

CARLOS AMILCAR PARADA



ESTRESSE E RESPOSTA IMUNE PRIMÁRIA

EM RATOS COM LESÃO SEPTAL

Este exemplar corresponde a Redação Final da Tese defendida pelo candidato Carlos Amílcar Parada e aprovada pela Comissão julgadora, Campinas, 21 de Fevereiro de 1992.

Gilberto A. Fernandes

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

Orientador: Prof. Dr. Gilberto D'Assunção Fernandes†

Campinas, São Paulo

1991

97-58361
P212e

16455/BC

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Aos Ratos:

Os únicos que deram o sangue
por este trabalho.

Este Trabalho foi realizado no Laboratório Experimental de Fisiologia Clínica do Departamento de Patologia Clínica no Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP e contou com o apoio financeiro das seguintes instituições:

-Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior - CAPES

-Pró-Reitoria de Pesquisas da UNICAMP, Campinas

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Giberto D'Assunção Fernandes, pela orientação, amizade e confiança.

A Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Fisiologia e aos seus professores

Aos professores Drs. Renato Marcos E. Sabbatini, Ernesto José Dottaviano e Cláudio Lucio Rossi, pela análise prévia deste trabalho.

Aos professores e funcionários do Departamento de Fisiologia e Biofísica do Instituto de Biologia da UNICAMP.

Ao prof. Dr. Antunes Rodrigues, do Departamento de Fisiologia do Instituto de Biologia da Universidade de São Paulo - Ribeirão Preto.

Ao Roberto César Sthal e Willian Adalberto Silva, pela amizade e apoio técnico nos experimentos.

Aos demais funcionários do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental - F.C.M. UNICAMP e aos colegas de laboratório Tereza Carvalho Baptiston e Antonio Carlos Galvan.

CONTEÚDO

PREFÁCIO.....	i
AGRADECIMENTOS.....	ii
CAPÍTULO I	
INTRODUÇÃO.....	1
-Estresse E Resposta Imune.....	1
-Os Glicocorticóides Como Mediadores Do Efeito Do Estresse Na Resposta Imune.....	5
-Outros Hormônios E Neuropeptídeos Mediadores Da Neuroimunomodulação.....	14
-A Influência Do Sistema Imune Nas Atividades Neuro-Endócrinas.....	20
-A Influência Das Estruturas Límbicas Na Resposta Imune.....	25
-Estresse E Corticosterona Em Ratos Com Lesão Septal.....	27
CAPÍTULO II	
OBJETIVOS.....	32
CAPÍTULO III	
MATERIAL E MÉTODOS.....	33
1.MODELO EXPERIMENTAL.....	33
Animais.....	33
Grupos Experimentais.....	26
2.LESÃO DA ÁREA SEPTAL.....	34
Procedimento Cirurgico.....	34
Controle da Lesão.....	36
3.COLETA DE SANGUE.....	37
Técnica.....	38
Estocagem do Soro.....	39
4.PROCEDIMENTO DO ESTRESSE.....	39
5.SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS.....	40

6.PESO DOS ORGAOS E ANIMAIS.....	41
Peso dos Animais.....	41
Peso dos Orgãos.....	41
7.DETERMINAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE PRIMÁRIA.....	42
Imunização.....	42
Dosagens das Imunoglobulinas.....	43
8.DOSAGEM DA CORTICOSTERONA.....	44
9.ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	45
10.SEQUÊNCIA EXPERIMENTAL E FLUXOGRAMA.....	46
Sequência Experimental.....	46
Fluxograma.....	47

CAPITULO IV

RESULTADOS.....	48
1.LOCALIZAÇÃO E EXTENSÃO DA LESÃO.....	48
2.PESO CORPORAL.....	52
3.PESO DAS GLÂNDULAS.....	52
3.1-PESO DAS ADRENAIS.....	52
3.2-PESO DO TIMO.....	55
3.3-RESUMO.....	56
4.RESPOSTA IMUNE PRIMÁRIA.....	59
4.1-IMUNOGLOBULINAS TOTAIS SÉRICAS.....	59
-Cinética da Concentração de Ig Total.	61
-Resumo.....	62
4.2-IMUNOGLOBULINAS G SÉRICAS.....	65
-Cinética da Concentração de Ig G.....	66
-Resumo.....	67
4.3-IMUNOGLOBULINAS (T-G) SÉRICAS.....	70
-Cinética da Concentração de Ig (T-G).	71
-Resumo.....	72
5.CORTICOSTERONA SÉRICA.....	76
5.1-NÍVEIS BASAIS DE CORTICOSTERONA.....	76
5.2-NÍVEIS DA CORTICOSTERONA NO ESTRESSE (IMUNIZAÇÃO).....	76
5.3-CINÉTICA DA CORTICOSTERONA AO LONGO DA RESPOSTA IMUNE.....	76

5.4-RESUMO.....	80
CAPÍTULO IV	
DISCUSSÃO.....	84
-A Lesão Septal E Os Níveis De Corticosterona.	84
-O Estresse E A Resposta Imune Primária (Timo e Imunoglobulinas).....	91
-O Efeito Da Lesão Septal Na Resposta Imune Primária.....	96
-Cinética Da Corticosterona Ao Longo Da Resposta Imune.....	105
-Animais Septais: Um Modelo Do Efeito Da Corticosterona Na Resposta Imune ?.....	108
CAPÍTULO V	
CONCLUSÕES.....	110
CAPÍTULO VI	
RESUMO.....	112
CAPÍTULO VII	
SUMMARY.....	113
CAPÍTULO VIII	
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	114

I. INTRODUÇÃO

Estresse E Resposta Imune

Um grande número de estudos, tornou evidente que um agente estressante e aversivo produz mudanças em quase todos os sistemas biológicos do corpo, comprometendo a homeostasia do organismo, tanto em animais como em humanos, envolvendo uma complexa cadeia de processos biológicos e psicológicos. O sistema imune não é uma exceção, pois também está sujeito às alterações funcionais provocadas pelo estresse, que pode diminuir ou aumentar a resposta imunológica do organismo, por um mecanismo ainda não bem conhecido (STEIM, KELLER, SCHLEIFER, 1985).

Entretanto, COHEN (1987) sugeriu uma reavaliação dos critérios metodológicos necessários à elucidação das complexas relações entre os estímulos ambientais, os fatores neuro-endócrinos e a reatividade imunológica. Segundo este autor, imunologistas, fisiologistas e psicólogos concluíram que são poucos os trabalhos que possuem um parâmetro imune objetivo que possa medir, *in vivo* ou *in vitro*, uma relação não controvertida entre a função imune comprometida pelo estresse e a aquisição de uma doença.

A dificuldade de se estabelecer tal relação se deve às enormes diferenças genéticas e expressões fenotípicas da resposta imune. Mesmo em animais da mesma

espécie, tanto a reação imunológica (COHEN 1987), como a reação ao estímulo aversivo (MORLEY, KAY, SOLOMEN e PLOTNIKOFF, 1987) possuem características muito individuais, devido às influências da memória, aprendizado, treinamento e condicionamento que as respostas imune e neuro-endócrina estão sujeitas durante a vida.

Segundo COHEN (1987) e GRIFFIN (1989), o estresse agudo não exerce um efeito significativo na imunocompetência. É apenas o estresse crônico que causa um prejuízo da imunidade, compatível com o possível desenvolvimento da doença. No estresse agudo, as mudanças aparentemente desastrosas observadas, são um recurso do organismo para as respostas típicas aos estímulos aversivos, conhecidas como Respostas de Fuga-Afrontamento, fundamentais para a sobrevivência (COHEN, 1987 e GRIFFIN, 1989).

A despeito das observações de COHEN (1987) com relação ao estresse e aquisição de doenças, a influência do estresse na resposta imune parece ser evidente.

OKIMURA e NIGO (1986) ; OKIMURA, OGAWA, YAMAMUSHI e SASAKI (1986) ; BORANIC et alii (1987) e PERICIC et alii (1987) verificaram que o estresse de contenção, em ratos, levava a uma redução significativa do número de P.F.C. (Células Formadoras de Placas) no baço e da produção de anticorpos. Os dados destes autores não revelaram nenhuma alteração da resposta imune, quando o estresse foi aplicado após a imunização.

Resultados semelhantes foram encontrados por

BALUTSOV (1989, 1990) em ratos submetidos à imobilização durante 24 horas, antes da imunização com antígeno timo-dependente (hemácias de carneiro). Estes autores observaram também que o estresse por imobilização aplicado após a imunização promovia uma estimulação da resposta imune observada.

Por outro lado, TESHIMA et alii (1987) não observaram alterações significativas na resposta imune humoral de ratos submetidos à imobilização durante 12 horas, mesmo quando a imunização era realizada após o estresse.

Na maioria dos trabalhos envolvendo estresse e resposta imune, a imunossupressão é observada quando o estímulo estressor é aplicado antes da imunização (GRIFFIN, 1989 e DANTZER e KELLEY, 1989), contudo em uma série de experimentos realizados por ZALCMAN, MINKIEWICZ-JANDA, RICHTER e ANISMAN (1988) para avaliar o efeito do estresse na resposta de anticorpos em camundongos, foi verificado que choque elétrico aplicado nas patas dos animais, 72 horas após a imunização com Hemácias de Carneiro (HC), era capaz de reduzir a resposta de Células Formadoras de Placas (PFC) no baço.

Vários estudos demonstraram que diferentes tipos de estresse são capazes de alterar diversos segmentos da atividade funcional imunológica (GRIFFIN, 1989). Estresse psico-social, tal como a separação de indivíduos da mesma família, submissão por status social menor e convivência em ambientes super-populosos, são frequentemente associados à

imunossupressão (RAAB et alii, 1986 e RABIN, LYTE, EPSTEIN e CAGGIULA, 1987).

LYSLE, LYTE, FOWLER e RABIN (1987) analisaram o efeito supressivo de diferentes frequências de choques na reatividade mitogênica-induzida de linfócitos de ratos, avaliando as medidas de tal reatividade em tempos variáveis depois do choque. Os resultados mostraram que a magnitude do decréscimo da reatividade dos linfócitos tanto no baço como no sangue ao mitógeno Con-A (concanavalina-A), foi diretamente proporcional ao número de choques aplicados nas sessões diárias. Entretanto, ao contrário do observado no sangue, esta supressão da resposta imune no baço, diminuiu à medida que repetidas sessões de choques foram aplicadas, diariamente.

CROISET et alii (1987a), por outro lado, observaram um aumento da reatividade do sistema imune, tanto *in vivo* como *in vitro*, em camundongos submetidos a choques elétricos brandos, aplicados nas patas, antes da imunização com o mitógeno concanavalina-A.

Os efeitos mais comumente observados do estresse na imunidade são a atrofia tímica, com consequente redução da proliferação dos linfócitos T e uma diminuição dos níveis de imunoglobulinas G (OKIMURA e NIGO, 1986; RABIN, LYTE, EPSTEIN e CAGGIULA, 1987; ZALCMAN et alii, 1988 e KORNEVA e SHKLINEK, 1990).

BLALOCK e SMITH (1985) afirmaram que o estresse, via corticosterona, era capaz de afetar apenas a atividade

dos linfócitos T e provocar uma involução tímica, mas que os linfócitos B não tinham suas atividades alteradas pelo estresse .

Neste sentido, o timo tem sido descrito como um órgão intermediário entre o sistema neuro-endócrino e eventos imunes, durante o estresse (HADDEN, 1987 e DESCHAUX e ROVABHIA, 1987).

Os Glicocorticóides como Mediadores do Efeito do Estresse na Resposta Imune

Os glicocorticóides, produto final do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, são certamente, os mais estudados e um dos principais mediadores da interação endócrina-imune.

O cortisol, mais comum no homem, e a corticosterona, nos roedores, estão estreitamente ligados à resposta endócrina do estresse e são constantemente usados como um índice endocrinológico da intensidade do estresse (MUNCK, GUYRE e HOLBROOK, 1984).

Tentando estabelecer um paralelo entre a intensidade do estresse e a resposta adrenocortical, NATELSON et alii (1988), analisaram os níveis de corticosterona sérica, a partir de amostras de sangue de ratos submetidos a três diferentes intensidades de estresse, durante quatro semanas. Os resultados indicaram que diferenças individuais na reatividade ao estresse, bem como

a intensidade do estresse, podem influenciar o padrão da resposta adrenocortical no curso de repetidas administrações de estímulos estressantes.

No mesmo sentido, PITMAN, OTTENWELLER e NATELSON (1988), postularam a existência de uma comunicação intra-específica da qualidade e intensidade do estresse com a resposta adrenocortical.

Muitos dos efeitos do estresse na imunidade, tem sido relacionado ao aumento da liberação de cortisol ou corticosterona, uma resposta característica de um estresse agudo (MUNCK, GUYRE e HOLBROOK, 1984).

Quase a totalidade dos trabalhos envolvendo estresse e resposta imune analisam a imunocompetência à luz dos níveis séricos de corticosterona.

Para isolar a ação dos glicocorticóides na resposta imune, uma vasta quantidade de trabalhos envolvendo adrenalectomia, injeção de metirapona (inibidor enzimático da síntese de corticosterona) e uso de dexametasona (glicocorticóide sintético) foram realizados e recentemente revisados por GRIFFIN (1989), e DANTZER e KELLEY (1989).

Contudo, o papel dos glicocorticóides na mediação dos efeitos do estresse na imunidade ainda não está bem esclarecido. Este efeito parece depender da natureza, intensidade e duração do estímulo estressante e da resposta imune a ser analisada, ou ainda, das características das populações de células que participam da reação a

determinados antígenos.

