de ratos e camundongos a estímulos estressantes têm possibilitado dissociar a elevação da corticosterona plasmática, em decorrência da atividade HHA, da supressão imunológica resultante (SHU et alii, 1993; SHURIN et alii, 1994; KUSNECOV & RABIN, 1994 e FLESHNER et alii, 1995). Assim, o crescimento contínuo do tumor de Walker 256 Ar em ratos dos grupos SW e LW associado a uma resposta imune celular deficiente poderia não ser consequência da alta concentração de corticosterona sérica observada nestes mesmos animais. Para se verificar o efeito imunossupressor deste hormônio ratos adrenalectomizados foram inoculados com o tumor de Walker 256 Ar.

As células tumorais de Walker 256 Ar quando inoculadas em um único sítio sc de ratos adrenalectomizados exibiram um padrão de desenvolvimento semelhante aquele já descrito para os grupos SW e LW. Assim, apesar da instalação e crescimento iniciais de todos os tumores, foram observadas regressões tumorais tanto entre os ratos adrenalectomizados (AW) como nos animais intactos (CW) (Figura 14 e 15).

Semelhante ao que foi observado com os grupos SW e LW, o crescimento contínuo dos tumores nos ratos AW e CW também ocorreu associado a uma frequência de linfócitos CD4⁺ alterada, com a relação CD4⁺/CD8⁺ significativamente menor ($P < 0,01$) que a dos ratos cujos tumores regrediram

(Tabela 11). Desta forma, o experimento com ratos adrenalectomizados mostrou que o crescimento contínuo ou a regressão dos tumores, bem como os valores da relação $CD4^+/CD8^+$ associados a estes eventos não foram influenciados pela atividade adrenocortical. Apesar da alta concentração de corticosterona sérica observada nos ratos do grupo CW, o número de regressões tumorais foi semelhante aquele observado no grupo AW, que por sua vez, apresentou concentração de corticosterona sérica muito reduzida.

Nos ratos adrenalectomizados ocorreu, ainda, o aumento generalizado do percentual de linfócitos T do baço, o qual foi particularmente evidente nos ratos do grupo AW cujos tumores regrediram (Tabela 10). Tal fato já foi descrito anteriormente por DONSKOY & GOLDSCHNEIDER (1992) que relacionaram o maior número de linfócitos T com o aumento do peso do timo de ratos como uma consequência da adrenalectomia. De fato, os ratos do grupo AW, após adrenalectomizados, apresentaram aumento significativo ($P < 0,05$) no peso do timo quando comparados aos ratos do grupo CW (Tabela 10).

A ausência de valores basais mínimos para a corticosterona sérica entre os ratos do grupo CW, ou seja, na ordem de 20 a 30 ng/mL conforme obtido anteriormente com os grupos controles sem tumor S e L ou mesmo, com os grupos SW e LW quando houve regressão tumoral (Figuras 12 e 13), pode ser explicada em termos da rotina de trabalho adotada dentro do biotério. Durante o experimento com ratos adrenalectomizados (incluindo-se aí o grupo CW) não foi adotada a mesma rotina rigorosa observada anteriormente durante os experimentos com ratos septais, visto que o aumento natural da atividade

adrenocortical do grupo CW em decorrência de estímulos ambientais, seria de interesse para a avaliação dos efeitos da corticosterona sobre o tumor de Walker 256 *Ar* e a resposta imune associada ao crescimento ou a regressão tumoral.

Atualmente, alguns trabalhos buscam discutir os fenômenos relacionados à imunidade tumoral considerando as fases inata e adquirida da resposta imune. Isto se deve em parte aos conhecimentos gerados a partir de modelos experimentais para o estudo da resposta imune contra infecções (BIRON & GAZZINELLI, 1995; BIRON, 1998 e COUSENS & BIRON, 1998). Em linhas gerais, a imunidade inata é caracterizada pela atividade de células efectoras inespecíficas durante a primeira semana após a invasão do organismo por vírus e bactérias. Após este período seguem-se reações antígeno-específicas que caracterizam a resposta imune adquirida, as quais são mediadas por anticorpos antígeno-específico ou, ainda, linfócitos T citotóxicos (CTLs) (SEO & TOKURA, 1999). Acredita-se, assim como foi proposto para os processos infecciosos, que durante a imunidade tumoral a resposta inata seja crucial para o desenvolvimento de uma resposta adquirida eficiente, a qual seria promovida por células apresentadoras de antígenos (APCs) (MEDZHITOV & JANEWAY Jr, 1997 e SEO & TOKURA, 1999). Sob esta perspectiva, as curvas de peso médio dos tumores (Figuras 8, 9, 14 e 15) revelaram um aspecto interessante envolvendo o período de crescimento tumoral, fornecendo evidências de que as interações entre tumor e o hospedeiro que determinaram a regressão ou o crescimento contínuo do tumor de Walker 256 *Ar*, ocorreram durante um período bastante precoce do desenvolvimento tumoral. Assim, foi observado que a redução no tamanho dos

tumores que regrediram ocorreu somente a partir do décimo quarto dia após a inoculação das células tumorais, tanto nos experimentos com ratos septais, grupos LW e SW (Figuras 8 e 9), como nos experimentos com ratos adrenalectomizados, grupos AW e CW (Figuras 14 e 15). Por outro lado, o crescimento dos tumores que regrediram foi mais lento que o crescimento dos tumores que não regrediram. Este crescimento diferenciado entre os tumores que regrediram e aqueles que não regrediram foi facilmente percebido nos grupos SW, CW e AW já com o início da detecção dos tumores pela palpação, entre o terceiro e o quinto dia após a inoculação das células tumorais (Tabela 6 e 9). Além disso, o fato dos ratos, dentro de um mesmo experimento, serem inoculados com células tumorais tomadas a partir de uma mesma suspensão, sugere que durante tal interação (tumor-hospedeiro) seriam, principalmente, as variações em fatores com origem no hospedeiro aquelas que levariam a regressão ou crescimento contínuo dos tumores. Os resultados apresentados não permitiram elucidar tais fatores, porém, indicaram que como consequência da interação tumor-hospedeiro seguida do crescimento contínuo do tumor, houve o comprometimento da resposta imune adquirida, indicado pela diminuição da relação $CD4^+/CD8^+$.

Curiosamente, ocorreu o aumento significativo ($P<0,05$) do peso dos baços em todos os ratos cujos tumores não regrediram (Tabela 7 e 10). Esta hiperplasia, combinada ao comprometimento da relação $CD4^+/CD8^+$ observado nestes mesmos animais, sugere que o baço desempenharia um papel crítico para o desenvolvimento da resposta imunológica contra o tumor, possivelmente

vinculado aos mecanismos reguladores da resposta adquirida. Na literatura, os registros de esplenomegalia durante o crescimento de tumores experimentais foram relacionados ao desenvolvimento de mecanismos reguladores supressores da função imunológica (SUBIZA et alii, 1989; TAITZ et alii, 1995). Como exemplo, SUBIZA et alii (1989), indicaram o baço como sendo um dos locais de desenvolvimento das células supressoras naturais em camundongos portadores do tumor de Ehrlich. Por outro lado, LI et alii (1993) e SEGURA et alii (1997), discutiram a ação dos mecanismos supressores, como a expansão de macrófagos supressores e a produção de TGF- β , em termos do comprometimento da resposta anti-tumoral baseada nos linfócitos T CD4⁺.

Atribui-se aos linfócitos T CD4⁺ um papel central na ativação dos mecanismos efetores de que o sistema imune lança mão para combater os tumores (LI et alii, 1993; TOPOLIAN, 1994; PARDOLL & TOPALIAN, 1998 e STAVELEY-O'CARROLL et alii 1998). Evidências recentes indicam que a atividade auxiliadora dos linfócitos T CD4⁺ depende da interação destas células com as APCs, sendo fundamental para a apresentação dos antígenos tumorais aos linfócitos T CD8⁺ e conseqüentemente, para a indução da atividade citotóxica destas células (PARDOLL & TOPALIAN, 1998). Os linfócitos T CD4⁺, ainda, ativariam outros mecanismos efetores, induzindo a produção de óxido nítrico e ânion superóxido pelos macrófagos e promovendo a degranulação de eosinófilos no local do tumor (PARDOLL & TOPALIAN, 1998).

Considerando o que foi descrito acima, os resultados apresentados neste trabalho indicam que o modelo experimental que utiliza o tumor de Wlaker 256 Ar,

seria útil para estudos da imunidade tumoral, os quais poderiam fornecer informações sobre a importância do período inato para o desenvolvimento da resposta imune adquirida, mecanismos efetores envolvidos na regressão tumoral e, ainda, mecanismos de controle da resposta imunológica.

6. CONCLUSÕES

A retenção de sódio e água induzida pelo tumor de Walker 256 *A* foi reduzida temporariamente pela lesão da área septal. Este efeito foi, possivelmente, consequência da inibição da liberação do hormônio antidiurético pela lesão da área septal do cérebro do rato, antes que, devido à eliminação do efeito antinatriurético induzido pelo tumor.

Após a administração de uma inoculação subcutânea com células tumorais de Walker 256 *Ar*, o crescimento dos tumores apresentou-se diferenciado entre os ratos cujos tumores vieram, posteriormente, a regredir e aqueles com crescimento tumoral contínuo. Tal diferença foi perceptível já no início da detecção dos tumores pela palpação, sugerindo que os fatores envolvidos na regressão do tumor de Walker 256 *Ar* ocorreram de forma bastante precoce.

As variações observadas nas populações de linfócitos T do baço (principalmente no subtipo CD4⁺) e consequentemente na relação CD4⁺/CD8⁺ estiveram associadas ao crescimento contínuo ou à regressão dos tumores, confirmando a importância dos linfócitos T durante a resposta imune contra tumores.

A lesão ampla da área septal do cérebro não tornou os ratos mais suscetíveis aos efeitos do tumor de Walker 256 *Ar*, afastando a possibilidade de um efeito imunossupressor em decorrência da lesão. De fato, com relação à influência da área septal sobre a frequência das células T CD4⁺ e CD8⁺ do baço, os resultados apresentados corroboram as observações de LABEUR et alii

(1991), ou seja, confirmam a ausência de efeitos crônicos (acima de 40 dias) decorrentes da lesão septal sobre a atividade do sistema imunológico de ratos.

O experimento com ratos adrenalectomizados mostrou que o crescimento contínuo ou a regressão dos tumores, bem como a resposta dos linfócitos T do baço, associada a estes eventos não foram influenciados pela atividade adrenocortical. Apesar da alta concentração de corticosterona sérica observada nos ratos do grupo intacto (CW), o número de regressões tumorais observado foi semelhante ao do grupo adrenalectomizado (AW), que por sua vez, apresentou concentração de corticosterona sérica muito reduzida.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAMSKY, O.; WERTMAN, E.; RECHES, E.; BRENNER, T. & OVADIA, H.
Effect of hypothalamic lesions on experimental autoimmune diseases in rats. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.496, p. 360-365, 1987.
2. ADER, R. & FRIEDMAN, S. B. Plasma corticosterone response to enviromental stimulation. Effect of duration of stimulation and 24 hour adrenocortical rhytm. **Neuroendocrinology**, v.3, p.378-386, 1968.
3. ALBERT, D. J. & BRAYLEY, K. N. Mouse killing and hyperreactivity following lesions of the medial hypotholamus, the lateralseptum, the bed nucleus of stria terminalis, or the region ventral to the anterior septum. **Physiology and Behavior**, v.23, p.439-443, 1979.
4. ALBERT, D. J. & CHEW, G. L. The septal forebrain and the inhibitory modulation of attack and defense in the rat. A review. **Behavioral and Neural Biology**, v.30, p.357-388, 1980.
5. BAILLIE, P., MILLAR, F.K. & PRATT, A.W. Food intake and Walker tumor growth in rats with hypothalamyc lesions. **Americam Journal of Physiology**, v.210, p.293-300, 1965.
6. BAYBUTT, H. N. & HOLSBOER, F. Inhibiton of macrophage differentiation and function by cortisol. **Endocrinology**, v.127, p.476-480, 1990.
7. BELLUARDO, N.; MUDÓ, G.; CELLA, S.; SANTONI, A.; FORNI, G. & BINDONI, M. Hypothalami control of certain aspects of natural immunity in the mouse. **Immunology**, v.62, p.321-327, 1987.

8. BESEDOVSKY, H. & SORKIN, E. Network of immune neuroendocrine interactions. **Clinical and Experimental Immunology**, v.27, p.1-12, 1977.
9. BESEDOVSKY, H; SORKIN, E.; FELIX, D. & HAAS, H. Hypothalamic changes during the immune response. **European Journal of Immunology**, v.7, p.323-325, 1977
10. BEVERLEY, P. Imunologia do Câncer. In: FRANKS, L. M. & TEICH, N. **Introdução a biologia molecular do câncer**. 1º ed., São Paulo: Livraria Roca Ltda, 1990. c.15, p.311-333.
11. BINDONI, M.; BELLUARDO, N.; LICCIARDELLO, S.; MARCHESE, A. E. & CICIRATA, F. Growth of Yoshida ascites tumor in the rat after radiofrequency destruction of the tuberoinfundibular region of the hypothalamus. **Neuroendocrinology**, v.30, p.88-93, 1980.
12. BINDONI, M.; BELLUARDO, N.; MARCHESE, A. E.; CARDILE, V.; MUDÓ, G.; CELLA, S.; LAGUIDARA, A. & DENATALE, G. Increased tumor cell multiplication after radiofrequency lesions in median hypothalamus in the mouse and rat. **Neuroendocrinology**, v.42, p.407-415, 1986.
13. BINDONI, M.; BELLUARDO, N.; MARCHESE, A. E.; MUDÒ, G. & LAGUIDARA, A. Labeling index of L1210 and Ehrlich ascites tumor cells after radiofrequency destruction of the tuberoinfundibular region of the hypothalamus in the mouse. **Neuroendocrinology Letters**, v.3, p.347-354, 1981.
14. BIRON, C. A. Activation and function of natural killer cell responses during

- viral infections. **Current Opinion in Immunology**, v.9, p.24-34, 1997.
15. BIRON, C. A. & GAZZINELLI, R. T. Effects of IL12 on immune response to microbial infections: a key mediator in regulating disease outcome. **Current Opinion in Immunology**, v.7, p.485-496, 1995.
 16. BLACKBURN, S.L.; MAINI, B. S.; BISTRAN, B. R. & McDERMOTT, W. V. The effect of cancer on nitrogen, electrolyte, and mineral metabolism. **Cancer Research**, v.37, p.2348-2353, 1977.
 17. BLANCHARD, D. C.; BLANCHARD, R. J.; LEE, E. M. C. & NAKAMURA, S. Defensive behaviors in rats following septal and septal-amygdala lesions. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v.93, p.378-390, 1979.
 18. BLASS, E. M.; NUSSBAUM, A. I. & HANSON, D. G. Septal hyperdipsia: specific enhancement of drinking to angiotensin in rats. **Journal of Comparative Physiological Psychology**, v.87, p.422-439, 1974.
 19. BONNETTE, B.; FAVRE, N.; MONTET, M.; FROMENTIN, A.; SOLARY, E.; MARTIN, M. & MARTIN, F. Bcl-2 mediated inhibition of apoptosis prevents immunogenicity and restores tumoricity of spontaneously regressive tumors. **The Journal of Immunology**, v.161, p.1433-1438, 1998.
 20. BRIDGE, J. G. Unit activity in the septal nuclei during water deprivation, drinking and rehydration. In: De FRANCE, J.F. **The septal nuclei. Advances in behavioral biology**. New York: Plenum press/London,

1976. v.20, p.229-239.

21. BROWN, G. M.; UHLIR, I. V.; SEGGIE, J.; SCHALLY, V & KASTIN, A. J.
Effects of setal lesions on plasma levels of MSH, corticosterone, GH and prolactin before and after exposure to novel environment: role of MSH in the septal syndrome. **Endocrinology**, v.94, n.3, p.583-587, 1974.
22. BUINAUSKAS, P.; BROWN, E. R. & COLE, W. H. Atigenic behavior of Walker 256 tumor in Sprague-Dawley rats. **Surgery**, v.60, n.4, p.902-907, 1966.
23. BURSTEIN, R. & GIESLER Jr., G. J. Retrograde labeling of neurons in spinal cord that project directly to nucleus accumbens or the septal nuclei in the rat. **Brain Research**, v.497, p.149-154, 1989.
24. CASTELLO, G.; ESPOSITO, G.; STELLATO, G.; MORA, L. D. & ABATE, G.
Immunological abnormalities in patients with cervical carcinoma.
Gynecologic Oncology, v.25, p.61-64, 1986.
25. COUSENS, L. P. & BIRON, C. A. Roles for innate cytokine pathways in regulating adaptative T cell responses to viral infections. Federation of the American Society in Experimental Biology. 1998, San Francisco.
Livro de resumos. San Francisco, FASEB, 1998. p.A1059.
26. COVIÁN, M.R. Fisiologia da área septal. **Acta Physiologica Latino Americana**, v.40, n.2, p.119-152, 1966.
27. CROSS, R. J.; BROOKS, W. H.; ROSZMAN, T. L. & MARKESBERY, W. R.
Hypothalamic-immune interactions. Effect of hypophysectomy on neuroimmunomodulation. **Journal of the Neurological Sciences**, v.53, p.557-566, 1982.

28. 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 Research**, v.196,
p.79-87, 1980.
29. CROSS, R. J.; MARKESBERY, W. R.; BROOKS, W. H. & ROSZMAN, T. L.
Hypothalamic-immune interactions: Neuromodulation of natural killer
activity by lesioning of the anterior hypothalamus. **Immunology**, v.51,
p.399-405, 1984.
30. DINH, B. L. & BRASSARD, A. Renal lesions associated with the Walker 256
adenocarcinoma in the rat. **British Journal of Experimental Pathology**,
v.49, p.145-151, 1968.
31. DONSKOY, E. & GOLDSCHNEIDER, I. Thymocytopoiesis is maintained by
blood-borne precursors throughout postnatal life. A study in parabiotic
mice. **The journal of immunology**, v.148, n.15, p.1604-1612, 1992.
32. DUNN, J. D. & WHITENER, J. Plasma corticosterone responses to electrical
stimulation of the amygdaloid complex: Cytoarchitectural specificity.
Neuroendocrinology, v.42, p.211-217, 1986.
33. DUNN, J. D. Differential plasma corticosterone responses to electrical
stimulation of medial and lateral septal nuclei. **Neuroendocrinology**,
v.46,p.406-411, 1987.
34. Eastern Cooperative Oncology Group. Prognostic effect of weight loss prior
to chemotherapy in cancer patients. **American Journal of Medicine**,
v.69, p.491-496, 1980.