Um estudo que pode ser um exemplo do envolvimento da corticosterona na imunocompetência, foi realizado por SAPOLSKY e DONNELLY (1985)

Atualmente os trabalhos realizados neste sentido tem dado mais ênfase nos aspectos qualitativos do estresse e seu impacto na imunidade humoral e tecidual.

ESTERLING e RABIN (1987), trabalhando com uma forma de estresse severo e agudo (rotação do animal pela cauda) para verificar o efeito da corticosterona estresse-induzida na imunidade de ratos imunizados com hemácias de carneiro, observaram que animais estressados intactos apresentavam um significativo decréscimo do número de linfócitos T-auxiliadores (Th) esplênicos, ao passo que animais estressados, porém submetidos a adrenalectomia, apresentavam um aumento significativo de linfócitos T-supressores (Ts) e um número normal de linfócitos Th. Estes autores observaram, contudo, que a função adrenal e o aumento dos níveis de corticosterona não influenciaram a atividade dos linfócitos B.

Outros autores como PERICIC et alii (1987) e BORANIC et alii (1987) verificaram em seus experimentos que apenas o efeito da corticosterona não era suficiente para explicar a imunossupressão observada durante o estresse.

O estresse pode provocar diferentes efeitos nos processos imunes, provavelmente devido às diferenças entre os componentes neuro-endócrinos envolvidos no estresse e as

propriedades das diferentes populações de células que participam das reações imunológicas. Neste sentido, um recente estudo realizado por KORNEVA e SHKLINEK (1980) analisa os efeitos de diferentes tipos de estresse nos níveis circulantes de Ig G, imunoglobulinas totais e corticosterona de ratos. Os dados destes autores revelaram que a exposição ao frio (-20°C) durante 10 minutos, elevou o nível de corticosterona 350% acima do controle e reduziu os níveis de Ig G e imunoglobulinas totais pela metade. Entretanto, o estresse provocado pela convivência durante 21 dias em ambiente lotado, apesar de elevar os níveis de corticosterona em torno de 200%, não afetou a resposta imune humoral. O mesmo foi observado quando os ratos foram submetidos a uma única sessão de natação durante 15 minutos. Por outro lado quando foram submetidos a 5 sessões diárias de natação, os níveis de corticosterona aumentaram 500% e os níveis de Ig G e imunoglobulinas totais também tiveram um incremento de aproximadamente 50%.

Resultados semelhante foram encontrados por GHANTA, HIRAMOTO, SALVASON e SPECTOR (1985) e CROSET et alii (1987a,b), os quais sugeriram a existência de uma certa independência entre ação do estresse e a da corticosterona na resposta imune.

Atualmente é aceito que ocorre uma única, porém diferente resposta endócrina para diferentes agentes estressores (físico, químico ou psicológico), o qual varia entre as diferentes espécies e nos diferentes indivíduos da

mesma espécie (DUNN, 1988 b).

Não resta dúvidas que os glicocorticóides são apenas um entre os muitos hormônios que são liberados durante o estresse, contudo, a despeito do estresse, os efeitos dos glicocorticóides no sistema imune são extremamente diversos e foram revistos recentemente por BATEMAN, SINGH, KRAL e SOLOMON (1989).

É sabido que o controle por retroalimentação dos glicocorticóides inibe a síntese, tanto basal como estimulada, e a secreção de ACTH, β -endorfinas e CRF, por uma ação na hipófise, no hipotálamo e em outros sítios do cérebro (KRAFT et alii, 1983; KRIEGER, 1983 e KELLER-WOOD e DALLMAN, 1984).

A secreção de interleucina-1 (IL-1), que desempenha um importante papel nas relações endócrino-imunes, também está sujeita ao controle por retroalimentação negativa desempenhado pelos glicocorticóides que, portanto, podem regular sua própria produção durante os eventos imunes, não apenas pela inibição do hipotálamo e da hipófise, mas também pela inibição da produção de IL-1, que é um estimulante do eixo HHA (BATEMAN e col., 1989). Evidências demonstram que os glicocorticóides também inibem as interleucinas-2 (IL-2), as quais são um importante fator de crescimento dos linfócitos T (WERB, FELEY e MUNCK, 1978).

Os glicocorticóides tem efeito em muitos dos sistemas homeostáticos do organismo, porém são mais

frequentemente relacionados à gliconeogênese e com as respostas inflamatórias. O nome glicocorticóide é relativo ao efeito primário da ativação do eixo HHA que reflete em uma hiperglicemia devido o aumento da gliconeogênese hepática. Esta resposta metabólica é importante nas reações do animal às situações de emergência, como no estresse.

DALE e FAUCI, citados por BATEMAN et alii (1989), demonstraram, respectivamente em 1975 e 1976 que os glicocorticóides alteravam a população de células brancas circulantes, causando monocitopenia e linfocitopenia, além de interferirem no acúmulo de leucócitos e macrófagos nos sítios inflamatórios de ratos.

GRAND PERRET e LEMAIRE (1986), demonstraram que a dexametasona induz a inibição da atividade anti-tumor dos macrófagos, mesmo em concentrações fisiológicas correspondentes aos glicocorticóides. Também o desenvolvimento de colônias de monócitos da medula óssea e as secreções de elastase, collagenase, plasminogênio e proteases não específicas dos macrófagos, foram inibidas pela dexametasona (SCHAFFNER, 1985). Segundo estes autores a ação da corticosterona nos macrófagos parece ser receptor-mediada, deste modo, o efeito inibitório dos glicocorticóides nos monócitos/macrófagos é operado tanto diretamente a nível de membrana, como pela modulação da secreção de linfocinas que afetam as funções destas células mononucleares.

No entanto, a ação dos glicocorticóides nos

linfócitos B não está ainda muito esclarecida. ROESS et alii (1982), observaram que em altas concentrações, a corticosterona provocava um decréscimo na secreção de anticorpos e na proliferação dos linfócitos B de ratos imunizados com LPS. Ao contrário destes autores, COOPER, DUCKETT, PETTS e PENNY (1979) demonstraram que a corticosterona era capaz de aumentar a síntese de imunoglobulinas em linfócitos B humanos estimulados pelo mitógeno de pokeweed.

LUSTER et alii (1988), por sua vez, observaram que o crescimento de linfócitos B poderia ser inibido pelo uso de dexametasona e a formação de anticorpos requeria uma concentração maior de glicocorticóides. Estes resultados mostraram que os linfócitos que foram estimulados pelo antígeno e, portanto, tem diferenciada a subpopulação de células secretoras de anticorpos são mais resistentes à inibição pela corticosterona que o resto da população ativa de linfócitos B. Resultados semelhantes foram encontrados por DENNIS et alii (1987) que observaram o efeito primário da dexametasona de suprimir a habilidade dos linfócitos B entrarem no ciclo proliferativo.

JEONG, NAKOINZ e RALPH (1986) evidenciaram um aumento na síntese do fator de indução dos linfócitos B (BIF) pela dexametasona. O BIF é uma substância produzida pelos linfócitos T mitógeno-estimulada que induz a produção das imunoglobulinas Ig G, Ig M e Ig A (RALPH et alii, 1984).

Apesar da atividade do BIF ser importante para a

síntese de imunoglobulinas glicocorticóide-estimuladas, nos sistemas dependentes dos linfócitos T, *in vitro*, este fator não é essencial para o mecanismo de inibição, *in vivo*, da síntese de Ig G pelos glicocorticóides, segundo McMILLAN, LONGMIRE e YELENOVSKY (1976). Estes autores mostraram que, tal como os níveis séricos, os níveis de Ig G da medula óssea foram significativamente diminuídos pelos corticosteróides, porém não provocava nenhum efeito na produção de Ig G pelo baço, um órgão linfóide secundário.

Desde que a medula óssea é responsável por 95% da produção de Ig G (COOPER et alii, 1979), é possível que a ação dos glicocorticóides ocorra exclusivamente a nível de medula óssea, mesmo porque, muitos autores estão de acordo que os linfócitos antígenos-estimulados são relativamente insensíveis à inibição pelos glicocorticóides, enquanto células não estimuladas são frequentemente inibidas (BUTLER, 1975 e SMITH, CRABTREE, KENNEDY e MUNCK, 1977).

GATTI et alii (1987) demonstraram que a atividade das células NK também era diminuída após tratamento com corticosterona, contudo os mecanismos envolvidos nesta inibição ainda são obscuros.

A possibilidade dos glicocorticóides inibirem a atividade das células NK pelas mudanças na composição de subpopulações dos linfócitos T, *in vivo*, não pode ser desprezada. Cortisol e prostaglandinas E₂ foram reconhecidos como inibidores da atividade das células NK de humanos, sendo o cortisol um antagonista do aumento da atividade das

células NK τ -interferon-induzidas (CAVALLO, SARTORI, GATTI e ANGELI 1986).

COMPTON e CIDLOWSKY (1986) e DURANT (1986) demonstraram que por si ou em conjunto com as catecolaminas, administrações de glicocorticóides resultam em um significativo decréscimo do peso do timo e do número de timócitos de ratos.

KELSO e MUNCK (1984) mostraram que a dexametasona, em concentrações fisiológicas, inibia a produção de interleucina-2 e τ -interferon das culturas de linfócitos T.

São estes e tantos outros dados obtidos de muitos trabalhos que dão suporte à idéia da existência de um circuito regulatório entre o Sistema Imune (SI) e o Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA).

Outros Hormônios e Neuropeptídeos Mediadores da Neuroimunomodulação

Parece não restar dúvidas que além dos glicocorticóides, muitos outros hormônios e neuropeptídeos fazem parte da complexa rede que envolve os sistemas imune, endócrimo e nervoso, atuando na neuroimunomodulação. O Hormônio Adreno-corticotrófico (ACTH) e a β -endorfina, estão intimamente relacionados com as relações bidirecionais entre o Sistema Nervoso Central e o Sistema Imune, durante o estresse (MUNCK, GUYE e HOLBROOK, 1984 ; PLOTNIKOFF e MURGO, 1985 e GRIFFIN, 1989).

O ACTH é um produto da clivagem do POMC (proopiomelanocortina), o qual é também precursor das β -endorfinas.

A molécula de POMC tem sido vastamente estudada e atualmente se reconhece que muitos peptídeos que tem como precursor a proopiomelanocortina, desempenham um importante papel nas funções sensoriais do Sistema Nervoso Central (LIOLTA, LOUDES, Mc KELKY e KRIEGER, 1980).

Estudos usando hibridização de RNA mostraram que genes de POMC são expressos nos tecidos do SNC de animais superiores e seus produtos tem sido associados principalmente à ativação do hipotálamo. Recentes estudos realizados por KAPCALA (1988) demonstraram que ACTH e β -endorfina também podem ser produzidos pelos tecidos da córtex cerebral.

A síntese e a secreção de ACTH pela hipófise são controladas pelo CRF (Fator de Liberação de Corticotrofina) do hipotálamo e por outras moléculas bio-ativas. O CRF é sintetizado pelos neurônios parvocelulares dos núcleos paraventriculares e então, transportados para a hipófise, via sistema portal hipotálamo-hipófise (ANTONI, 1986).

RIVIER e PLOTSKY (1986) demonstraram que, na hipófise, além do ACTH, o CRF estimula a secreção de β -endorfina e outros derivados do POMC.

Foi demonstrado que as β -endorfinas aumentam o número de PFC em ratos imunizados com fitohemaglutinina (PHA) ou con-A, ambos mitógenos de linfócitos T não

específicos. Este efeito não é bloqueado pelo naloxone e não é observado com o uso de α -endorfina nem com τ -endorfina, o que mostra o controle da proliferação dos linfócitos no baço ser uma propriedade apenas das β -endorfinas e não dos opióides em geral (GILMAN et alii, 1982).

Por outro lado, as β -endorfinas tem um efeito inibitório na proliferação periférica dos linfócitos T (HEIJNEN, CROISSET, ZULSTRA e BALLIEX, 1987).

MANDLER, BIDDISON, MANDLER e SERRATI, (1986) demonstraram que, em ratos, a atividade das células NK no sangue periférico era aumentada pela β -endorfina e esta resposta poderia ser revertida pelo naloxone. Resultados semelhantes foram encontrados por WYBRAN (1985).

Ao contrário da atividade das células NK periféricas, SHAVIT et alii (1984, 1985) demonstraram que as β -endorfinas suprimiam a atividade destas células no baço de ratos, quando estes eram submetidos a certos tipos de estresse, sendo este efeito abolido pelo naloxone.

Foi demonstrado, também, que as β -endorfinas aumentam a produção, *in vitro*, de interferon, pelas células mononucleares humanas (BROWN e Van EPPS, 1986).

PLOTNIKOFF e MURGO (1985) e PLOTNIKOFF et alii (1985), por conta dos dados que obtiveram em seus experimentos, sustentam a tese de que também as encefalinas estão envolvidas na modulação da resposta imune pelo estresse. Segundo estes autores as encefalinas estão intimamente relacionadas com os esteróides e as

catecolaminas que também são liberadas durante o estresse. Esta relação é, segundo estes autores, o principal mecanismo de estímulo da imunidade celular via encefalinas.

Um aumento da proliferação dos linfócitos T e da atividade das células NK, pelas encefalinas, foi observado, *in vitro*, a partir de amostras de sangue de humanos.

O mecanismo sugerido por PLOTNIKOFF et al. (1985), baseia-se no fato das encefalinas serem liberadas simultaneamente com as catecolaminas e os corticosteróides, durante o estresse.

Ao contrário das endorfinas e encefalinas, o ACTH parece possuir propriedades inibitórias da resposta imune.

Foi demonstrado que o ACTH inibe a produção de interferon pelos esplênócitos e também a resposta de anticorpos por células do baço de ratos imunizados, tanto com antígeno T-dependente, como T-independente (JOHNSON et alii, 1984).