35. FARRAR, J. D.; KATZ, K. H.; WINDSOR, J.; TRUSH, G.; SCHEUERMANN, R. H.; UHR, J. W. & STREET, N. E. Cancer dormancy. VII. A regulatory role for CD8⁺ T cells and IFN- γ in establishing and maintaining the tumor-dormant state. **The Journal of Immunology**, v.162, p.2842-2849, 1999.
36. FELDMAN, S. & CONFORTI, N. The role of medial septal nucleus in mediating adrenocortical responses to somatosensory stimulation. **Journal of Neuroscience Research**, v.5, p.19-23, 1980.
37. FELDMAN, S.; CONFORTI, N. & SIEGEL, R. A. Adrenocortical responses following limbic stimulation in rats with hypothalamic deafferentations. **Neuroendocrinology**, v.35, p.105-211, 1982.
38. FLESHNER, M.; HERMANN, J.; LOCKWOOD, L. L.; LAUDENSLAGER, M.L.; WATKINS L. R. & MAIER, S. F. Stressed rats fail to expand the CD45RC⁺ CD4⁺ (Th1-like) T cell subset in response to KLH. Possible involvement of IFN- γ . **Brain, Behavior, and Immunity**, v.9, p.101-112, 1995.
39. GAD, S. C. & WEIL C. S. Statistics for toxicologists. In: HAYES W. A. **Principals and methods of toxicology**. 2^a ed., New York: RavenPress Ltd, 1989. c15, p.435-483.
40. GAGE, F. H. & OLTON, D. S. Hippocampal influence on hyperreactivity induced by septal lesions. **Brain Research**, v.98, p.311-325, 1975.
41. GARATTINI, S.; BIZZI, A.; CONELLI, M. G.; GUAITANI, A.; SAMANIN, R. & SPREAFICO, F. Anorexia and cancer in animals and man. **Cancer Treatment Review**, v.7, p.115-140, 1980.

42. GARZETTI, G. G.; CIGNITTI, M.; MARCHEGIANI, F.; CIAVATTINI, A.; TRANQUILLI, A. L.; FABRIS, N. & ROMANINI, C. Natural killer cell activity in patients with gynecologic malignancies: Correlation with histologic grading and state of disease. **Gynecology and Obstetric Investigation**, v.34, p.49-51, 1992.
43. 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. **The Journal of Immunology**, v.123, p.1624-1631, 1979.
44. GILLIS, S.; CRABTREE, G. R. & SMITH, K. A. Glucocorticoid-induced inhibition of T-cell growth factor production. II. The effect on in vitro generation of cytolytic T-cells. **The Journal of Immunology**, v.123, p 1632-1638, 1979.
45. GORDON, F. J. & JOHNSON, A. K. Electrical stimulation of the septal area in the rat: Prolonged suppression of water intake and correlation with self-stimulation. **Brain Research**, v.206, p.421-430, 1980.
46. GRAF, W.; GLIMELIUS, B.; PAHLMAN, L. & BERGSTRÖM, R. Determinants of prognosis in advanced colorectal cancer. **European Journal of Cancer**, v.77, p.1119-1123, 1991.
47. GRUOL, J. D. & BOURGEOIS, S. Chemosensitizing steroids: glucocorticoid receptor agonist capable of inhibiting P-glycoprotein function. **Cancer Research**, v.54, n.15, p.720-727, 1997.
48. GUAITANI, A.; RECCHIA, M.; CARLI, M.; ROCCHETTI, M.; BARTŐSEK, I. & GARATTINI, S. Walker carcinoma 256: a model for studies on tumor-

induced anrexia and cachexia. **Oncology**, v.39, p.173-178, 1982.

49. GUIMARÃES, F.; COSTA, P. M.; CAVALCANTI, T. C. & ZOLLNER, R. L.
Resposta imune humoral em ratas portadores do tumor de Walker 256 X
reunião anual da federação de sociedades de biologia experimental 1995,
Serra Negra. **Livro de Resumos**. Serra Negra, FESEB, 1995. p.414.
50. HAIBARA, A. S.; SAAD, W. A.; CAMARGO, L. A. A.; MENANI, J. V.; RENZI,
A.; DE LUCA Jr, L. A. & ANTUNES-RODRIGUES, J. Opiate activation
suppresses the medial septal area. **Brain Research Bulletin**, v.28,
p.155-160, 1992
51. HARVEY, J.A. & HUNT, H.F. Effect of septal lesions on thirst in the rat as
indicated by water consumption and operant responding for water reward.
Journal of Comparative and Physiological Psychology, v.59,p.49-56,
1965.
52. HEBERMAN, R. B. Tumor immunology. **Journal of American Medicine
Association**, v.268, n.20, p.2935-2939, 1992.
53. HEIKE, M.; SCHLAAK, J.; SCHULZE-BERGKAMEN, H.; HEYL, S.; HERR, W.;
SCHMITT, U.; SCHNEIDER, P. M. & zum BÜSCHENFELDE, K. H. M.
Pecificities and functions of CD4⁺ HLA class II-restricted T cell clones
against a human sarcoma. **The Journal of Immunology**, v.156, p.2205-
2213. 1996.
54. HOLBROOK, N. J.; COX, W. I. & HORNER, H. C. Direct suppression of
natural killer activity in human peripheral blood leukocyte cultures by
glucocorticoids and its modulation by interferon. **Cancer Research**, v.43,
p.4019-4025. 1983.

55. IWAMA de MATTOS, M. C. F. Carcino-sarcoma 256 de Walker: Disseminação metastática em duas linhagens do tumor. **Revista Brasileira de Pesquisa Médica e Biológica**, v.12, n.2-3, p.147-153. 1979.
56. IWAMA de MATTOS, M. C. F.; FRANCO, M. F. & BASSO, N. A. Histologia dos nódulos linfáticos regionais e distantes de ratos transplantados com tumor de Walker. **Ciência e Cultura**, v.26, n.2, p.175-179, 1974.
57. IWAMA de MATTOS, M. C. F.; MONTENEGRO, E. R. & SILVA, C. R. V. Walker 256 carcinossarcoma: Pathology, microscopic and ultrastructural features of the tumoral circulating cells. **Ciência e Cultura**, v.32, n.7, p.849-857, 1980.
58. IWAMA, M. C. F.; FRANCO, M. F. & LEMONICA, L. Tumor de Walker. Um bom modelo experimental para ensino de neoplasias. **Ciência e Cultura**, v.23, n.3, p.267-271, 1970.
59. JONASON, K. R.; ELOE, L. J.; CONTRUCCI, J. & MEYER, M. Effects of simultaneous and successive septal and amygdaloid lesions on social behavior of the rat. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v.83, n.1, p.54-61, 1973.
60. KATAYAMA, M.; KOBAYASHI, S.; KURAMOTO, N & YOKOYAMA, M. M. Effects of hypothalamic lesions on lymphocyte subsets in mice. **Annals of the New York academy of sciences**, v.496, p.366-376, 1987.
61. KEDAR, E. & KLEIN, E. Cancer immunotherapy are the results discouraging? Can they be improved? **Advances in cancer research**, v.59, p.245-322. 1992.

62. KLEIN, J. **Defence against tumors. in Immunology.** Boston: Blackwell Scientific Publications, 1991. c.20, p.419-428.
63. KORNEVA, E.A. Electrophysiological analysis of brain reactions to antigen. **Annals of the New York academy of sciences**, v.496, p.318-337, 1987.
64. KUSNECOV, A. & RABIN, B. S. Stressor-induced alterations of immune functions: Mechanisms and issues. **International Archives Allergy Immunology**. v.105, p.107-121, 1994.
65. LABEUR, M.; NAHMOD, V. E.; FINKIELMAN, S. & ARZT, E. Lesions of the septal nucleus produce a long-lasting inhibition of T lymphocyte proliferation. **Neuroscience Letters**, v.125, p.129-132, 1991.
66. LI, X. F.; TAKIUCHI, H.; ZOU, J. P.; KATAGIRI, T.; YAMAMOTO, N.; NAGATA, T.; ONO, S.; FUJIWARA, H. & HAMAOKA, T. Transforming growth factor- β (TGF- β)-mediated immunosuppression in the tumor-bearing state: enhanced production of TGF- β and a progressive increase in TGF- β susceptibility of tumor CD4⁺ T cell function. **Japanese Journal of Cancer Research**, v.84, p.315-325, 1993.
67. LENGVÁRI, I. & HALÁSZ, B. Evidence for a diurnal fluctuation in plasma corticosterone levels after fornix transection in rat. **Neuroendocrinology**, v.11, p.191-196, 1973.
68. MAINWARING, W. I. P. Hormônios e câncer. In FRANKS, L. M. & TEICH, N. **Introdução a biologia celular e molecular do câncer.** 1 ° ed., Livraria Roca, 1990. c.13, p.267-292.

69. MARANA, H.R.C.; ANDRADE, J. M. & SILVA, J. S. Natural killer cells and interleukin-12 in patients with advanced cervical cancer under neoadjuvant chemotherapy. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.29, p.473-477, 1996.
70. McCANN, S. N.; FRANCI, C. R.; FAVARETTO, A. V. L.; GUTKOWSKA, J. & ANTUNES-RODRIGUES, J. Neuroendocrine regulation of salt and water metabolism. **Brasilian Journal of Medical and Biological Research**, v.30, p.427-441, 1997.
71. MEDZHITOV, R. & JANEWAY Jr, C. A. Innate immunity: impact on the adaptative immune response. **Current Opinion in Immunology**, v.9, p.4-9, 1997.
72. MELIEF. C. J. M. Tumor eradication by adoptative transfer of cytotoxic T lymphocytes. **Advances in Cancer Research**. v.58, p.143-175, 1992.
73. MEYERS, R. L. Studies on tumor antigen of the Walker 256 carcinosarcoma. **Immunochemistry**, v.12, p.589-595, 1975.
74. MOBERG, G. P.; SCAPAGNINI, U.; De GROOT, J. & GANONG, W. F. Effects of sectioning the fornix on diurnal fluctuation in plasma corticosterone levels in the rat. **Neuroendocrinology**, v.7, p.11-15, 1971.
75. MOGENSON, G. J. Septal-hypothalamic relationships. In: De France, J.F. **The septal nuclei. Advances in behavioral biology**. New York and Lodon: Plenum press, 1976. v.20, p.149-227.
76. MORI, H.; TANAKA, R.; YOSHIDA, S.; ONO, K.; YAMANAKA, R.; HARA, N. & TAKEDA, N. Immunological analysis of the ratsw with anterior

- hypothalamic lesions. **Journal of Neuroimmunology**, v.48, p.45-52, 1993.
77. MORRISON, S. D. Effect of growth of a tumor on the regulation of water intake. **Journal of National Cancer Institute**, v.41, p.1241-1248, 1968.
78. MORRISON, S. D. Water intake and exchange and hydration of rats during growth of Walker 256 carcinoma. **Journal of National Cancer Institute**, v.46, p.825-830, 1971.
79. MOTA, N. G. S. & RESKALLAH-IWASSO, M. T. Contribuição ao estudo da imunidade humoral e celular em ratos com carcino-sarcoma 256 de Walker. **Revista de Ciências Biomédicas**, v.2, p.55-60, 1981.
80. NEGORO, H.; VISESSUWAM, S. & HOLLAND, R. C. Inhibition and excitation of units in paraventricular nucleus after stimulation of the septum, amygdala and neurohypophysis. **Brain Research**, v.57, p.479-483, 1973.
81. NEGRO-VILAR, A.; GENTIL, C. G. & ANTUNES-RODRIGUES, J. Influência do sistema límbico na ingestão de cloreto de sódio e água no rato. **Ciência e Cultura**, v.17, n.2, p.253, 1965.
82. NYAKAS, C.; KLOET, E. R. & BOHUS, B. Hipocampal function and putative corticosterone receptors. Effect of septal lesions. **Neuroendocrinology**, v.29, p.301-312, 1979.
83. PARADA, C. A. **Estresse e resposta imune primária em ratos com lesão septal**. Campinas, 1992. 135p Tese (Mestrado em Ciências Biológicas)- Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

84. PARDOLL, D. M. & TOPALIAN, S. L. The role of CD4⁺ T cell responses in antitumor immunity. **Current Opinion in immunology**, v.10, p.588-594, 1998.
85. PASQUALETTI, P.; CASALE, R.; COLLACCIANI, A. & COLANTONIO, D. Prognostic factors in multiple myeloma: a new staging system based on clinical and morphological features. **European Journal of Cancer**, v.27, p.1123-1126, 1991.
86. PAXINOS, G. & WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 2^a ed., Austrália: Academic press, 1986.
87. PEREIRA, O. C. M. & GUSTALE, H. A. A sobrevivência de ratos com tumor de Walker 256 submetidos previamente à imunogenicidade das células tumorais. **Revista de Ciências Biomédicas**, v.2, p.55-60, 1992.
88. PITTS, R. F. Regulation of volume and osmolar concentration of extracellular fluid. **Physiology of the kidney and body fluids**. 2^a ed., Chicago: Year book medical publishers incorporated, 1968. c.12, p.213-227.
89. PLAUT, S. M. & GROTA, L. J. Effects of differential housing on adrenocortical reactivity. **Neuroendocrinology**, v.7, p.348-360, 1971.
90. POPLAWSKY, A. & ISAACSON, R. L. Nimodipina accelerates recovery from the hyperemotionality produced by septal lesions. **Behavioral and Neural Biology**, v.53, p.133-139, 1990.
91. RETTORI, O.; VIEIRA-MATOS, A. N. & TAHIN, Q. S. Variability and discontinuity of the pathognomonic systemic effects caused by the Walker 256 tumor progression in rats. **Tumori**, v.81, p.370-377, 1995.

92. RETTORI, O.; VIEIRA-MATOS, A. N. & GONTIJO, J. A. R. Reduced sodium excretion in Waler 256 tumor-bearing rats. **Acta Physiologica Latino Americana**, v.46, p.111-118, 1996.
93. REY, A.; BESEDOVSKY, H. & SORKIN, E. Endogenous blood levels of corticosterone caontrol the immunologic cell mass and B cell activity in mice. **The Journal of Immunology**, v.133, n.2, p.572-575, 1984.
94. ROESS, D. A.; BELLONE, C. J. & RUH, M. F. The effect of glucocorticoids on mitogen-stimulated B-lymphocytes: Thymidine incorporation and antibody secretion. **Endocrinology**, v.110, p.169-175, 1982.
95. ROSZMAN, T. L.; CROSS, R. J.; BROOKS, W. H.; MARKESBERY, W. R. Hypothalamic-immune interactions. II. The effect of Hypothalamic lesions on the ability of adherent spleen cells to limit lymphocyte blastogenesis. **Immunology**, v.45, p.737-742, 1982.
96. ROSZMAN, T. L.; JACKSON, J. C.; CROSS, R. J.; TITUS, M. J.; MARKESBERY, W. R. & BROOKS, W. Neuroanatomic and neurotransmitter influences on immune function. **The Journal of Immunology**, v.135, n.2, p.769-772, 1985.
97. RUSTGI, V. K. Epidemiology of hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology Clinical North America**, v.16, p.545-551, 1987.
98. SAAD, W. A. ; CAMARGO, L. A. A.; ANTUNES-RODRIGUES, J. & SIMÕES, S. Effect of electrolytic and chemical lesion by idotenic acid of the septal area on water and salt intake. **Brain Research Bulletin**, v.47, n.2, p.163-169, 1998.

99. SAPHIER, D.; ABRAMSKY, O.; MOR, G. & OVADIA, H. A neurophysiological correlate of an immune response. **Annals of the New York academy of sciences**, v.496, p.354-359, 1987.
100. SCOTT, O. C. A. Tumor transplantation and and tumor immunity: A personal view. **Cancer Research**, v.51, p.757-763, 1991.
101. SEGGIE, J.; SHAW, B.; UHLIR, I. & BROWN, G. M. Baseline 24-hours plasma corticosterone rhythm in normal, sham-operated and septally-lesioned rats. **Neuroendocrinology**, v.15, p.51-61, 1974.
102. SEGGIE, J.; UHLIR, I. & BROWN, G. M. Adrenal stress responses following septal lesions in the rat. **Neuroendocrinology**, v.16, p.255-236, 1974.
103. SEGGIE, J. & BROWN, G. M. Septal lesions and resting adrenal function: apossible explanation of conflicting findings. **Neuroendocrinology**, v.8, p.367-374, 1971.
104. SEGURA, J. A.; BARBERO, L. G. & MARQUEZ, J. Early tumor effect on splenic Th lymphocytes in mice. **Federation of European Biochemical Societies Letters**, v.414, p.1-6, 1997.
105. SEO, N. & TOKURA, Y. Downregulation of innate and acquired antitumor immunity by bystander $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ T lymphocytes with Th2 or Tr1 cytokine profiles. **Journal of interferon and cytokine research**, v.19, p.555-561, 1999.
106. SHRIKANT, P. & MESCHER, M. F. Control of syngeneic tumor growth by activation of CD8⁺ T cells: efficacy is limited by migration away from the

site and induction of nonresponsiveness. **The Journal of Immunology**, v.162, p.2858-2866, 1999.

107. SHU, J.; STEVENSON, J. R. & ZHOU, X. Modulation of cellular immune responses by cold water swim stress in the rat. **Developmental and comparative immunology**, v.17, p.357-371, 1993.

108. SHURIN, M. R.; ZHOU, D.; KUSNECOV, A.; RASSNICK, S. & RABIN, B. S. Effect of one or more footshocks on Spleen and blood lymphocyte proliferation in rats. **Brain, Behavior, and Immunity**, v.8, p.57-65, 1994.

109. SNYDER, D. S. & URANUE, E. R. Corticosteroids inhibit murine macrophage Ia expression and interleukin 1 production. **The Journal of Immunology**, v.129, p.1803-1805, 1982.

110. SPEISER, D. E.; MIRANDA, R.; ZAKARIAN, A.; BACHMANN, M. F.; McKALL-FAIENZA, K.; ODERMATT, B.; HANAHAN, D.; ZINKERNAGEL, R. M. & OHASHI, P. S. Self antigens expressed by solid tumors do not efficiently stimulate naive or activated T cells: Implications for immunotherapy. **Journal of Experimental Medicine**, v.186, n.5, p.645-653, 1997.

111. STAVELEY-O'CARROLL, K.; SOTOMAYOR, E.; MONTGOMERY, J.; BORELLO, I.; HWANE, L.; FEIN, S.; PARDOLL, D. & LEVITSKY, H. Induction of antigen-specific T cell anergy: An early event in the course of tumor progression. **Proceeding of the National. Academic Sciences**, v.95, p.1178-1183, 1998.

112. SUBIZA, J. L.; VIÑUELA, J. E.; RODRIGUEZ, R.; GIL, J.; FIGUEIREDO, M. A. & La CONCHA Development of splenic natural suppressor (NS) cells

in Ehrlich tumor-bearing mice. **International Journal of Cancer**, v.44, p.307-314, 1989.

113. TACAIS, F. J. Fluid and electrolyte problems in patients with advanced carcinoma. **Medical Clinics of North America**, v.59, p.449-457, 1974.
114. TAITZ, A.; PETRUZZELI, G.; PAK, A.S.; WRIGHT, M. A.; MATTHEWS, J.P.; RASLAN, W. F. ; LOZANO, Y. & YOUNG, M.R. Immune parameters of mice bearing human head and neck cancer. **Cancer Immunology and immunotherapy**, v.40, n.5, p.283-91, 1995.
115. TANNOCK, I. F. Biology of tumor growth. **Hospital Practice**, v.april, p.81-93, 1983.
116. TAYEK, J. A. & BRASEL, J. A. Effects of tumor necrosis factor- α on skeletal muscle and Walker 256 carcinosarcoma protein metabolism studied in vivo. **Cancer Research**, v.90, p.2765-2768, 1990.
117. TOAL, J. N.; MILLAR, F. K.; BROOKS, R. H. & WHITE, J. Sodium retention by rats bearing the Walker carcinosarcoma 256. **American Journal Physiology**, v.200, p.175-181, 1961.
118. TOPOLIAN, S. L. MHC class II restricted tumor antigens and the role of CD4⁺ T cells in cancer immunotherapy. **Current Opinion in Immunology**, v.6, p.741-745, 1994.
119. TYREY, L. & NALBANDOV, A. V. Influence of anterior hypothalamic lesions on circulating antibody titers in the rat. **American Journal of Physiology**, v.222, n.1, p.179-185, 1972.