Por outro lado, ALVAREZ-MON, KEHRL e FAUCI (1985) demonstraram que o ACTH aumenta a diferenciação dos linfócitos B humanos, *in vitro*.

O ACTH apesar das evidências que o tornam um peptídeo com potencial imunomodulatório, possui uma participação no sistema regulatório neuro-endócrino-imune mais evidente quando se analisa as influências dos eventos imunes nas repostas endócrinas (LUMPKIN, 1987).

As catecolaminas também são fortes candidatas a mediadoras do efeito do estresse na resposta imune. SIBINGA

e GOLDSTEIN (1988) observaram a influência da adrenalina e noradrenalina no decréscimo da formação de anticorpos em ratos estressados.

Foi demonstrado que tanto a adrenalina como noradrenalina, em doses fisiológicas, são capazes de diminuir a quantidade circulante de linfócitos T-auxiliares (Th), através da estimulação dos receptores adrenérgicos α -1 encontrados nas superfícies destas células (KOFF e DUNEGAN, 1986).

Por outro lado, FUJIWARA e ORITA (1987) demonstraram em camundongos e em humanos que, durante o estresse leve, as catecolaminas contribuem significativamente para um aumento da resposta imune primária, uma vez que a atividade dos linfócitos B e T-supressores (Ts), são estimuladas pela ação da adrenalina e noradrenalina

Certos hormônios e neuro-hormônios hipofisários são reconhecidos atualmente como chaves importantes na modulação da resposta imune e como mediadores da influência do estresse na competência de muitas células do sistema imune (WEIGENT e BLALOCK, 1987).

Vasopressina e a ocitocina, segundo JOHNSON e TORRES (1985) estimulam a produção de γ -interferon pelos linfócitos T(h) e estes dois hormônios foram achados com seus níveis aumentados durante o estresse (WIDEMAN e MURPHY, 1985).

Inúmeros trabalhos conferem ao Hormônio do

Crescimento (GH) ações específicas na atividade imune de células e órgãos imunocompetentes, sugerindo que o GH tenha um importante papel na modulação da resposta imune (KELLEY, 1989 ; KIESS et alii, 1988)

A prolactina parece possuir efeitos estimulatórios na resposta imune (BELUSSI, MUCCIOLI, CORRADO e DI CARLO, 1987 e BERTON et alii, 1987), além de ter sido demonstrado por HIESTAND et alii (1986) que ratos imunizados com concanavalina-A tinham os níveis circulantes de prolactina aumentados.

A insulina, um hormônio que durante o estresse, também esta com seus níveis elevados, causa um aumento na atividade dos linfócitos T, demonstrado, *in vitro*, por SNOW (1987).

BLALOCK, JOHNSON, SMITH e TORRES (1985), e KRUGER e BLALOCK (1986) investigaram o papel imunorregulatório do Hormônio Estimulante da Tireóide (TSH). Os dados destes autores mostram que o TSH é um potente estimulador da resposta de PFC esplênico.

Como descrito acima, muito da responsabilidade neuro-imuno-modulatória descrita, se dá pela presença e ação de neuropeptídeos que mantêm um sistema bidirecional de comunicação entre o cérebro e os órgãos imunocompetentes. São tais elementos que dão uma validade bioquímica às evidências clínicas e epidemiológicas que sugerem a influência de fatores psico-sociais na modulação dos eventos imunes (MORLEY, KAY, SOLOMEN e PLOTNIKOFF, 1987, e GRIFFIN,

1989).

Para reforçar a idéia imunomodulatória destes hormônios e neuropeptídeos, vários trabalhos têm demonstrado a presença de receptores para hormônios e neuro-peptídeos nas membranas dos linfócitos (COFFEY e HADDEN, 1985 ; JHONSON e TORRES, 1985 ; PLOTNIKOFF et alii, 1985 ; WYBRAN, 1985 ; MORLEY et alii, 1987 ; OTTAWAY, 1987 ; WEIGENT e BLALOCK, 1987 ; DANTZER e KELLEY, 1989 e GRIFFIN, 1989).

Por conta destes dados, muitos autores tem atribuído aos linfócitos T um papel chave nas relações bidirecionais entre o Sistema Imune e o Sistema Neuro-Endócrino.

A Influência do Sistema Imune nas Atividades Neuro-Endócrinas

Para confirmar as relações bidirecionais entre o SI e o eixo HHA, muitos trabalhos tem demonstrado que mudanças imunológicas podem resultar na estimulação ou inibição do eixo HHA pelas citocinas liberadas por células imunocompetentes (BATEMAN et alii, 1989 e BESEDOVSKY, DEL REY e SORKIN, 1985).

BESEDOVSKY, SORKIN, KELLER e MULLER (1975), foram os primeiros a observar uma variação nos níveis de corticosterona sérica após imunização com hemácias de carneiro, em ratos. Estes autores demonstraram a ocorrência de um aumento nos níveis basais de corticosterona sérica,

coincidente com o aumento do número de Células Formadoras de Placas (PFC) no baço. O padrão temporal deste aumento dos níveis de corticosterona, relativos ao PFC, sugeriam, segundo estes autores um efeito modulatório deste hormônio na proliferação dos linfócitos B.

Uma das citocinas que atua como um importante mensageiro entre o Sistema Imune e o eixo HHA é a monocina produzida pelos macrófagos conhecida por interleucina-1 (IL-1).

LUMPKIN (1987) demonstrou que a interleucina-1 era capaz de promover a síntese de ACTH, *in vitro*, pelas células da hipófise.

A IL-1 induz a produção de IL-2, uma linfocina T-derivada que estimula a proliferação dos linfócitos pelos órgãos linfóides.

BESEDOVSKY et alii (1985b) observaram que ratos imunizados com vírus da doença de Newcastle (NDV) apresentavam um aumento nos níveis sanguíneos de ACTH e corticosterona. A mesma resposta foi observada quando sobrenadante de cultura de células do baço de ratos infectados com vírus NDV eram injetados, intraperitonalmente em ratos, indicando que estas células, provavelmente estimuladas pelo vírus, produziam um fator que influenciava o eixo HHA. Estes autores demonstraram que tal fator era a IL-1, após observarem que a resposta de ACTH e corticosterona eram abolidas pela injeção de anticorpo anti-IL-1.

DEL REY, BESEDOVSKY, SORKIN e DINARELLO (1987) também observaram uma resposta do eixo HHA após a injeção de IL-1 humana purificada, em ratos. Estes autores verificaram que a injeção de 0,5 µg de IL-1 intraperitoneal induzia, nos ratos, um aumento de ACTH e corticosterona plasmáticas 2 horas após a injeção, retornando ao nível basal após 4 horas. Ainda segundo estes autores, a injeção de IL-2 e τ -interferon não induziu nenhuma resposta de ACTH ou corticosterona.

BERKENBOSH et alii (1987), trabalhando com ratos tratados com antisoro anti-CRF antes da injeção de IL-1, observaram que esta não induzia o aumento de ACTH, entretanto, concentrações elevadas de CRF foram encontradas nos terminais nervosos da eminência média do hipotálamo. Apesar disto, a ação da IL-1 na liberação do ACTH é altamente específica, pois variações nas concentrações de MSH, GH e vasopressina, não foram encontradas durante o experimento.

SAPOLSKY, ARMANINI, PACKAN e TOMBAUGH (1987), por outro lado, verificaram em amostras de sangue tirados do sistema porta-hipofisário de ratos, um aumento do CRF após injeção de IL-1 e observaram que a ocitocina não era afetada.

Estes e tantos outros experimentos têm demonstrado que IL-1 induz a liberação de CRF, porém, apesar de haver alguma evidência, estes trabalhos não são conclusivos no sentido de conferirem ao hipotálamo o sítio de ação das IL-

1.

KATSUURA, GOTTSCHALL, DAHL e ARIMURA (1988) demonstraram a ação das IL-1 no Sistema Nervoso Central. A injeção intracerebroventricular de 30 ng de IL-1 humana, em ratos normais, não anestesiados, promoveu um significativo aumento dos níveis circulantes de ACTH. Esta concentração é, em média, 100 vezes menor que a necessária para uma resposta máxima, quando aplicada intraperitonalmente em ratos adultos.

DUNN (1988a) sugere que a IL-1 atua aumentando a sensibilidade dos neurônios liberadores de CRF, à ação da noradrenalina.

A idéia que as IL-1 circulantes entram no Sistema Nervoso Central através das lacunas encontradas na barreira hematoencefálica (PARTRIDGE, 1983), para induzir ações em vários sítios do cérebro, tem sido considerada por muitos autores (COCEANI, LEES e DINARELLO, 1988).

Entretanto, BERTON et alii (1987) demonstraram a ação das IL-1 aumentando a liberação de ACTH diretamente em culturas de células da hipófise, porém UEHARA, GOTTSCHALL, DAHL e ARIMURA (1987) não observaram o mesmo efeito, também trabalhando com cultura de células da hipófise.

NAITOH et alii (1988) demonstraram que também a interleucina-6 (IL-6) exerce um efeito estimulatório da liberação de corticosterona pela ação no eixo HHA de ratos não anestesiados.

A IL-6, que foi inicialmente identificada como

Fator Estimulante de Hepatócitos, é uma proteína derivada dos monócitos, que estimula a fase aguda da resposta inflamatória e provavelmente seja a mesma molécula do interferon- β 2.

O controle do Sistema Neuro-Endócrino pelo Sistema Imune não é realizado apenas pela ação das interleucinas. Também hormônios e peptídeos sintetizados por células imunocompetentes, como ir-ACTH, ir-MSH, ir-TSH e ir-endorfinas, conferem aos órgãos linfóides uma certa competência endócrina (BLALOCK e SMITH, 1985).

TORRES et alii (1987) demonstraram que, em roedores, os linfócitos T, quando estimulados pela ação de mitógenos, induzem uma liberação de ACTH, cujo acúmulo, apesar de ocorrer em níveis extremamente baixos, é capaz de influenciar a produção deste hormônio pelas adrenais, em virtude de afetar o eixo HHA. OATES et alii (1988) concluíram a mesma coisa, trabalhando com linfócitos humanos.

A regulação da síntese e liberação dos derivados da POMC pelos linfócitos não está completamente esclarecida. Evidências que CRF induz a secreção de ACTH e β -endorfina pelos linfócitos e dexametasona a inibe, foi descrita por SMITH, MORRILL, MEYER III e BLALOCK (1986).

Por outro lado, DUNN e POWELL (1987) verificaram que vírus de Newcastle era capaz de estimular a liberação de IL-1 que, por consequência, induzia a ativação do eixo HHA. Contudo, não constatarem a produção de ACTH pelas células do

baço de animais contaminados.

Devido a seu vasto espectro de atividades, as citocinas liberadas durante a resposta imune são responsáveis pela sinalização entre o cérebro e a periferia, na coordenação de diferentes componentes da resposta orgânica da infecção e inflamação, tais como mudanças no sono (SHOHAM et alii, 1987), mal-estar e decréscimo da ingestão de água e alimentos (TAZI, DANTZER, CRESTANI e LE MOAL, 1988), febre (DINARELLO, 1988) e diminuição das atividades físicas (POLLOCK, LOTZOVA, STANFORD e ROSENTHAL, 1987).

O timo também desempenha um papel importante na comunicação entre o sistema imune e o sistema endócrino. Diferentes tipos de timosinas (peptídeos sintetizados pelo timo), tem sido caracterizados e diferentes efeitos biológicos lhe tem sido atribuído (SPANGELO, HALL e GOLDSTEIN, 1987, e MCGILLIS, HALL, VAHOUNY e GOLDSTEIN, 1985).

Também existem derivados do sistema imune que, ao contrário, são capazes de inibir o eixo HHA. FEIGE et alii (1987) observaram que os macrófagos produzem um fator que inibe eficientemente a ação do ACTH nas adrenais. Este peptídeo é conhecido como TGF- β (Fator β de Transformação de Crescimento).

Influência das Estruturas Límbicas na Resposta Imune

Apesar de várias estruturas cerebrais, principalmente o sistema límbico, influenciarem no sistema neuro-endócrino, a análise desses efeitos pouco se estendeu ao sistema imune.

A literatura é bem mais escassa nas investigações das estruturas cerebrais envolvidas na neuro-imunomodulação.

BERCZI, NAGY, KOVACS e HORVATH (1981), observaram que, em ratos hipofisectomizados, a resposta imune primária e secundária eram severamente afetadas após imunização com hemácias de carneiro. Os dados destes autores demonstraram que tanto os títulos de imunoglobulinas 2-mercaptoetanol-sensíveis (IgM), como os títulos de imunoglobulinas mercaptoetanol-resistentes (IgG), avaliados ao longo dos 15 dias após a imunização, estavam significativamente diminuídos nos animais hipofisectomizados.

BELLUARDO et alii (1987) demonstraram que lesões por eletrotermocoagulação da região hipotalâmica medial do cérebro de camundongos, produzia uma significativa redução das atividades das células NK e dos linfócitos. Estes autores observaram que a atividade da hipófise estava intacta e portanto o efeito supressor da lesão não se devia às alterações da dinâmica dos corticosteróides.

Tentando estabelecer melhor o papel do hipotálamo na resposta imune, KATAYAMA, KOBAYASHI, KURAMOTO e YOKOYAMA (1987) realizaram uma série de lesões bilaterais nas porções anterior, média e posterior do hipotálamo e investigaram o tempo de curso da dinâmica proliferativa de uma amostra de linfócitos no sangue periférico de camundongos.

Os resultados indicaram que as porções anteriores e posteriores do hipotálamo desenvolvem um papel na modulação de linfócitos T. O hipotálamo medial foi considerado um sítio do mecanismo de controle da regulação tanto dos linfócitos T como dos linfócitos B.

KORNEVA (1987) mostrou que nos picos de resposta imune, determinado pelo número de PFC do baço, a frequência de impulsos neuronais no núcleo hipotalâmico ventromedial aumentava, tornando claro o envolvimento desta região do cérebro na expressão da resposta imune.

Finalmente GARKAVI, KVAKINA, KOROBE-INIKOVA e EVSTRATOVA (1988) analisaram o estado morfofuncional dos órgãos do sistema timo-linfático após estimulação eletrogênica de várias estruturas do sistema límbico.

A estimulação das diferentes estruturas cerebrais relacionadas à emoção levou a diferentes processos de adaptação não-específica no sistema timo-linfático.

A estimulação dos núcleos laterais do septo, promoveu uma elevação da atividade imune, entretanto a atividade funcional do sistema timo-linfático nos ratos com estimulação do globo palidum, foi menor que nos controles

não submetidos a nenhuma estimulação.

Estresse E Corticosterona Em Ratos Com Lesão Septal

Ratos com lesão septal são frequentemente associados a um comportamento indócil diante de estímulos ambientais, apresentando hiperreatividade e hiperemotividade logo nas primeiras horas após a lesão.

ALBERT e STORLIEN (1969) ; GAGE e OLTON (1975); ALBERT e BRAYLEY (1979); BLANCHARD, BLANCHARD, LEE e NAKAMURA (1979), e ALBERT e CHEW (1980) tornaram evidente o fato das mudanças comportamentais do animal septal ocorrerem após a lesão dos núcleos septais medial e laterais, bilateralmente.

Lesões exclusivas do núcleo septal medial não produzem mudanças comportamentais tão evidentes quanto as observadas nas lesões mais amplas da área septal (ALBERT e WONG, 1978), podendo, segundo POPLAWSKY e JOHNSON (1973), acentuar o estado de tranquilidade nos ratos.

BRAYLEY e ALBERT (1977), também observaram que a estimulação elétrica do núcleo septal medial de ratos não era capaz de produzir mudanças em suas reações , diante de estímulos táteis ou sonoros.

Segundo KELSEY (1975); MC GINNIS, NANCE e GORSKI (1978) ; DONOVICK, BURRIGHT e BENGELLOUN (1979) e GOGATE, SALGAR, BRID e WINGKAR (1989), os comportamentos

hiperreativos nos animais septais, é caracterizado por mudanças dos comportamentos típicos da espécie e vêm acompanhados por alterações do sistema neuro-endócrino, devido à destruição dos núcleos que conectam as estruturas anteriores do cérebro ao hipotálamo.

Na tentativa de conferir à área septal um papel modulatório do Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA), SEGGIE e BROWN (1973) observaram que ratos com lesão septal não alteram seus níveis de corticosterona, quando submetidos a um controle rígido das modificações ambientais, porém mostram um elevado nível de corticosterona plasmática quando são manipulados.

ENDRÖCZI e NYAKAS (1971) ; WILSON e CRITCHLOW (1973) ; SEGGIE, UHLER e BROWN (1974) ; SEGGIE, SHAW, UHLER e BROWN (1974), e UHLER, SEGGIE e BROWN (1974) observaram que, em condições basais, a lesão dos núcleos septais não alteravam o ciclo circadiano e os níveis basais de corticosterona. Segundo estes autores, apenas situações estressantes eram capazes de induzir uma resposta exagerada do eixo hipotálamo-adrenal.

Contudo, USHER, LIEBLICH e SIEGEL (1974) demonstraram que a destruição eletrolítica dos núcleos septais laterais não era capaz de alterar os níveis de corticosterona em ratos submetidos à privação de alimentos.

ENDRÖCZI e NYAKAS (1971) verificaram que ratos com lesão septal rostral apresentavam a atividade do Eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA) proporcional à intensidade

das respostas motoras ao estímulos estressantes aplicados.

FELDMAN e CONFORTI (1980), analisando o papel do núcleo septal medial na mediação da resposta adreno-cortical à estimulação do nervo ciático, a estímulos acústicos, luminosos e ao estresse psicológico, em ratos machos, observou que, ao contrário dos outros estímulos, a resposta adreno-cortical à estimulação do nervo ciático foi completamente bloqueada nos animais com lesão do núcleo septal medial.

A prolactina é também um hormônio que frequentemente tem seus níveis elevados durante o estresse, porém a análise dos níveis deste hormônio, feita em ratos com lesão septal em condições basais e de estresse, mostrou que a prolactina não sofre influência dos núcleos septais, provavelmente por possuir um mecanismo neural de controle diferente da corticosterona (BROWN et alii, 1974 ; UHLIR et alii, 1974 e POLKOVITS, MAKAVA, LERANTH e VAN ARA, 1980).

A reação exagerada dos animais com lesão septal lateral e conseqüentemente da resposta do eixo HHA, contudo, tende a diminuir à medida que repetições dos estímulos vão sendo aplicados (ALBERT et alii, 1978 ; BLANCHARD et alii, 1979 ; DONOVICH, BURRIGHT, FANELLI e ENGELLEMME, 1981, e POPLAWSKY e ROBBIN, 1989).

Foi demonstrado que estímulos ambientais constantes, tanto pré- como pós-operatórios atenuam a hiperreatividade provocada pela lesão septal (ALBERT e CHEW, 1980). Por exemplo: o manuseio pós-operatório dos animais

septais pelo experimentador atenuou, segundo HAMMOND e TUOMAS (1971), e GOTSICK e MARSHALL (1972), a hiper-reação dos ratos à manipulação.

LATHAM e THORNE (1974) concluíram que o decréscimo da hiperreatividade é relativo apenas aos estímulos ou situações que possuam uma certa constância no cotidiano destes animais.

A área septal é considerada por muitos neuro-anatomistas e neuro-fisiologistas não apenas como um ponto de convergência das informações corticais e periféricas com o sistema límbico, mas também um ponto de eferência e aferência das informações originárias das várias estruturas do próprio sistema límbico (GAGE e OLTON, 1975 ; MEIBACH e SIEGEL, 1977a,b ; ALBERT e CHEW, 1980 ; GRAY e MC. NAUGHTON (1983) ; MESULAM, MUFSON, LEVEY e WAINER, 1983 ; MESULAN, MUFSON, LECREY e WAINER, 1983 ; BURSTEIN e GIESLER, 1989 ; CAO, INANAMI, SATO e SOTO, 1989 ; BLAND, COLOM e FORD, 1990, e O'BRIEN, SVENDSEN, ISACSON e SOFRONIEW, 1990).

POPLAWSKY e ISAACSON (1990) propõem que os impulsos oriundos da convergência entre o sistema límbico e o neocórtex passam pelos núcleos septais, de modo que as alterações neste mecanismo estão provavelmente envolvidas no comportamento dos animais com lesão nesta área e o consequente reflexo neuro-endócrino da corticosterona.

Uma das principais relações morfo-funcionais do septo é com o hipotálamo. Fibras eferentes primárias dos núcleos septais laterais e região central do septo anterior

projetam-se no hipotálamo anterior e lateral (MEIBACH e SIEGEL, 1977b ; ALBERT e CHEW, 1980 ; BLAND, COLOM e FORD, 1990 e FERRIS, GOLD, DE URIES e POTEAL, 1990)

FELDMAN, CONFORTI e SIEGEL (1982) investigaram projeções eferentes do área septal para o hipotálamo. A estimulação elétrica, por meio de um eletrodo cronicamente implantado no núcleo septal medial, induziu um significativo aumento nos níveis de corticosterona plasmática em ratos adultos anestesiados. Contudo, a deaferentação hipotalâmica anterior, ou completa, bloqueou completamente a resposta adreno-cortical e a deaferentação hipotalâmica posterior atenuou o nível elevado de corticosterona.

De acordo com a influência septal na função hipófise-adrenal, DUNN e MILLER (1986) e DUNN (1987) verificaram que a estimulação dos núcleos septais ventrolaterais levava a um aumento na concentração plasmática de corticosterona, ao passo que a estimulação do núcleo septal medial provocava uma redução destes níveis.

Estes dados sugerem, portanto, que a exemplo do hipocampo (DUNN e ORR, 1984) e complexo amigdalóide (DUNN e WHITENER, 1986), o septo é outra estrutura límbica que serve como um agregado de núcleos subservindo funções distintas e até opostas. Assim a área septal não deve ser considerada como uma entidade única, no mínimo, deve ser dividida em componentes medial e lateral.

II. OBJETIVOS

Devido o efeito imunossupressivo dos glicocorticóides, relatado por vários autores, muitos dos efeitos do estresse na imunidade tem sido relacionado ao aumento da corticosterona plasmática, característica do estresse agudo em roedores. O fato dos animais com lesão na área septal apresentarem uma hiperreação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal apenas diante de estímulos estressores, torna interessante a investigação da participação dos núcleos septais na modulação da resposta imune primária pelo estresse.

A verificação da influência da lesão da área septal na resposta de anticorpos a um estímulo antigênico, aplicado em animais mantidos em condições basais, também se justifica, pois alguns trabalhos têm demonstrado a participação de estruturas límbicas na modulação da resposta imune.

De maneira inversa, este trabalho tem como objetivo, também a investigação de possíveis influências dos eventos imunes na atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal de animais com lesão dos núcleos septais.

III. MATERIAL E MÉTODOS

III.1 MODELO EXPERIMENTAL

Animais

Foram utilizados 65 ratos albinos da linhagem *Wistar*, machos, na idade de 2 a 3 meses, fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP. Estes animais foram mantidos por 15 dias no biotério do laboratório para adaptação às condições ambientais e à alimentação, em gaiolas coletivas. Após este período os animais foram mantidos em gaiolas individuais até o término do experimento.

O biotério do laboratório possui fotoperíodo alternando cada 12 horas, com iluminação das 6 às 18 horas e temperatura em torno de 28°C. Foram fornecidas água e ração à vontade.

Grupos Experimentais

Os ratos utilizados foram divididos aleatoriamente em quatro grupos:

-GRUPO COM LESÃO CIRÚRGICA SIMULADA MANTIDO EM CONDIÇÕES BASAIS E IMUNIZADO (GRUPO CO), considerado o grupo de animais controle.

-GRUPO COM LESÃO CIRÚRGICA SIMULADA SUBMETIDO AO ESTRESSE E IMUNIZADO (GRUPO ES).

-GRUPO COM LESÃO SEPTAL MANTIDO EM CONDIÇÕES BASAIS E IMUNIZADO (GRUPO SB).

-GRUPO COM LESÃO SEPTAL SUBMETIDO AO ESTRESSE E IMUNIZADO (GRUPO SE).

-GRUPO COM LESÃO SEPTAL MANTIDO EM CONDIÇÕES BASAIS E NÃO IMUNIZADO (GRUPO SB_N).

III.2 LESÃO DA ÁREA SEPTAL

Procedimento Cirúrgico

Os animais após anestesia com éter-anestésico (*Rhodia*), foram colocados em um aparelho estereotático do tipo *KRIEGH-JONHSON* e submetidos à aspiração da área septal.

Inicialmente foi feita, com bisturi, uma incisão longitudinal na pele, previamente tricotomizada, e no tecido celular subcutâneo, triscando o osso ao longo da incisão. Com auxílio de uma esfera de algodão presa a uma pinça, o perióstio foi afastado, expondo deste modo a calota craniana onde foram feitas duas perfurações com broca esférica de aço, 2 mm à direita e à esquerda do bregma (cruzamento entre as suturas coronal e sagital) como mostrado no esquema da figura 1(A). A determinação exata das medidas foram calculadas segundo as coordenadas do atlas de PAXINOS E WATSON (1986) e a obtenção dos pontos craniométricos a serem perfurados foi possível utilizando as

escalas milimétricas do aparelho estereotáxico.

Em ambas as perfurações foram utilizadas uma cânula de 1 mm de diâmetro na qual, para amenizar o máximo o ferimento dos tecidos supra-septais, foi colocado um fio de aço inoxidável de 0,9 mm de diâmetro, obstruindo desta maneira, a luz da cânula quando da sua introdução nos tecidos cerebrais. A cânula que estava fixada no aparelho estereotáxico, era posicionada na área a ser aspirada e em seguida, removia-se o fio de aço. Feito isto, a mesma era acoplada, por intermédio de um tubo de plástico, a uma bomba de sucção. A cânula foi introduzida 7 mm a partir da calota craniana e com uma inclinação de 5° ora à direita, ora à esquerda do plano sagital (fig.1), permanecendo no cérebro por 5 segundos após a pressão de aspiração ter atingido 10 pol.de Hg. A operação foi realizada bilateralmente.

Após a aspiração da área septal, a pele foi suturada e 1 cc de Pentabiótico Veterinário foi aplicado via intra muscular, além da administração de Terramicina por via oral, durante 10 dias. Os animais foram utilizados no experimento após 30 dias de cirurgia.

Os ratos com lesão simulada foram submetidos aos mesmos procedimentos cirúrgicos, com exceção da aspiração da área septal.