120. TZYU-CHOU WU Immunology of the human papilloma virus in relation to cancer. **Current Opinion in Immunology**, v.6, p.746-754, 1994.
121. UHLIR, I.; SEGGIE, J. & BROWN, G. M. The effect of septal lesions on the threshold of adrenal stress response. **Neuroendocrinology**, v.14, p.351-355, 1974.
122. VIEIRA, S. & HOFMANN, R. Tópicos Especiais. **Estatística experimental**. São Paulo: Editora Atlas S. A., 1989. c.11, p.139-156.
123. VIERBOOM, M. P. M.; NIJMAN, H. W.; OFFRINGA, R.; VAN DER VOORT, E. I. H.; VAN HALL, T.; VAN DEN BROEK, L.; FLEUREN, G. J.; KENEMANS, P.; KAST, M. W. & MELIEF, C. J. M. Tumor eradication by wild-type p53-specific cytotoxic T lymphocytes. **Journal of Experimental Medicine**, v.186, n.5, p.695-704, 1997.
124. WILSON, M. & CRITCHLOW, V. Effect of septal ablation on rhythmic pituitary-adrenal function in the rat. **Neuroendocrinology**, v.14, p.333-344, 1974.
125. WRONA, D.; JURKOWSKI, M. K.; TROJNAR, W.; STASZEWSKA, M. & TOKARSKI, J. Electrolytic lesions of the lateral hypothalamus influence peripheral blood NK cytotoxicity in rats. **Journal of Neuroimmunology**, v.55, p.45-54, 1994.

ANEXO 1

Relação entre o diâmetro médio do tumor (mm) e seu peso (g).

mm	g	mm	g	mm	g
8	0,05				
9	0,10				
10	0,15	30	6,20	50	27,1
11	0,20	31	6,80	51	28,2
12	0,30	32	7,30	52	29,6
13	0,40	33	7,90	53	31,2
14	0,50	34	8,80	54	32,8
15	0,60	35	9,70	55	34,5
16	0,80	36	10,6	56	36,2
17	1,00	37	11,4	57	37,9
18	1,20	38	12,4	58	39,6
19	1,50	39	13,8	59	41,2
20	1,80	40	14,5	60	42,9
21	2,00	41	15,8	61	44,6
22	2,40	42	16,9	62	46,3
23	2,70	43	18,0	63	48,0
24	3,00	44	19,3	64	49,7
25	3,20	45	20,6	65	51,4
26	3,60	46	21,8	66	53,1
27	4,20	47	23,2	67	54,8
28	4,90	48	24,6	68	56,5
29	5,60	49	25,8	69	58,2

The influence of septal lesions on sodium and water retention induced by Walker 256 tumor

F. Guimarães¹,
O. Rettori²,
A.N. Vieira-Matos²
and G.A. Fernandes³

¹Departamento de Fisiologia Animal e Biofísica, Instituto de Biologia,
²Laboratório de Pesquisas Bioquímicas,
Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher, and
³Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental,
Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas,
Campinas, SP, Brasil

Abstract

Correspondence

F. Guimarães
Laboratório de Pesquisas Bioquímicas
CAISM, UNICAMP
Caixa Postal 6151
13081-970 Campinas, SP
Brasil
Fax: +55-19-231-5273

Publication supported by FAPESP.

Received October 28, 1997
Accepted November 17, 1998

In the course of studies on the effects of septal area lesions on neuroimmunomodulation and Walker 256 tumor development, it was observed that tumor-induced sodium and water retention was less marked in lesioned than in non-lesioned rats. In the present study possible mechanisms involved in this phenomenon were investigated. The experiments were performed in septal-lesioned (LW; N = 15) and sham-operated (SW; N = 7) 8-week-old male Wistar rats, which received multifocal simultaneous subcutaneous (sc) inoculations of Walker 256 tumor cells about 30 days after the stereotaxic surgery. Control groups (no tumor, sham-operated food-restricted (SFR), N = 7) and lesioned food-restricted (LFR, N = 10) were subjected to a feeding pattern similar to that observed in tumor-bearing animals. Multifocal inoculation of Walker 256 tumor rapidly induces anorexia, which is paradoxically accompanied by an increase in body weight, as a result of renal Na⁺ and fluid retention. These effects of the tumor were also seen in LW rats, although the rise in fractional sodium balance during the early clinical period was significantly smaller than in SW rats (day 4: SW = 47.6 ± 6.4% and LW = 13.8 ± 5.2%; day 5: SW = 57.5 ± 3.5% and LW = 25.7 ± 4.8%; day 6: SW = 54.4 ± 3.8% and LW = 32.1 ± 4.4%; P<0.05), suggesting a temporary reduction in tumor-induced sodium retention. In contrast, urine output was significantly reduced in SW rats and increased in LW rats (LW up to -0.85 and SW up to 4.5 ml/100 g body weight), with no change in osmolar excretion. These temporary changes in the tumor's effects on LW rats may reflect a "reversal" of the secondary central antidiuretic response induced by the tumor (from antidiuretic to diuretic).

Key words

- Na⁺ retention
- Secondary diuretic response
- Tumor systemic effects
- Septal area lesion
- Multifocal tumor inoculation
- Walker 256 tumor

Introduction

Human and experimental cancers usually grow for variable periods of time without disturbing the host's physiology. However, once the first signs of homeostatic disturbances become evident, they show a rapid, sometimes fulminant evolution (1-4). The homeostatic disturbances associated with cancer are usually manifested as alterations in food and water intake, as well as in water-electrolyte composition, temperature, neurovegetative functions, immunofunction, and so on (5-9).

Since the limbic system plays a key role in regulating the major homeostatic functions, and since the various systemic effects induced by tumors are initiated suddenly and simultaneously and are rapidly followed by irreversible general homeostatic alterations culminating in the host's death, it seems reasonable to suppose that the tumor's systemic effects could be a consequence of alteration of limbic system physiology.

Impaired salt-water excretion is a well-known systemic effect of cancer, and has been studied in several animal models including Walker 256 tumor (5,6,10,11). Recent evidence from our laboratory indicates that the sodium retention induced by Walker 256 tumor is a primary renal tubular effect (11) rather than being secondary to adrenal hyperfunction or salt sequestration by the growing tumor (12-15).

In the course of studies on the effects of septal area lesions on neuroimmunomodulation and Walker 256 tumor development, we observed that tumor-induced sodium and water retention was less marked in lesioned than in non-lesioned rats. This finding suggested a role for the septal area in tumor-induced sodium retention since the septal nucleus belongs to a supra-hypothalamic region involved in the behavioral control of water and sodium balance (16-18). In the present study, we have investigated the mechanisms involved in this phenomenon.

The experiments were performed in septal-lesioned and control (sham-operated) rats receiving multifocal simultaneous subcutaneous (sc) inoculations of Walker 256 tumor cells. Use of the multifocal tumor model was critical in this work because it markedly anticipated and synchronized the onset of the tumor's systemic effects.

Material and Methods

Animals and brain surgery

Eight-week-old male Wistar rats were obtained from the UNICAMP Central Animal House. The rats were anesthetized with ether and fixed in a stereotaxic instrument for small animals (Kriegh-Johnson type). Brain lesions were produced by bilateral aspiration of the septal area with a cannula (1 mm in diameter) connected to a vacuum pump. The cannula was inserted into the brain 1 mm anterior to the bregma, 1 mm lateral to the midline, at a 5° angle to the sagittal plane and 6 mm under the dural surface, based on the stereotaxic coordinates of an atlas of the rat brain (19). When the cannula was in position, negative pressure (10 mmHg) was applied for 10 s. After surgery, the rats were handled as during the experimental period until their recovery (about 30 days), in order to familiarize them with the subsequent procedures that could otherwise be stressful to septal-lesioned animals (20).

At the end of the experiments, the brains were removed and frozen and coronal sections were obtained (20-30 µm). The extent of the lesions was examined in toluidine blue-stained sections (Figure 1). Control sham-operated rats were submitted to the same procedure, except for the vacuum pump aspiration.

Experimental conditions and parameters measured

The rats were housed in individual metabolic cages in a temperature-controlled room

($22 \pm 1^\circ\text{C}$) on a 12-h light-dark cycle and were provided with a standard rat chow (Labina, Purina) and tap water *ad libitum*, except for the food-restricted groups described below. Body weight, food consumption and urine volume, osmolality and Na^+ excretion were determined daily. Urinary sodium levels were measured by flame photometry and osmolality by cryoscopic point changes. After natural death, autopsies were performed and the presence of possible metastases or other macroscopic abnormalities capable of interfering with the results was recorded.

Tumor

The Walker-256 line A (originally obtained from the Christ Hospital Line, National Cancer Institute Bank, Cambridge, MA, USA) was donated by Dr. M.C. Cintra-Gomes (Department of Physiology, IB, UNICAMP) and was stored in liquid nitrogen or grown through consecutive subcutaneous (*sc*) or intraperitoneal (*ip*) passages. After at least three consecutive *ip* passages, 4×10^6 viable ascitic cells, suspended in 0.25 ml of Ringer-lactate, were inoculated *sc* at each of eight sites in the dorsolumbar region.