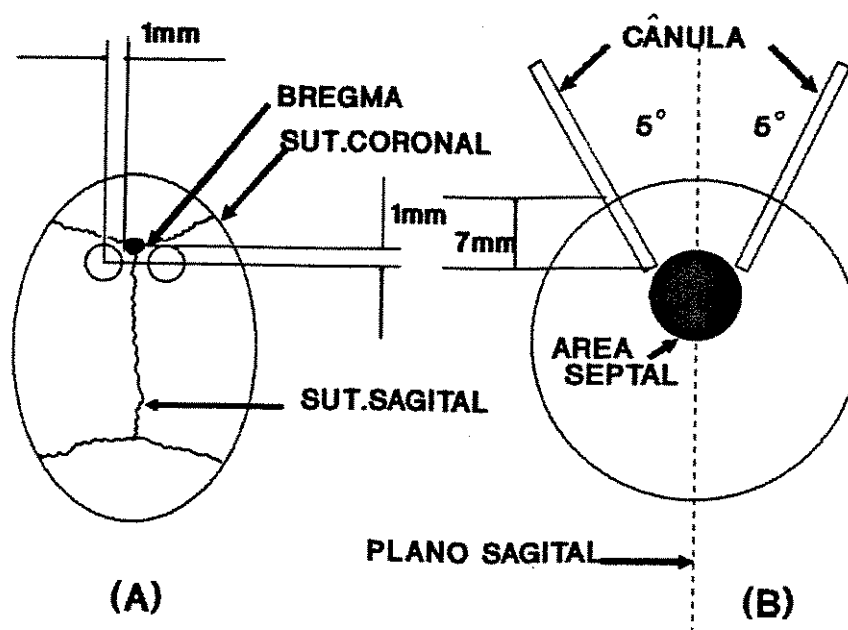


Figura 1 (A)- Esquema das perfurações na calota craniana, 2 mm a direita e a esquerda do bregma, feitas com broca esférica de aço de 3mm de diâmetro. (B)- A cânula foi introduzida 7 mm com uma inclinação de 5° com o eixo sagital.

Controle da Lesão

A extensão da lesão foi analisada nos cérebros fixados em formalina, através de cortes histológicos, feitos no plano coronal em histocriótomo. Os tecidos de 50 micras de espessura foram corados com Hematoxilina-Eosina e observados em lupa estereoscópica.

Para efeito de documentação, a lesão era desenhada em fotocópias dos esquemas do atlas estereotáxico ou fotografadas quando necessário.

III.3 COLETA DE SANGUE

A coleta de sangue, pela cauda do rato, realizada a intervalos de dias regulares e sempre no período matinal, entre 9 e 10 horas, foi importante para a determinação das cinéticas da resposta imune e hormonal. Para tanto, foram retirados de cada animal, em torno de 0,5 ml de sangue em cada sessão de coleta, obtendo-se assim aproximadamente, 200 μ l de soro.

A primeira coleta foi realizada antes da administração de hemácias de carneiro, no 30º dia após a cirurgia, para a determinação dos níveis basais de corticosterona nos diferentes grupos e confirmar a ausência de anti-corpo anti-hemácia-de-carneiro circulantes. Os dados obtidos nesta etapa foram considerados controles das etapas seguintes, para cada grupo.

Imediatamente após a sessão de estresse, à qual os animais dos grupos com lesão simulada e lesão septal (ES e SE) foram submetidos, também foram coletados amostras de sangue para a determinação dos níveis circulantes de corticosterona em tais condições.

Todos os animais foram submetidos à coleta de sangue ao 3º, 6º, 9º, 12º e 15º dia após a imunização com hemácias de carneiro. Os animais do grupo SB_N, no qual foi

inoculado apenas soro fisiológico, o sangue foi coletado no 3º e 12º dias após a inoculação.

Com exceção do 15º dia (sacrifício), nos demais dias as amostras de sangue foram coletadas conforme descrito abaixo:

Técnica

Para que os níveis de corticosterona não se alterassem demasiadamente devido aos procedimentos, provavelmente estressantes, da coleta, foi decidido, baseado em dados da literatura, que o tempo total da mesma não deveria ultrapassar 4 minutos.

Para coletar o sangue pelas veias caudais do rato, inicialmente os mesmos eram transportados individualmente ao laboratório e imediatamente colocados em uma caixa contendo uma lâmpada na câmara ao lado onde ficava o animal. O calor liberado pela lâmpada de 60 watts, irradiava-se para a câmara do animal que atingia uma temperatura de aproximadamente 38°C. As câmaras eram separadas por uma divisória de madeira, para que a claridade da lâmpada não atingisse o rato.

Após 1 minuto, o rato era removido da caixa e era feita uma incisão transversal a 3 mm da ponta da cauda, a qual era, em seguida, introduzida em um tubo de vidro especialmente projetado para a coleta de sangue. Este tubo era adaptado a uma bomba de vácuo, de modo que uma

pressão, no vacuômetro, de 15 lb/Hg era suficiente para provocar uma dilatação mecânica nas veias caudais do rato, fazendo com que o sangue escoasse para dentro de um tubo-de-ensaio, adaptado ao sistema de coleta.

Os animais submetidos à coleta de sangue aguardavam, pelo menos, 2 horas em uma sala isolada, antes de retornar ao biotério, para se recuperarem do estresse sofrido durante tais procedimentos e não induzirem estresse no resto dos animais do biotério.

Estocagem do Soro

Uma vez coletado, o sangue era deixado coagular à temperatura ambiente e centrifugado por 10 minutos a 1.500 r.p.m. separando o soro que dividido em alíquotas foi conservado a -25°C até o momento das dosagens hormonais e de imunoglobulinas.

III.4 PROCEDIMENTO DO ESTRESSE

A condição estressante à qual os animais foram submetidos, foi a contenção por 12 horas, no período noturno, à temperatura ambiente.

Os ratos foram colocados em cilindros plásticos, perfurados para que houvesse ventilação e

fechados nas extremidades, cujas dimensões impossibilitavam qualquer movimento dos animais.

Durante o período de contenção, os animais além de imobilizados, permaneceram sem água e ração. Após a sessão de estresse, os animais foram recolocados em suas gaiolas individuais, porém permaneceram em ambientes separados dos ratos não submetidos ao estresse. Esta medida tentava evitar que os animais estressados afetassem o comportamento daqueles mantidos em condições basais.

III.5 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS

No 15º dia após a imunização (item 3.7.1), os ratos foram sacrificados por decapitação na guilhotina.

Os animais eram separadamente pesados e removidos do biotério ao laboratório, onde foram sacrificados dentro de 2 minutos, evitando assim alterações nos níveis de corticosterona devido um eventual estresse durante o procedimento.

Para que não houvesse variações da corticosterona devido o ritmo circadiano, os sacrifícios e consequentemente as coletas de sangue foram realizadas nos mesmos períodos que as demais coletas, ou seja pela manhã, entre 9 e 10 horas.

A obtenção do soro e estocagem foram feitas da mesma maneira que descrita no item 3.3. Os cérebros dos ratos operados foram removidos e conservados em formalina

10% para análise histológica

Também foram removidos o timo e as adrenais de todos os animais para a determinação de seus pesos.

Nesta etapa do experimento, foi feito o hematócrito dos animais, para verificar se as sucessivas coletas de sangue não tinham espoliado os animais.

III.6 PESO DOS ÓRGÃOS E DOS ANIMAIS

Peso dos Animais

Todos os ratos foram pesados no dia da cirurgia, 15 dias após e no dia do sacrifício.

Peso dos Órgãos

O timo e as adrenais, removidas após o sacrifício, foram limpas de tecido adventício e pesadas em balança de torsão com precisão de 0.01 mg. Os pesos foram expressos em miligramas do órgão por 100 g de peso corporal do rato (peso relativo).

III.7 DETERMINAÇÃO DA RESPOSTA IMUNE PRIMÁRIA

A avaliação da resposta imune primária foi feita a partir das dosagens séricas de imunoglobulinas totais (Ig TOTAL) e imunoglobulinas 2-mercapto-etanol resistentes (Ig G), após a imunização com hemácia de carneiro (HC).

Imunização

Cada rato foi imunizado com 5×10^8 hemácias de carneiro em 1 ml de solução fisiológica, por via intraperitoneal. As hemácias foram colhidas, assepticamente, em solução *Alsever* e mantidas em geladeira.

Após serem lavadas por três vezes com solução fisiológica, preparou-se a suspensão a ser inoculada.

Os animais submetidos ao estresse, foram imunizados imediatamente após o término da contenção e em seguida à coleta de sangue.

Nos animais não imunizados, foram injetados, intraperitonealmente, 1 ml de solução fisiológica livres de Hemácias de Carneiro.

Dosagens das Imunoglobulinas

Foi usado o teste de hemaglutinação para a determinação de Ig G e Ig Total circulantes, segundo a técnica de *TAKATSY (1955)*.

Esumidamente esta técnica consiste em observar em uma placa de fundo em "V" a precipitação de hemácias de carneiro, usadas aqui apenas como indicadoras da ausência ou não de imunoglobulinas.

Esta técnica não nos permite quantificar em valores absolutos as imunoglobulinas, apenas nos fornece valores relativos de sua quantidade, através da titulação do soro. Para cada dosagem de imunoglobulina (IG Total e Ig G) foram utilizados 50 µl dos soros estocados, dos ratos. Os soros a serem analisados foram diluídos ao 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512, 1/1024, 1/2048 e 1/4096, de maneira que quando a precipitação das hemácias de carneiro ocorriam nas frações de soros muito diluídos, indicava que relativamente havia mais imunoglobulinas que nas precipitações em frações de soros menos diluídos.

Para a determinação da presença de Ig G no soro utilizamos 2-mercapto-etanol que destrói todas as imunoglobulinas, com exceção das imunoglobulinas G.

III.8 DOSAGEM DA CORTICOSTERONA

As concentrações séricas de 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, no caso com o isótopo de hidrogênio, trício (H_3), pelo sítio de ligação com um anticorpo anti-corticosterona.

O complexo antígeno-anticorpo é precipitado, separado das formas livres, e a radiatividade medida em um contador de radiação β . Os valores das dosagens são obtidos pela interpolação dos valores de radiação emitida do hormônio marcado, expresso em Contagem Por Minuto (CPM), em uma curva padrão. Esta curva é obtida pelo radioimunoensaio das alíquotas de corticosterona com padrões de concentrações conhecidas, relacionando assim, radiação expressa em CPM por concentração em ng/ml. A variação das concentrações dos padrões usadas por nós foram 0.1, 0.5, 2.5, 10, 50 e 250 ng/ml.

Foram necessários oito radioimunoensaios de 100 tubos cada, para as dosagens das concentrações de corticosterona. O coeficiente de variação entre os ED 50 dos diferentes RIA foi de 11% e o coeficiente de variação intra-ensaio de 6,01%

III.9 ANALISE ESTATÍSTICA

A comparação das diferenças estatísticas entre as médias das variáveis foi determinada usando ANOVA e o teste TUKEY com nível de significância de 5%

A análise das variáveis corticosterona e imunoglobulinas, no que se refere à interação entre os fatores grupos e épocas (dias) , foi feita usando-se ANALISE FATORIAL.

Os dados usados na análise fatorial das médias foram os $\log_2$ dos títulos das diluições que apresentaram soro aglutinado. As transformações logarítmicas dos dados é necessária, uma vez que, as diluições foram feitas progressivamente pela metade e os eventos observados são relativos às tais diluições.

Para o cálculo das imunoglobulinas (T-G), foram feitas, inicialmente, as diferenças entre os títulos de imunoglobulinas totais e G e em seguida calculou-se o $\log_2$ destas diferenças.

A média dos títulos de imunoglobulinas expressos nos gráficos foram calculados pela expressão:

$$\text{Média do Título} = 2^{(\sum \text{número de diluições}/n)}$$

onde n = número de repetições.

t

III.10 SEQUÊNCIA EXPERIMENTAL E FLUXOGRAMA

Sequência Experimental

01-Adaptação dos Animais ao Biotério.

02-Cirurgia simulada em 20 ratos e aspiração da área septal em 30 ratos.

03-Intervalo de 30 dias para reorganização do Sistema Imune e pesagem aos 15º dia após a cirurgia.

04-Coleta de sangue para as dosagens de imunoglobulinas e corticosterona basais.

05-Contenção dos animais a serem estressados.

06-Coleta de sangue dos animais estressados.

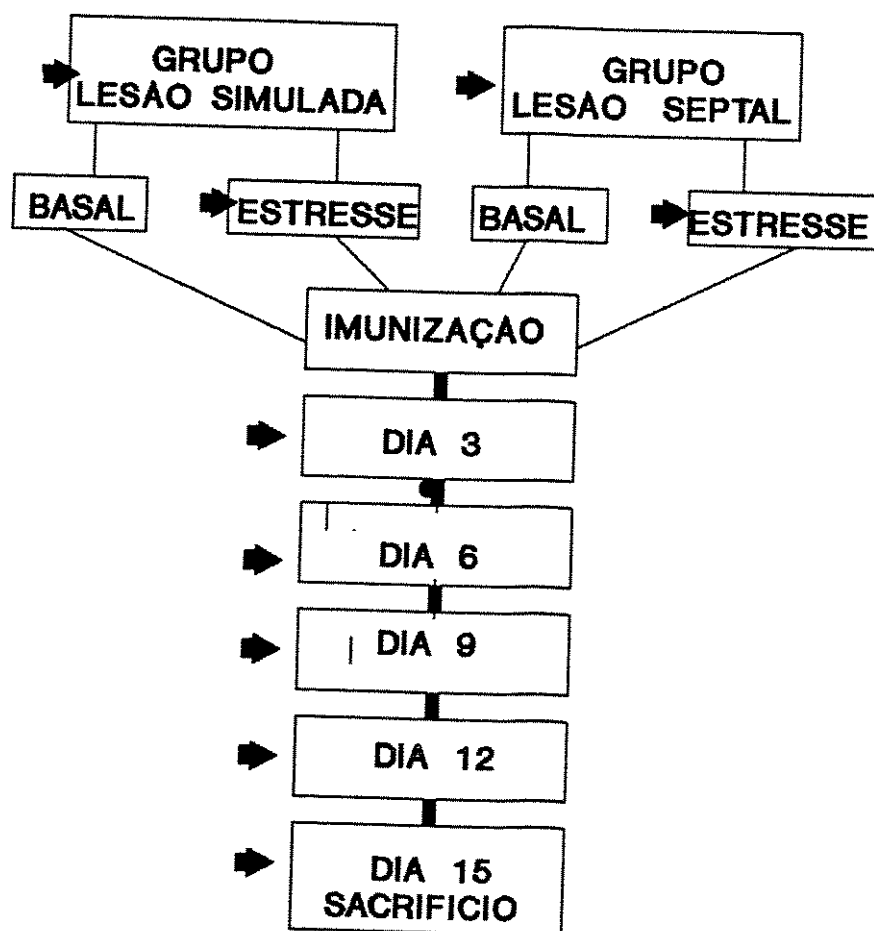
07-Imunização com Hemácia de Carneiro.