The multifocal tumor model

In the usual experimental studies (one single *sc* tumor inoculation/rat), the systemic effects of tumors initiate unpredictably in individuals of the same group, between 6 and 40 or more days after inoculation. At this point, many rats bear large tumor masses and metastases, the mechanical effects of which may mask the sudden and rapid development of the pathognomonic systemic effects. Simultaneous multifocal *sc* inoculations were performed in the present study in an attempt to anticipate and synchronize the initiation of systemic effects among the animals of a given group. With this procedure, the pathognomonic systemic effects initiate in 100% of

the animals within 3-5 days after tumor cell inoculation, at which point the animals bear tiny tumors, but no significant metastases. This approach does not alter the characteristics and duration of the subsequent final stages of the illness (10).

Data synchronization

Despite the marked increase in the synchronization of effects provided by the multifocal tumor model, a significant degree of non-synchronization still remains since the systemic effects are not strictly initiated on the same day, develop very rapidly and present two phases (moderate and severe) with different individual duration. Thus, a simple averaging of individual daily data would mask the real information at this critical stage of the illness. To circumvent this problem, we employed a "synchronized average", similar to that used in physiology to average parameters such as individual electrocardiograms or nerve action potentials. Details of this procedure have been described elsewhere (10).

Data analysis

The results are reported as means $\pm$ SEM. Fractional sodium balances were calculated daily using the following formula: fractional Na^+ balance = (input-output) $\times$ 100/input, where input is the food intake (g/day) $\times$ diet ion content (mEq/g), and output is the urine volume (ml/day) $\times$ urine concentration (mEq/ml).

Post-hoc comparisons of means were performed using the least significant difference test (planned comparison) among multiple groups or the Student *t*-test for two groups. The level of significance was set at $P < 0.05$.

Experimental design

The study was performed on 39 animals

Figure 1 - Septal-lesioned rats. *Top*, Toluidine blue-stained coronal section (20-30 μ m) and *bottom*, schematic representation of brain planes showing the extent of the lesion, which involved the medial and lateral (dorsal, intermediate and ventral) septal nucleus, besides part of the septofimbrial nucleus. In some rats, the lesion may have included the septohypothalamic nucleus, triangular septal nucleus, septal projection of the fornix and a small anterior portion of the corpus callosum.

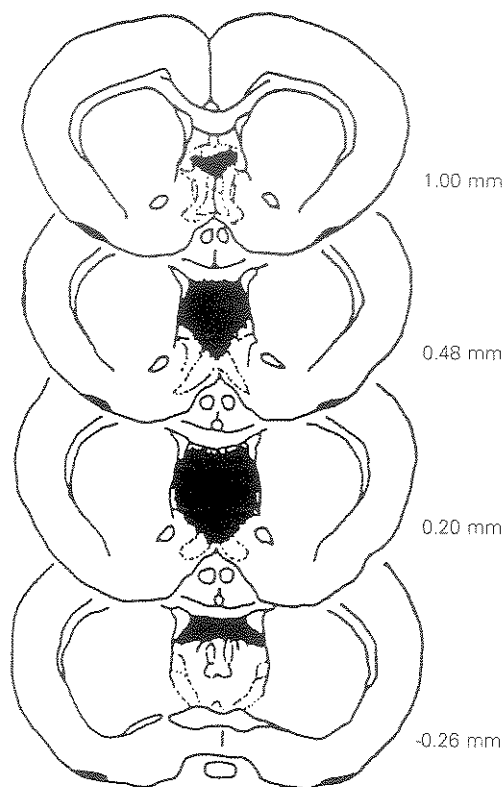
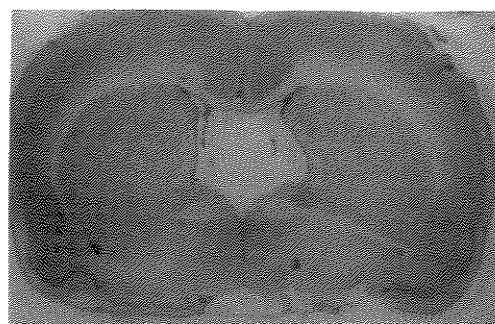


Table 1 - Average duration (days) of the subclinical (sCP) and clinical (CP) periods and survival (SV) of rats multifocally inoculated with Walker 256 tumor, sham-operated (SW; N = 7) and septal-lesioned (LW; N = 15).

The values are reported as the means $\pm$ SEM for the number of rats indicated by N.

	SW (N = 7)	LW (N = 15)
sCP	3.0 $\pm$ 0.2	2.6 $\pm$ 0.1
CP	7.7 $\pm$ 0.6	7.0 $\pm$ 0.3
SV	10.7 $\pm$ 0.6	9.6 $\pm$ 2.5

divided into four groups, as follows: SW (sham-operated Walker), 7 animals; LW (septal-lesioned Walker), 15 animals; SFR (sham-operated food-restricted), 7 animals; LFR (lesioned food-restricted), 10 animals. Food-restricted animals (no tumor, SFR and LFR groups) were subjected to a feeding pattern similar to the average food ingestion observed in tumor-bearing animals during the hypophagic stage of the disease.

Results

Brain lesion

As expected, aspiration of the septal area produced a large lesion involving the medial and lateral (dorsal, intermediate and ventral) septal nucleus, in addition to part of the septofimbrial nucleus. In some animals, the lesion may have included the septohypothalamic nucleus, the triangular septal nucleus, the septal projection of the fornix and a small anterior portion of the corpus callosum (Figure 1).

Tumor and disease evolution

All tumor cell inoculations gave rise to continuously growing tumors which were palpable within 2-3 days. Independently of the group, in the tumor-bearing rats the disease followed its discontinuous pattern of evolution (10) with an initial period free of detectable systemic effects (subclinical period; sCP), that was suddenly interrupted by the symptomatic period (clinical period; CP). Table 1 shows the average duration of these periods. The onset of the CP occurred 2-3 days after tumor cell inoculation, independently of the lesion, and was characterized by pathognomonic and sudden development of alterations in fundamental homeostatic mechanisms, including appetite inhibition that was paradoxically accompanied by a gain in body weight due to sodium and fluid retention. The sudden manifestation and rapid

progression of these homeostatic alterations are illustrated in Figure 2. Body weight in the LW group did not rise as much as in the SW group, nor did the sodium excretion decrease as much in the LW group as in the SW group during the early days of CP. Thus, SW rats became significantly different from their non-tumor-bearing food-restricted controls (SFR) after the fifth day for body weight (Table 2) and after the fourth day for sodium excretion (Table 3), while in the LW group this only occurred (LW in relation to LFR) after the sixth day for body weight (Table 2) and after seventh day for sodium excretion (Table 3). Significant differences were also observed between the LW and SW groups at 6-7 days for body weight and at 4-6 days for sodium excretion (Figure 2).

Fractional sodium balance

Before the onset of systemic effects (up to the third day), sodium handling in tumor bearers was not different from that of food-restricted rats (SFR and LFR groups) (Figure 3). During this period (sCP), the fractional sodium balance was approximately 25%, indicating that about 75% of the ingested sodium was excreted through the kidneys. After the third day, when the systemic effects became apparent in tumor bearers and food intake decreased in all groups, the differences in sodium handling became very marked. In SFR and LFR rats, the fractional sodium balance decreased, indicating an increase in the fraction of ingested sodium excreted through the kidneys, which was well above 100% after day 7 (Figure 3). This progressive increase in the relative renal sodium excretion which was observed in both the SFR and LFR groups represented a physiological response to the body weight loss seen in these animals.

An opposite, non-physiological response was observed in SW and LW rats when the fractional sodium balance suddenly started to increase, indicating that the fraction of

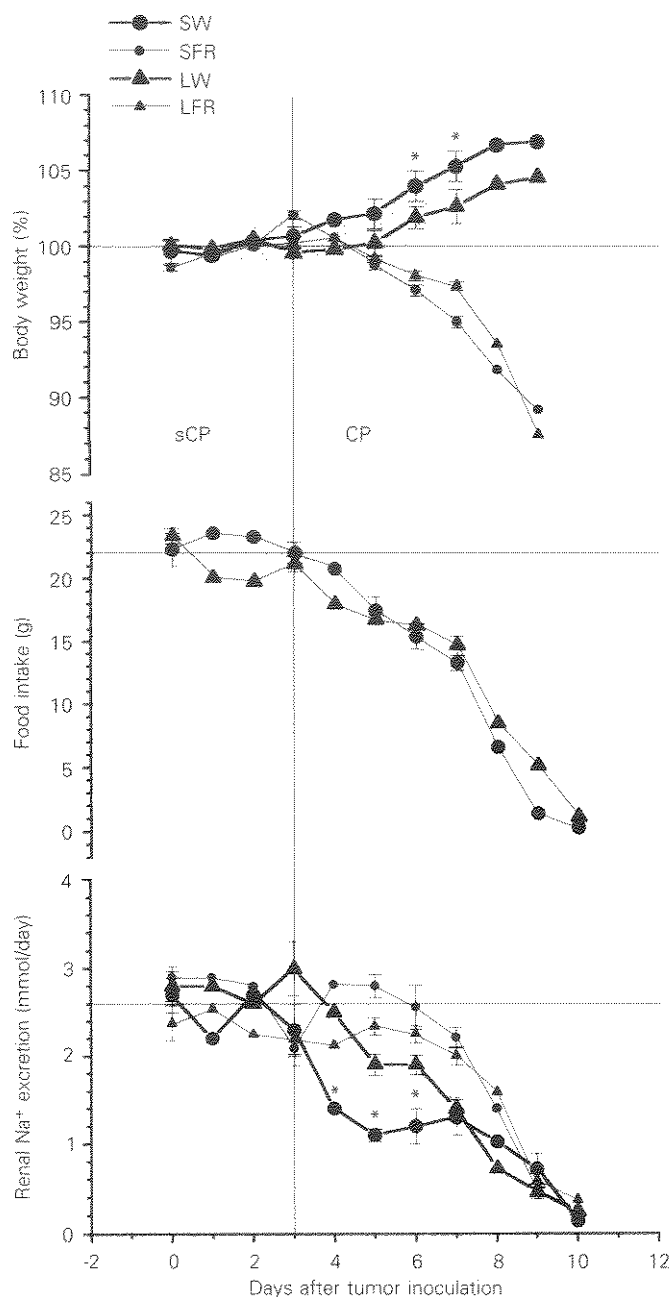


Figure 2 - Time course of the changes in body weight and renal Na⁺ excretion in septal-lesioned tumor-bearing rats (LW; N = 15) compared with sham-operated tumor-bearing rats (SW; N = 7) and their respective non-tumor-bearing controls, sham-operated food-restricted (SFR; N = 7) and lesioned food-restricted (LFR; N = 10) rats. Food intake is given for the SFR and LFR groups. During the clinical period (CP), body weight gain and renal Na⁺ excretion in LW rats were temporarily altered in relation to the SW rats (LSD test, *P<0.05 for SW x LW). sCP, Subclinical period.

sodium excreted through the kidneys decreased to values close to 40%. Nevertheless, the rise in fractional sodium balance during the early days of CP was smaller in LW than in SW rats, since SW rats became significantly different from their non-tumor food-restricted controls (SFR) by the fourth day after tumor cell inoculation ($SW = 47.6 \pm 6.4\%$ and $SFR = 4.5 \pm 8.3\%$; $P < 0.05$), while in the LW group (LW in relation to LFR) this only occurred after day 5 ($LW = 25.7 \pm 4.8\%$ and $LFR = 10.5 \pm 3.9\%$; $P < 0.05$). Besides, the fractional sodium balance of the LW group was significantly lower than in the SW group from day 4 to 6 (day 4: $SW = 47.6 \pm 6.4\%$ and $LW = 13.8 \pm 5.2\%$; day 5: $SW = 57.5 \pm 3.5\%$ and $LW = 25.7 \pm 4.8\%$;

day 6: $SW = 54.4 \pm 3.8\%$ and $LW = 32.1 \pm 4.4\%$; $P < 0.05$) (Figure 3). All of these results suggest that during this period a reduction in tumor-induced sodium retention had taken place, although later on the full tumor effect also developed in the septal-lesioned rats.

Changes in body fluids

Indirect evidence of a change in water balance accompanying sodium retention was obtained by observing body weight and urine volume changes. As shown in Figure 4, food-restricted rats (SFR and LFR groups) presented a rise in urine output during CP as a consequence of the body weight loss seen in these animals. However, in tumor-bearing rats, although urine output had been significantly reduced in SW rats (up to -0.85 ml/100 g body weight) and increased in LW rats (up to 4.5 ml/100 g body weight), both groups presented a body weight gain which indicated water retention. Figure 5 shows the fluid retention of the SW and LW groups by plotting the differences between body weight of tumor-bearing groups and their respective controls (SW minus SFR and LW minus LFR).

Osmolar excretion

The fractional sodium balances and indirect water balances just presented show that during the initial days of the systemic effects LW rats retained less sodium and excreted more urine than tumor-bearers that were not lesioned (SW). To determine whether an alteration in the glomerulo-tubular balance could account for the reduction in tubular sodium reabsorption in these animals, osmolar excretion was assessed (Table 4). There was no increase in osmolar excretion during the CP of the disease in any group, indicating that only water diuresis, and not osmotic diuresis, had occurred in rats of the LW group.

Table 2 - Body weight (%) from the fourth to the seventh day after tumor cell inoculation in sham-operated tumor-bearing (SW; N = 7) and septal-lesioned tumor-bearing (LW; N = 15) rats.

Data are compared to their respective non-tumor-bearing controls, i.e., sham-operated food-restricted (SFR; N = 7) and septal-lesioned food-restricted (LFR; N = 10) rats. ^{abc} $P < 0.05$ (least significant difference test, SW x SFR and LW x LFR).

Day	Body weight (%)			
	SW (N = 7)	SFR (N = 7)	LW (N = 15)	LFR (N = 10)
4	101.8 ± 0.6	100.5 ± 0.4	99.8 ± 0.5	100.5 ± 0.4
5	102.2 ± 1.0^a	98.7 ± 0.3^a	100.2 ± 0.9	99.2 ± 0.2
6	104.0 ± 1.0^{ac}	97.1 ± 0.3^a	101.9 ± 0.7^{bc}	98.1 ± 0.3^b
7	105.3 ± 1.1^{ac}	95.3 ± 0.3^a	102.7 ± 1.1^{bc}	97.4 ± 0.3^b

Table 3 - Renal sodium excretion (mmol/day) from the fourth to the seventh day after tumor cell inoculation in sham-operated tumor-bearing (SW; N = 7) and septal-lesioned tumor-bearing (LW; N = 15) rats.

Data are compared to their respective non-tumor-bearing controls, i.e., sham-operated food-restricted (SFR; N = 7) and septal-lesioned food-restricted (LFR; N = 10) rats. ^{abc} $P < 0.05$ (least significant difference test, SW x SFR and LW x LFR).

Day	Renal Na ⁺ excretion (mmol/day)			
	SW (N = 7)	SFR (N = 7)	LW (N = 15)	LFR (N = 10)
4	1.4 ± 0.2^{ab}	2.8 ± 0.2^a	2.6 ± 0.2^b	2.1 ± 0.1
5	1.1 ± 0.1^{ab}	2.8 ± 0.2^{ac}	1.9 ± 0.1^b	2.3 ± 0.1^c
6	1.3 ± 0.2^{ab}	2.5 ± 0.2^a	1.8 ± 0.1^b	2.2 ± 0.1
7	1.3 ± 0.2^a	2.2 ± 0.1^a	1.4 ± 0.1^b	2.1 ± 0.1^b

Autopsy findings

Autopsies revealed only incipient lymph node metastases that could not have interfered with the present results.

Discussion

Tumor and disease evolution

In the present study we confirmed that, although the time course of Walker 256 tumor followed its usual pattern of evolution (10) with an sCP and CP in both SW and LW rats, in the latter animals tumor-induced sodium and water retention was temporarily reduced. The multifocal tumor inoculation model was fundamental to this study since it dramatically hastened the onset of tumor effects and abrogated individual differences in the time course of the disease. In contrast to single site tumor inoculation (10), the tumor started very early in all animals, independent of the presence of septal lesions. At this stage the mechanical effects of tumor masses or metastases were insignificant, allowing the effects observed to be interpreted as systemic or remote effects of the tumor.

Effect of septal lesions on tumor-induced alterations in water and electrolyte balances

The simple analysis of the time course changes in body weight and sodium excretion in intact, sham-operated and septal-lesioned rats confirmed that the tumor had a reduced effect on salt-water balance in the last group (Figures 2 and 5). In SW rats, tumor-induced anorexia was paradoxically accompanied by a body weight gain because of sodium and water retention (10,11), while in LW animals the initial effect on sodium and water retention was temporarily reduced. As expected, SFR and LFR animals showed a reduction in body weight.

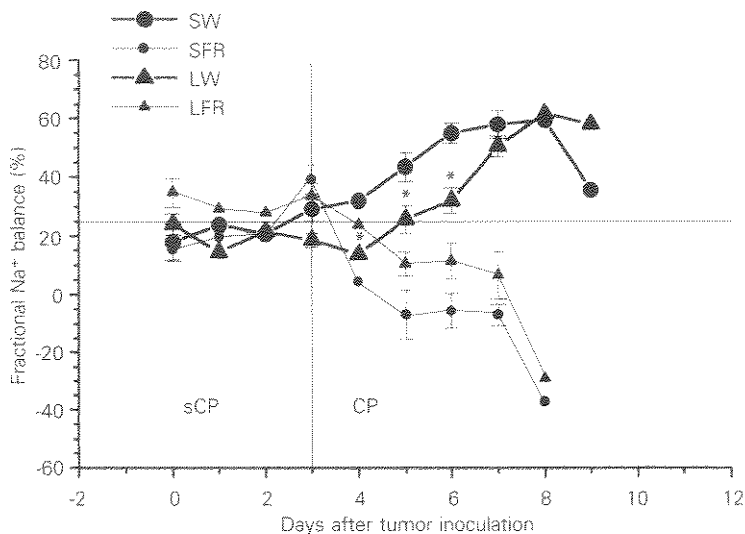


Figure 3 - Time course of sodium retention induced by the tumor in septal-lesioned tumor-bearing rats (LW; N = 15) compared with sham-operated tumor-bearing rats (SW; N = 7) and their respective non-tumor-bearing controls, sham-operated food-restricted (SFR; N = 7) and lesioned food-restricted (LFR; N = 10) rats. The fractional sodium balance was calculated as (input-output) $\times$ 100/input, where input is the food intake (g/day) $\times$ diet sodium content (mEq/g), and output is the urine volume (ml/day) $\times$ urine sodium concentration (mEq/ml). During the clinical period (CP), the tumor-induced Na^+ retention was temporarily reduced in LW rats compared with SW rats (least significant difference test, $*P < 0.05$ for SW $\times$ LW). sCP, Subclinical period.