08-Coletas de sangue subsequentes à imunização a cada 3 dias durante 12 dias.

09-Pesagem e sacrifício no 15º dia com coleta de sangue e remoção dos órgãos a serem pesados ou analisados.

10-Histologia dos cérebros lesados, pesagem das glândulas e dosagens.

Fluxograma:



➡ coleta de sangue

IV. RESULTADOS

IV.1. LOCALIZAÇÃO E EXTENSÃO DA LESÃO

Pode ser observada nas figuras 1.1 e 1.2 o grau da lesão provocada pela aspiração dos tecidos na região da Area Septal.

A lesão atingiu os núcleos Medial, Triangular e Laterais (Dorsal, Intermediário e Ventral). Também foram lesados os Núcleos Septo-fimbrial e Septo-hipocampal, além de parte do Núcleo Septo-hipotalâmico em alguns animais operados.

A projeção septal do fórnix foi lesada parcialmente em todos os animais submetidos à aspiração da Area Septal e na grande maioria foi lesada uma pequena parte do Corpo Caloso e Putamen Caudato, limites superior e lateral, respectivamente, dos tecidos aspirados.

No sentido ântero-posterior a lesão limita-se a nível do Núcleo Septal Triangular e alguns casos a nível do Terceiro Ventrículo e porções anteriores do Hipocampo e Giro Caudato.

As lesões dos animais, de um modo geral, apresentaram-se bem uniformes, sendo muito pequena a variação entre os limites máximo e mínimo, como pode ser observados no esquema da figura 1.1. Os animais cuja lesão ultrapassou os limites descritos na figura 1.1, foram eliminados do grupo.

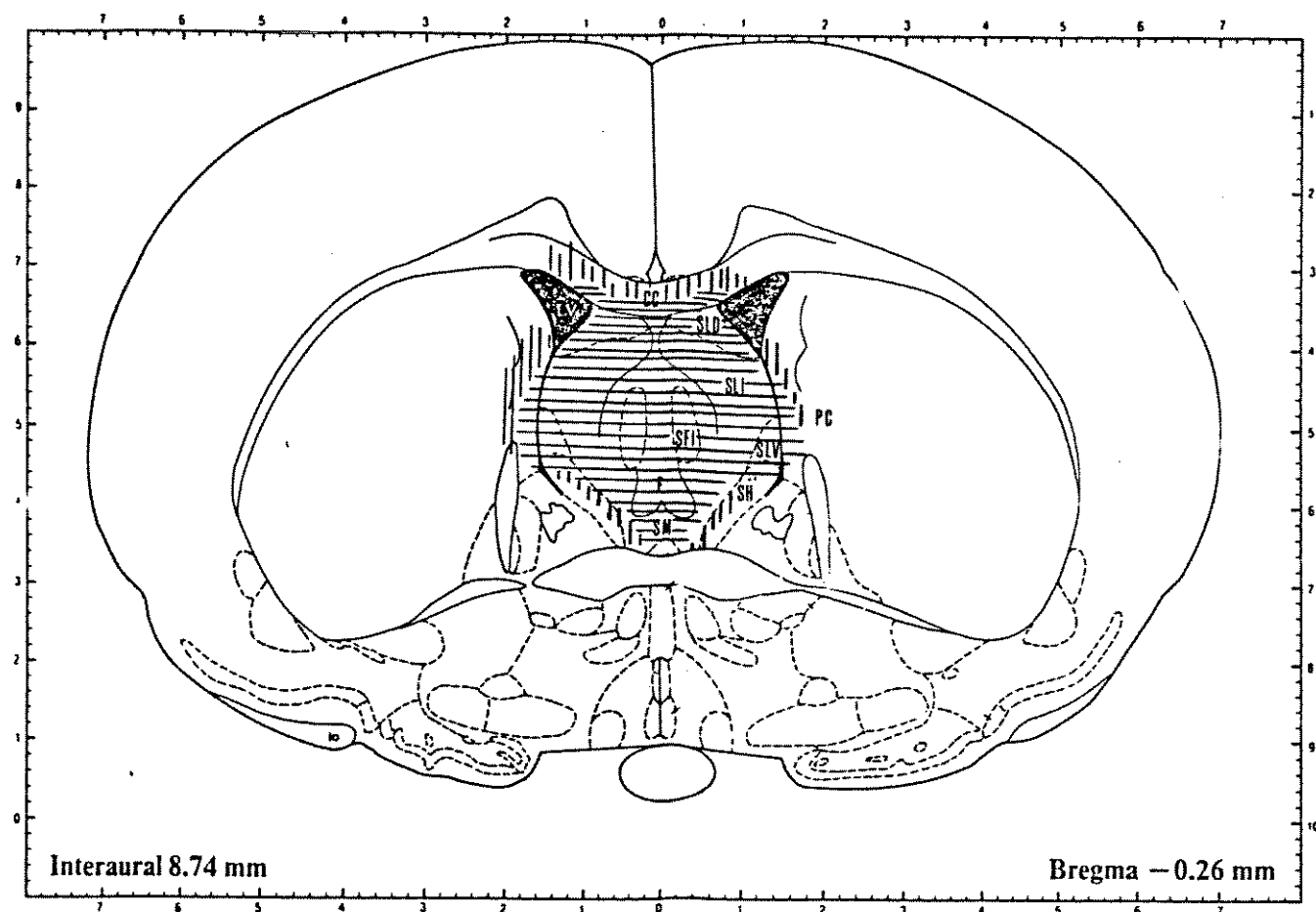


Figura 1.1a- Esquema da área lesada, vista frontal. Lesão Máxima ||||| Lesão Mínima |||||. (CC) Corpo Caloso, (SLD) Núcleo Septal Lateral Dorsal, (SLI) Núcleo Septal Lateral Intermediário, (SLV) Núcleo Septal Lateral Ventral, (F) Fórnix, (SM) Núcleo Septal Medial, (SH) Núcleo Septo-hipocampal, (PC) Putamen Caudato.

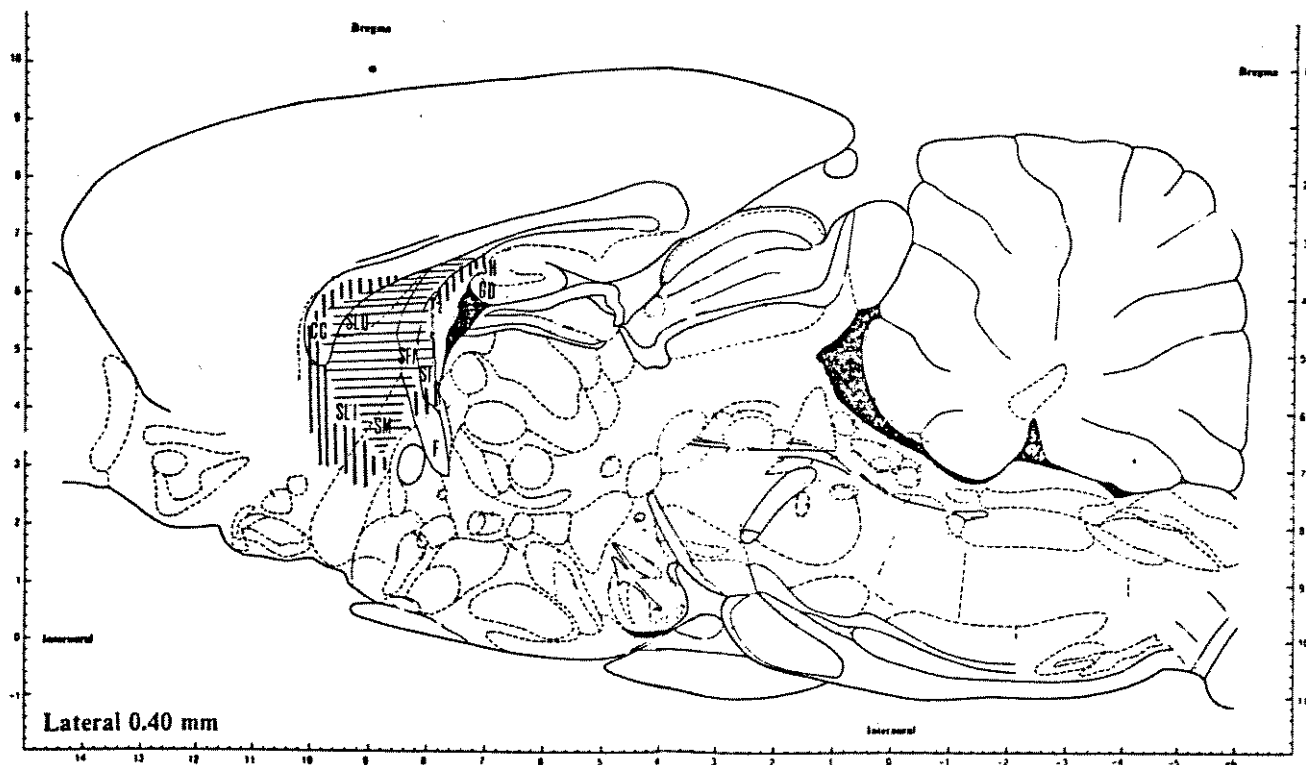


Figura 1.1b- Esquema da Area Lesada. Vista lateral. Lesão máxima ||||| , lesão mínima ||||| (CC) corpo caloso, (SLI) núcleo septal lateral intermediário, (SM) septo medial, (F) fórnix (ST) septo triangular, (SFI) septo-fimbrial, (H) hipocampo, (GD) giro caudato.



Figura 1.2a- Fotografia de corte histológico da área septal do cérebro intacto.

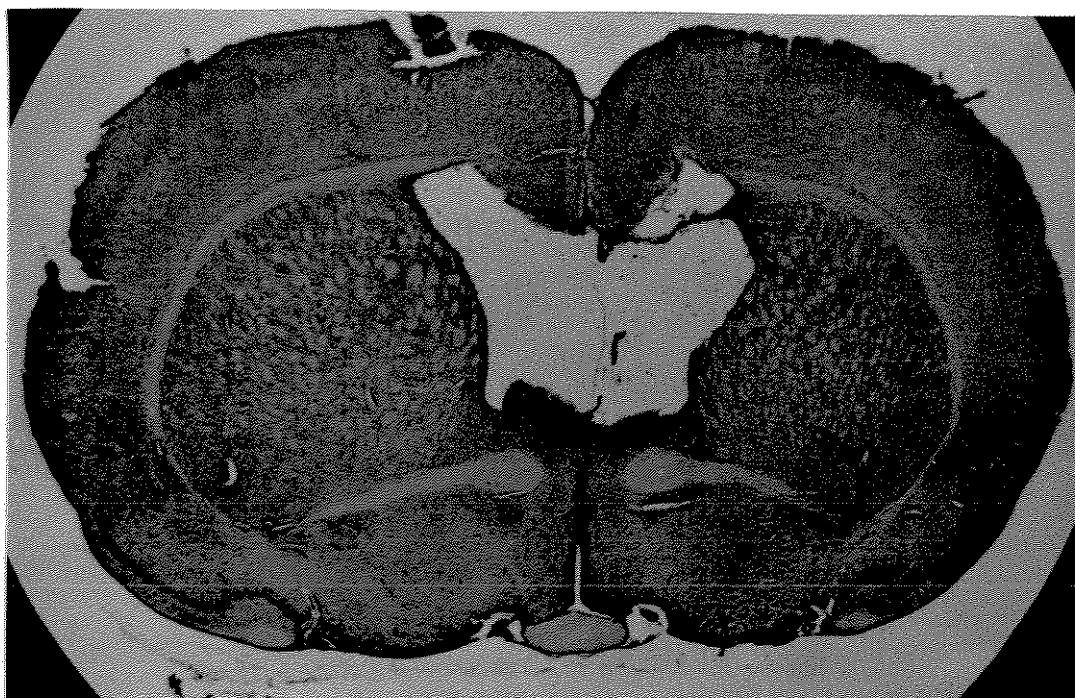


Figura 1.2b- Fotografia de corte histológico do cérebro com lesão na área septal.

IV.2 PESO CORPORAL

O ganho de peso dos animais foi semelhante nos diferentes grupos e dentro da faixa normal da espécie. No dia da cirurgia, a média dos pesos dos animais submetidos à lesão septal foi de 232,0 g (coeficiente de variação = 5%) e a média dos pesos dos animais normais foi de 238,5 g (coeficiente de variação = 4%). No dia do sacrifício dos animais, os grupos com lesão septal e imunizados pesavam em média 378,5 g (coeficiente de variação = 6%), os animais normais imunizados pesavam, em média, 340,7 g (coeficiente de variação = 5%) e os animais com lesão septal, mas não imunizados pesavam 360,8 g (coeficiente de variação = 5%).

IV.3 PESO DAS GLÂNDULAS

IV.3.1 Peso das Adrenais

Os grupos Controle, Lesado Basal e Estressado, no 15º dia após o estresse e a imunização, apresentavam, respectivamente, 19,62 ; 13,86 e 20,60 mg de adrenais por 100 g de peso corporal e os animais lesados-estressados estavam com as adrenais pesando em média 30,40 mg por 100 g .

Apesar do grupo de animais submetidos à aspiração da área septal e mantidos em condições basais apresentar, em média, um decréscimo de 31% no peso das adrenais em relação ao grupo controle, estatisticamente

estes grupos não diferem entre si ao nível de significância de 5% (tabela 1).

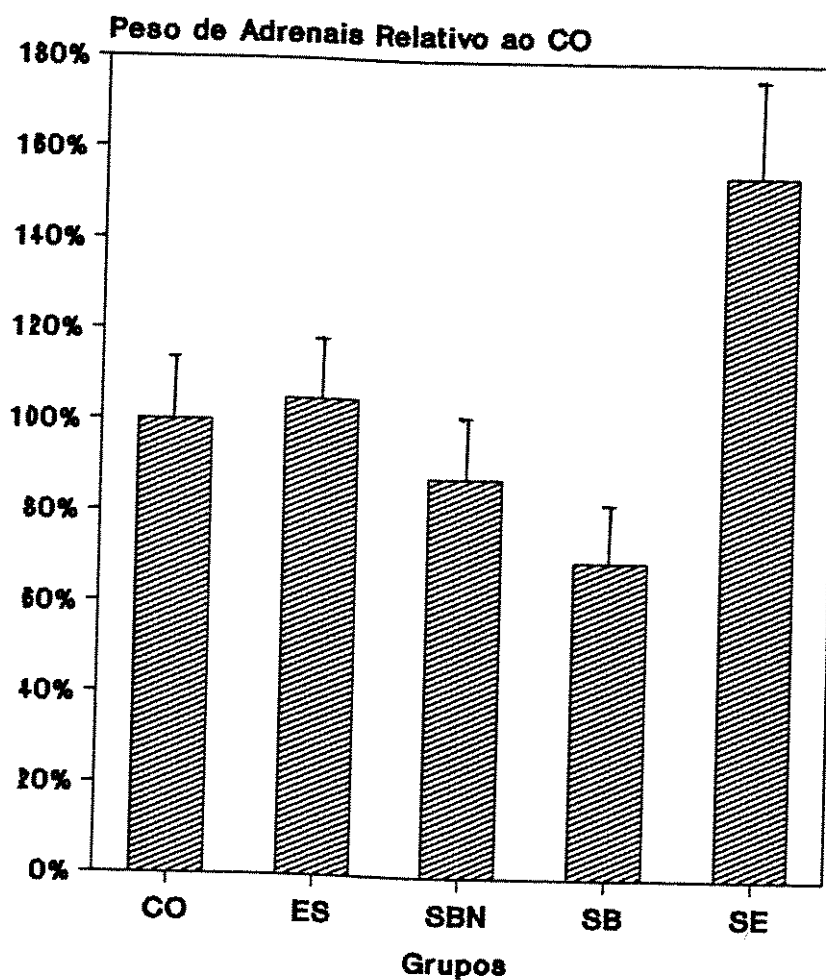
O peso das adrenais nos animais submetidos à lesão septal e estresses tiveram um aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$) em relação ao grupo de ratos sem lesão e mantidos em condições basais. Apenas o grupo Lesado-Estressado apresentou um incremento significativo do peso da ordem de 55% em relação ao grupo controle. Isto demonstra que passados 15 dias da sessão de estresse, os animais com lesão septal, ainda apresentavam uma hipertrofia de suas adrenais, ao contrário dos animais com a área septal íntegra, submetidos ao estresse (fig 3.1).

O grupo de animais submetidos à aspiração da área septal, que não foi imunizado com hemácias de carneiro e não foi submetido ao estresse, não apresentou diferenças significativas nos pesos das adrenais.

As glândulas adrenais dos animais com lesão dos núcleos septais mantidos em condições basais, apesar de não diferirem estatisticamente do grupo controle, demonstraram uma tendência de apresentarem uma discreta atrofia destas glândulas, ao contrário dos animais com lesão dos núcleos septais submetidos ao estresse, os quais apresentaram uma significativa hipertrofia das glândulas adrenais, mesmo passados 15 dias do estresse de contenção.

Figura 3.1-

Peso das Adrenais expressos em porcentagem, dos Grupos de Animais Imunizados: com lesão septal mantidos em condições basais (SB) e submetidos ao estresse (SE), e dos animais normais estressados (ES) em relação ao grupo controle (CO).



IV.3.2 Peso do Timo

O timo apresentou diferenças evidentes para a caracterização da ação da lesão septal e o de estresse na resposta imune primária, à imunização com hemácias de carneiro.

Não houve diferença significativa no peso do timo entre os grupos Controle e Estresse, ou seja, nos animais com lesão simulada e imunizados com hemácias de carneiro. A média de peso das glândulas no grupo Controle foi de 104,71 mg/100 g de Peso Corporal, e do grupo Estressado de 105,33 mg/100g de corpo.

Por outro lado, os animais com área septal aspirada, e imunizados com hemácias de carneiro, tiveram um decréscimo no peso do timo, estatisticamente significativo ($p < 0,05$). O grupo Lesado mantido em condições basais teve os pesos de suas glândulas reduzidos em 48% enquanto os animais lesados submetidos ao estresse, apresentaram uma redução de 76% quando comparados ao controle.

Além disso entre os grupos de animais lesados imunizados, o estresse provocou um decréscimo significativo ($p < 0,05$) no peso do timo, de 54% em relação aos animais septais imunizados mantidos em condições basais (tabela 1).

Contudo o grupo de animais submetidos à aspiração da área septal, que não foram imunizados, não apresentou diferença no peso do timo, quando comparado ao grupo controle (tabela 1).

Estes dados evidenciam que a lesão septal, apenas em animais imunizados, além de reduzir o peso do timo, acentua este decréscimo, quando o animal é submetido ao estresse de contenção (figura 3.2).

IV.3.3 RESUMO

Efeito da Lesão Septal no Peso das Glândulas: Pela apresentação dos resultados acima, podemos concluir que a cirurgia da área septal foi capaz de reduzir acentuadamente o peso do timo somente quando os animais foram imunizados, no caso, com o antígeno timo-dependente hemácia de carneiro.

Efeito do Estresse no Peso das Glândulas: De acordo com os resultados e na condições experimentais deste trabalho, o estresse, exclusivamente, não foi capaz de alterar o peso das glândulas analisadas.

Tanto nas adrenais como no timo a ação do estresse somente foi observado quando associado com a lesão dos núcleos septal.

Figura 3.2-

Peso do Timo expresso em porcentagem, dos Grupos de animais com Lesão Septal Imunizados, mantidos em Condições Basais (SB) e Estressados (SE), do Grupo de Animais com Lesão Septal Não Imunizados e em Condições Basais (SBN) e do Grupo de Animais Normais Estressados e Imunizados (ES), relativos ao Grupo de Animais Controle, Imunizados (CO).

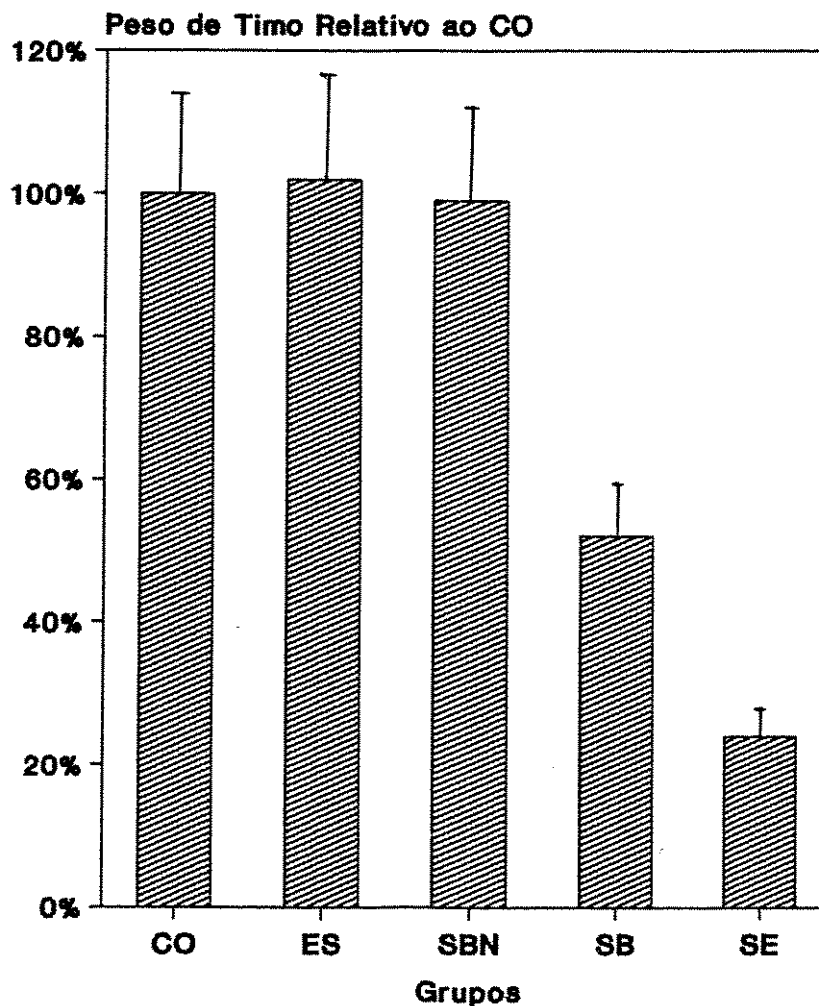


Tabela 1.

Média dos Pesos das Glândulas¹ expressas em mg de tecido por 100g de peso corporal, dos Grupos² de Ratos Imunizados e com Lesão Simulada mantido em Condições Basais (CO) e Estressados (ES) ; Ratos Imunizados com Lesão Septal, mantidos em Condições Basais (SB) e Estressados (SE) ; e Ratos com Lesão Septal mantidos em Condições Basais Não Imunizados (SBN).

GRUPOS		GLÂNDULAS			
		Adrenais		Timo	
		média + EPM	S	média + EPM	S
CO	(10)	19,62 ± 3,21	b	104,71 ± 15,37	a
ES	(10)	20,60 ± 3,79	b	105,33 ± 15,28	a
SB	(15)	13,86 ± 2,80	b	54,86 ± 8,13	b
SBN	(15)	17,26 ± 2,86	b	102,87 ± 14,00	a
SE	(15)	30,40 ± 4,01	a	25,55 ± 4,12	c

1 Médias ± EPM na mesma coluna, seguidas de letras distintas diferem entre si ao nível de significância (S) de 5% (Teste Tukey).

2 O número de repetições de cada grupo encontra-se entre parênteses.

IV.4 RESPOSTA IMUNE PRIMÁRIA

Como descrito anteriormente a resposta imune primária foi analisada pelas dosagens de Imunoglobulinas Totais (Ig T) e Imunoglobulinas G (Ig G), circulantes .

Para se ter uma idéia melhor das imunoglobulinas presentes nos soros dos diferentes grupos de animais, foi analisada as variações, ao longo dos 15 dias pós imunização, da diferença entre as Ig T e as Ig G, as quais são denominadas de Ig (T-G).

Os valores relativos às imunoglobulinas, nos gráficos, estão expressos em Título de imunoglobulinas relativo à diluição do soro aglutinado, e nas tabelas, estão expressos em Log_2 Título, que correspondem aos valores usados na análise estatística dos dados.

IV.4.1 IMUNOGLOBULINAS TOTAIS SÉRICAS

O gráfico da figura 4.1 mostra a variação dos níveis séricos de imunoglobulinas totais ao longo dos 15 dias pós-imunização nos diferentes grupos experimentais.

No 3º dia após a imunização, apesar da pequena concentração de imunoglobulinas circulantes, foi observado que os animais com lesão da área septal, estressados ou não, apresentaram um decréscimo de 89% na quantidade de Ig Total, em relação aos grupos de animais com

o cérebro íntegro (tabela 2). Neste dia, os animais com lesão septal diferiram estatisticamente dos animais normais ao nível de significância de 5%.

No 6º dia, apesar dos grupos de animais com lesão septal apresentarem, em média, um decréscimo de 46% na concentração de imunoglobulinas séricas em relação ao grupo controle, não houve diferenças significativas entre os vários grupos experimentais.

No 9º dia, entretanto, os animais com lesão septal apresentaram um decréscimo de 63%, em média, no título de imunoglobulinas totais, em relação aos animais normais (tabela 2). Neste dia, os níveis de imunoglobulinas nos animais septais, independentemente do estresse, diferem significativamente dos níveis circulantes de imunoglobulinas dos animais normais (tabela 2).

Porém no 12º dia, enquanto no grupo de animais controle e nos grupos de animais septais, o título de imunoglobulinas totais diminuiu, nos animais normais submetidos ao estresse permaneceu elevado. A quantidade de Ig Total, nos animais normais estressados teve, neste dia, um acréscimo de 38% acima dos níveis encontrados nos animais do grupo controle, e um acréscimo de 67%, em relação aos animais septais submetidos ao estresse (tabela 2). Portanto, no 12º dia pós-imunização, os animais normais submetidos ao estresse apresentaram um título de imunoglobulinas totais significativamente maior que os animais estressados que foram submetidos à aspiração da área septal. A análise da

cinética das imunoglobulinas totais descrita , revela que, na realidade, o grupo de animais normais quando estressados, mantiveram altas as concentrações de Ig Total do 6º ao 12º dia, enquanto nos outros grupos as concentrações de Ig Total tiveram um decréscimo acentuado, neste período.

A cabo do 15º dia, devido a uma queda nos níveis de imunoglobulinas dos animais normais estressados, a diferença entre os vários grupos diminuiu, não havendo distinção estatisticamente significativa entre os diferentes grupos experimentais (tabela 2).

Cinética das Concentrações Séricas de Ig Total

De um modo geral para os grupos de animais com lesão septal, as curvas da cinética de Ig Total, tiveram um mesmo comportamento.

Nos animais septais, do dia da imunização ao 3º dia após a mesma, não ocorreu nenhum aumento dos níveis de Ig Total, permanecendo iguais aos níveis basais.

No 6º dia, o aumento súbito da quantidade sérica de imunoglobulinas , atingindo os mais altos valores da curva, caracterizou o pico de Ig Total em todos os grupos (figura 4.1)

No 9º, 12º e 15º dia houve, nos grupos de animais controle e septais, um decréscimo periódico dos níveis de Ig Total mas que não diferem estatisticamente

entre si. Contudo, estes dias são diferentes ao nível de significância de 5%, do 3º e 6º dias, que por sua vez diferem entre si ao mesmo nível de significância (tabela 2).

De modo diferente dos demais grupos, o grupo de animais normais estressados, nos dias 6, 9 e 12 pós-imunização, apresentaram níveis estatisticamente iguais de imunoglobulinas (tabela 2). Estes valores, entretanto, são diferentes dos observados nos dias 3 e 15 pós-imunização, que também diferem entre si ao nível de significância de 5% (tabela 2).

Resumo

O perfil das Imunoglobulinas Totais aponta para uma menor velocidade de resposta dos animais com lesão septal ao 3º dia e uma perda de estímulo mais rápido que os Grupos controle a partir do 6º dia.

O Estresse nos animais normais, induziu um aumento de Imunoglobulinas Totais do 6º ao 12º dia, enquanto nos outros grupos esta imunoglobulinas tiveram um decréscimo, no mesmo período.

Figura 4.1-

Dinâmica das Imunoglobulinas Totais Séricas, expressas em Título, ao longo dos 15 dias que sucederam à imunização dos Grupos de Animais Com Lesão Septal mantidos em Condições Basais (SB), e Estressados (SE), do Grupo de Animais Normais Estressados (SE) e do Grupo Controle (CO).

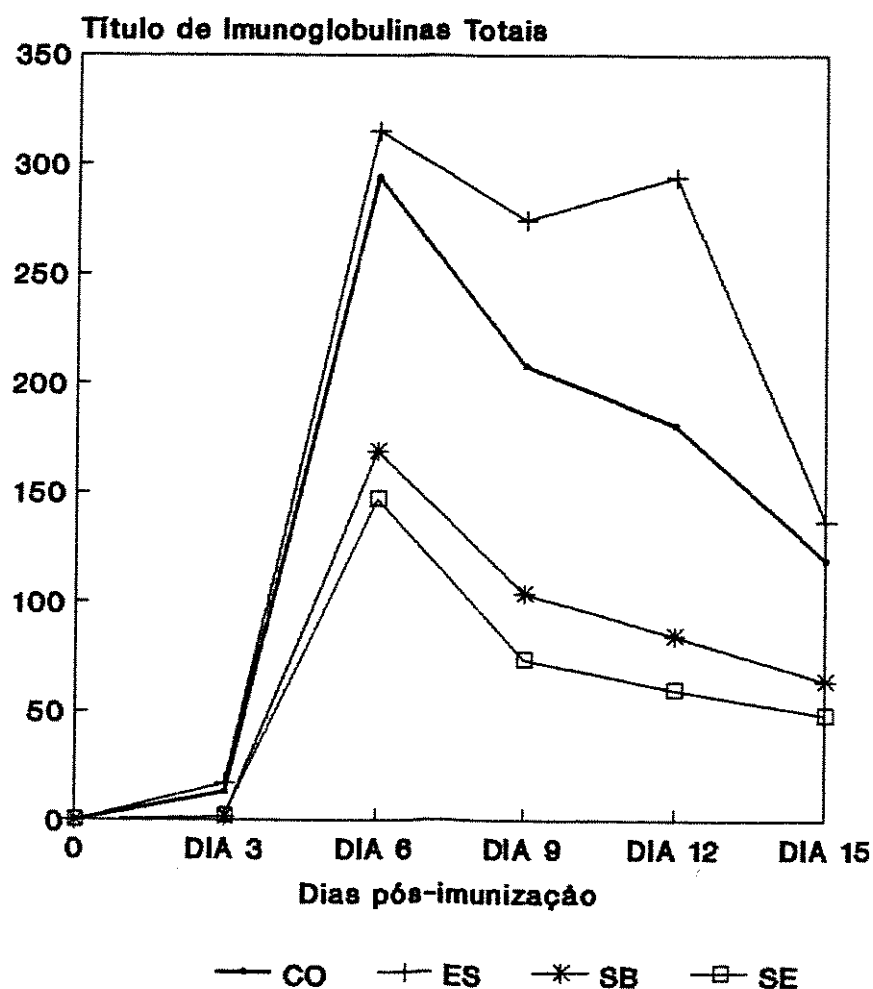


Tabela 2

Médias¹ dos Log₂ dos títulos de imunoglobulinas totais encontrados no soro dos animais imunizados dos grupos² controle (CO), de ratos normais estressados (ES), ratos com lesão septal mantidos em condições basais (SB) e ratos com lesão septal estressados (SE), nos dias 3, 6, 9, 12 e 15 após a imunização.

DIAS	GRUPOS			
	CO (10)	ES (10)	SB (15)	SE (15)
3	3,7 ± 0,6 cA	4,1 ± 0,5 cA	0,7 ± 0,6 cB	0,8 ± 0,7 cB
6	8,2 ± 0,4 aA	8,3 ± 0,4 aA	7,4 ± 0,9 aA	7,2 ± 0,7 aA
9	7,7 ± 0,4abA	8,1 ± 0,3 aA	6,7 ± 0,7abB	6,2 ± 1,1abB
12	7,5 ± 0,5 bAB	8,2 ± 0,4 aA	6,4 ± 0,5 bAB	5,9 ± 0,6 bB
15	6,9 ± 0,7 bA	7,1 ± 0,4 bA	6,0 ± 0,8 bA	5,6 ± 0,8 bA

1. Médias ± EPM, seguidas de letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5% (Teste Tukey). Letras minúsculas comparam as colunas e maiúsculas as linhas.

2. Entre parênteses estão as repetições de cada grupo.

IV.4.2 IMUNOGLOBULINAS G SÉRICAS

As imunoglobulinas G foram dosadas nos mesmos dias que as Ig Totais, conforme descrito no item III.7.

É conveniente notar que apesar de serem dosadas separadamente as Ig G são uma parcela das Ig Totais. Em média as imunoglobulinas G correspondem a 60% das imunoglobulinas totais.

As variações dos títulos de imunoglobulina G ao longo dos 15 dias que se seguiram à imunização, nos diferentes grupos, estão apresentadas na figura 4.2

A resposta de Ig G à inoculação de hemácias de carneiro, somente foi observada a partir do 6º dia, quando ocorreu um aumento dos níveis desta imunoglobulina. Neste dia, os animais com lesão simulada tiveram em seus níveis de Ig G um aumento de 74%, em média, quando comparados aos animais com lesão na área septal (tabela 3).

No 9º dia, o decréscimo nos títulos de imunoglobulinas G dos animais septais aumentou para 77% em relação aos animais com o cérebro íntegro, e no 12º dia observou-se um decréscimo de 72% dos animais septais em relação aos animais com lesão simulada (figura 4.2).

Tanto no 6º dia, como no 9º e 12º dias, observou-se uma diferença estatisticamente significativa nos níveis de imunoglobulinas G dos animais com lesão dos núcleos septais em relação aos animais normais, independentemente do estresse (tabela 3).

A exemplo do observado com relação aos níveis de imunoglobulinas totais, no 15º dia não foi encontrada nenhuma diferença significativa nos níveis de imunoglobulinas G dos diferentes grupos experimentais, apesar dos grupos de animais septais apresentarem um decréscimo de 60%, em média, nos títulos de Ig G em relação aos seus controles (tabela 3).

Cinética das Concentrações Séricas de IgG

As curvas da cinética de Ig G dos grupos com área septal íntegra tiveram padrões distintos das curvas dos grupos com lesão na área septal (figura 4.2).

OS grupos, indistintamente, no 3º dia após a imunização, não apresentaram nenhuma quantidade de Ig G, que somente teve seus níveis elevados a partir do 6º dia.

Os animais com lesão simulada da área septal, tiveram os maiores níveis de Ig G no 9º dia, onde observou-se um aumento de 40%, em média, com relação ao 6º dia, ao passo que os animais septais tiveram, no mesmo período, um aumento de apenas 20%, em média, no título de Ig G (figura 4.2)

O decréscimo nos títulos de imunoglobulinas G observado nos dia 12 e 15 pós-imunização, dos grupos de animais com lesão simulada, caracteriza, estatisticamente o pico de Ig G no 9º dia após a imunização.

Com relação às curvas dos animais com lesão

na área septal, não foram observadas alterações significativas ao longo dos 15 dias que seguiram à imunização. Nos animais submetidos à aspiração da área septal, a variação das concentrações de imunoglobulinas G apresentaram um padrão linear ao longo dos 15 dias, sem o pico de resposta de IgG no 9º dia, observado nos animais com área septal íntegra (tabela 3).

Resumo

Com exceção do 15º dia, os animais com lesão septal apresentaram níveis de imunoglobulina G séricas significativamente menores que os animais que foram submetidos a lesão simulada.

Como pode ser concluído pelos dados descritos acima, o estresse de contenção por 12 horas, nestas condições experimentais, não influenciou nos níveis de imunoglobulinas G, em nenhum dos grupos estudados e nos dias em que foi observada a resposta imune primária.

Figura 4.2-

Dinâmica das Imunoglobulinas G, expressas em Título, ao longo dos 15 dias que sucederam à imunização do Grupos de Animais com Lesão Septal mantidos em Condições Basais (SB) e Estressados (SE), do Grupo de Animais Normais Estressados (ES) e do Grupo de Animais Controle (CO).

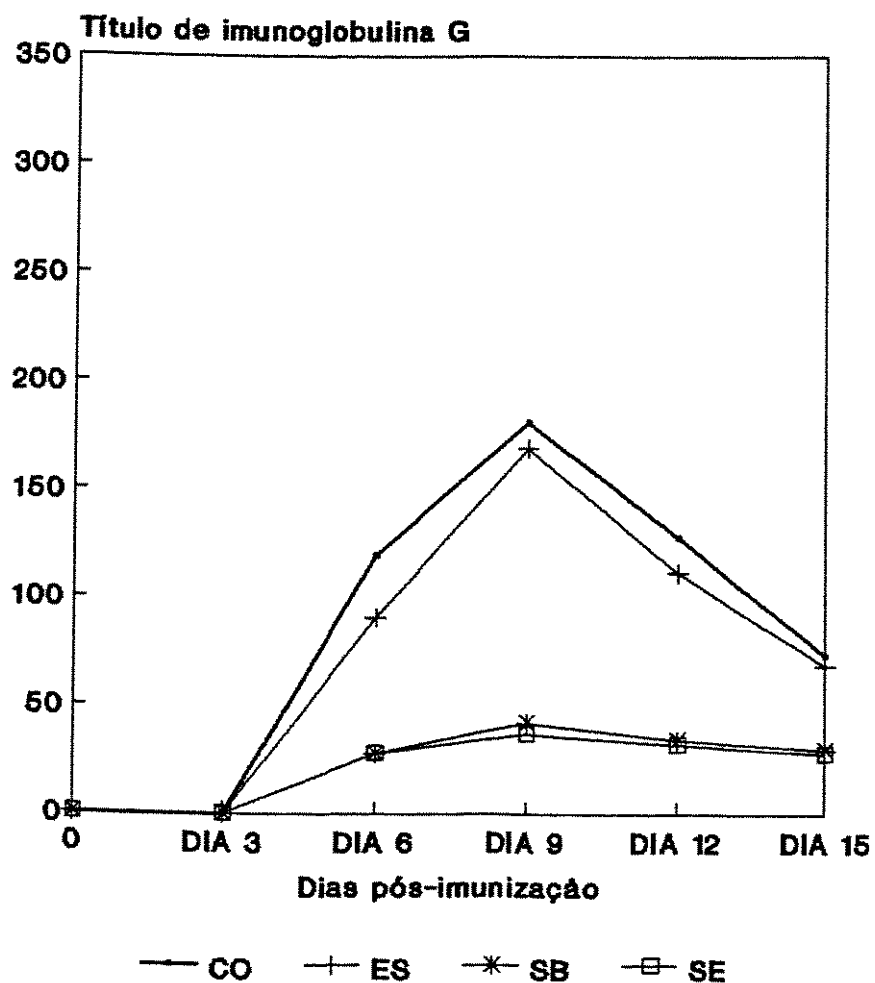


Tabela 3-

Média¹ dos Log₂ dos títulos de imunoglobulinas G encontradas no soros dos animais imunizados dos grupos² controle (CO), de ratos normais estressados (ES), ratos com lesão septal mantidos em condições basais (SB) e ratos com lesão septal estressados (SE), nos dias 3, 6, 9, 12 e 15 após a imunização.

DIAS	GRUPOS			
	CO (10)	ES (10)	SB (15)	SE (15)
3	0,0 ± 0,0 dA	0,0 ± 0,0 dA	0,0 ± 0,0 bA	0,0 ± 0,0 bA
6	6,9 ± 0,5 bA	6,5 ± 0,7 bA	4,8 ± 0,6 aB	4,8 ± 0,5 aB
9	7,5 ± 0,5 aA	7,4 ± 0,5 aA	5,4 ± 0,8 aB	5,2 ± 0