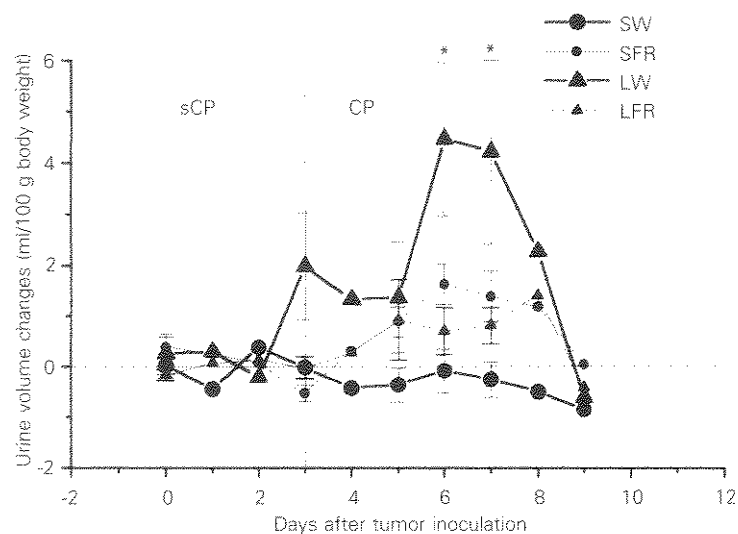


Figure 4 - Time course of urine output observed in septal-lesioned tumor-bearing rats (LW; N = 15), compared with sham-operated tumor-bearing (SW; N = 7) and their respective non-tumor-bearing controls, sham-operated food-restricted (SFR; N = 7) and lesioned food-restricted (LFR; N = 10) rats. During the clinical period (CP), the urine production was significantly increased in LW (least significant difference test, $*P < 0.05$ for SW $\times$ LW). sCP, Subclinical period.

Possible mechanism of temporary reduction in sodium reabsorption in LW rats

Since the osmolar excretion did not increase in LW rats (Table 3), it seems unlikely that an alteration in the glomerulo-tubular balance could account for the reduction in sodium reabsorption in these rats. Thus, the elevated urine output in LW rats observed during CP reflected an increased water excretion (water diuresis). Furthermore, it seems reasonable to suppose that the decrease in sodium and fluid reabsorption in septal-lesioned rats could reflect the development of a secondary diuretic response which would be a "reversal" of the secondary antidiuretic response seen in SW rats (10,11). In this case antidiuretic hormone (ADH) may be involved. The main effect of ADH is water

retention, but this hormone also induces some sodium retention (21). Thus, in intact rats, ADH may potentiate the tumor-induced sodium retention, while in lesioned rats, inhibition of ADH release due to the lesion would result in a large volume of diluted urine accompanied by a reduction in sodium reabsorption.

In our working hypothesis, one or more humoral factors of tumoral origin would induce renal Na^+ retention which would elevate the plasma Na^+ concentration followed by water retention (10,11). In fact, during CP we have found a significant rise in plasma Na^+ concentration in multifocally inoculated rats when compared with food-restricted controls (plasma $[\text{Na}^+]$ in tumor-bearing rats = 156 ± 2.3 and in food-restricted controls = 142 ± 2.6 , $P < 0.01$; Rettori O, unpublished data). Thus, we suppose that this combination might lead to conflicting physiological signals for ADH release when a high extracellular Na^+ concentration (and osmolality) acting through hypothalamic receptors induces ADH release, while a high extracellular volume acting through the vascular volume receptor would lead to ADH inhibition. In SW rats, the net result would be a rise in ADH (low volume of concentrated urine accompanied by some sodium retention), while in LW rats the result would be a marked ADH inhibition (large volume of diluted urine with some decrease in Na^+ reabsorption), possibly as a result of lesions in the septal area pathways involved in ADH release (22). This proposition supports the hypothesis described previously that one septal role in water regulation is to stimulate supraoptic cells during dehydration which then release more ADH, causing the animal to conserve water (23). To confirm our proposition, future experiments with ADH concentration studies should be planned.

Conclusion

Sodium and fluid retention induced by

Figure 5 - Fluid retention changes of sham-operated (SW) and septal-lesioned (LW) tumor-bearing groups shown by plotting the differences between body weight of tumor-bearing groups and their respective controls (Figure 2; SW minus sham-operated food-restricted (SFR) and LW minus septal-lesioned food-restricted (LFR)). sCP, Sub-clinical period; CP, clinical period.

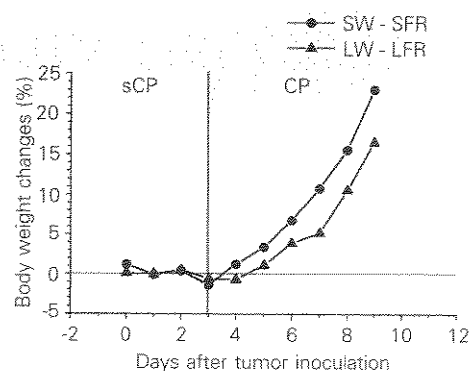


Table 4 - Comparison of osmolar excretion (mOsm/day) during the clinical period (CP; average of values obtained on days 5 to 7) and the subclinical period (sCP) in septal-lesioned tumor-bearing (LW; N = 15), sham-operated tumor-bearing (SW; N = 7), sham-operated food-restricted (SFR; N = 7) and septal-lesioned food-restricted (LFR; N = 10) groups.

	sCP (mOsm/day)	CP (mOsm/day)
SW (N = 7)	35.2 ± 2.1	33.3 ± 2.9
SFR (N = 7)	35.4 ± 2.8	36.3 ± 2.3
LW (N = 15)	45.3 ± 2.1	41.3 ± 1.6
LFR (N = 10)	32.6 ± 2.1	31.1 ± 1.7

the Walker 256 tumor was temporarily reduced in animals with septal area lesions. This effect was possibly a result of an inhibition of ADH release caused by the lesion rather than the elimination of a tumor-induced antinatriuretic effect.

Acknowledgments

The authors are indebted to Dr. T.C. Cavalcanti for assistance and helpful discussions of this paper and to Dr. S. Hyslop for valuable assistance in the preparation of the text.

References

1. Eastern Cooperative Oncology Group (1980). Prognostic effect of weight loss prior to chemotherapy in cancer patients. *American Journal of Medicine*, 69: 491-497.
2. Graf W, Glimelius B, Pahlman L & Bergström R (1991). Determinants of prognosis in advanced colorectal cancer. *European Journal of Cancer*, 27: 1119-1123.
3. Pasqualetti P, Casale R, Collacciani A & Colantonio D (1991). Prognostic factors in multiple myeloma: a new staging system based on clinical and morphological features. *European Journal of Cancer*, 27: 1123-1126.
4. Rustig VK (1987). Epidemiology of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology Clinics of North America*, 16: 545-551.
5. Tacaks FJ (1974). Fluid and electrolyte problems in patients with advanced carcinoma. *Medical Clinics of North America*, 59: 449-457.
6. Blackburn SL, Maini BS, Bistran BR & McDermott WV (1977). The effect of cancer on nitrogen, electrolyte, and mineral metabolism. *Cancer Research*, 37: 2348-2353.
7. Garattini S, Bizzi A, Conelli MG, Guitani A, Samanin R & Spreafico F (1980). Anorexia and cancer in animals and man. *Cancer Treatment Reviews*, 7: 115-140.
8. Baillie P, Millar FK & Pratt AW (1965). Food intake and Walker tumor growth in rats with hypothalamic lesions. *American Journal of Physiology*, 201: 293-300.
9. Scott OCA (1991). Tumor transplantation and tumor immunity: A personal view. *Cancer Research*, 51: 757-763.
10. Rettori O, Vieira-Matos AN & Tahin QS (1995). Variability and discontinuity of the pathognomic systemic effects caused by the Walker-256 tumor progression in rats. *Tumori*, 81: 370-377.
11. Rettori O, Vieira-Matos AN & Gontijo JAR (1996). Reduced renal sodium excretion in Walker-256 tumor-bearing rats. *Acta Physiologica Latino Americana*, 46: 111-118.
12. Morrison SD (1968). Effect of growth of a tumor on the regulation of water intake. *Journal of the National Cancer Institute*, 41: 1241-1248.
13. Morrison SD (1971). Water intake and exchange and hydration of rats during growth of Walker 256 carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 46: 825-830.
14. Morrison SD (1974). Sodium and the cachexia and hypophagia of tumor growth. *Journal of the National Cancer Institute*, 52: 869-874.
15. Toal JN, Millar FK, Brooks RH & White V (1960). Sodium retention by rats bearing the Walker carcinosarcoma 256. *American Journal of Physiology*, 200: 175-181.
16. Harvey JA & Hunt HF (1965). Effect of septal lesions on thirst in the rat as indicated by water consumption and operant responding for water reward. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 59: 49-56.
17. Negro Vilar A, Gentil CG & Antunes-Rodrigues J (1965). Influência do sistema límbico na ingestão de cloreto de sódio e água no rato. *Ciência e Cultura*, 17: 253 (Abstract).
18. Covian MR (1966). Fisiologia del'área septal. *Acta Physiologica Latino Americana*, 16: 119-152.
19. Paxinos G & Watson C (1986). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. 2nd edn. Academic Press, New York.
20. Papiłowsky A & Isaacson RL (1990). Nimodipine accelerates recovery from the hyper-emotionality produced by septal lesions. *Behavioral and Neural Biology*, 53: 133-139.
21. Pitts RF (1968). Regulation of volume and osmolar concentration of extracellular fluid. In: Pitts RF (Editor), *Physiology of the Kidney and Body Fluids*. Year Book Medical Publishers Incorporated, Chicago.
22. Haibara AS, Saad WA, Camargo LAA, Menani JV, Renzi A, De Luca Jr LA & Antunes-Rodrigues J (1992). Opiate activation suppresses the drinking pressor and natriuretic responses induced by cholinergic stimulation of the medial septal area. *Brain Research Bulletin*, 28: 155-160.
23. Bridge JG (1976). Unit activity in the septal nuclei during water deprivation, drinking, and rehydration. In: De France JF (Editor), *Advances in Behavioral Biology. The Septal Nuclei*. Plenum Press, New York.

The SciELO logo, featuring the word "SciELO" in a serif font, with a stylized, thick, curved line arching over the letters "E" and "L".

• • • • •

Caribe de Informação em Ciências da Saúde

<http://www.scielo.br>

The development and operation of SciELO are sponsored by FAPESP and carried out in partnership with BIREME. SciELO had its pilot operation during 1997 and the first semester of 1998 with a collection of 10 journal titles. Starting in July 1998, SciELO will progressively include new titles.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE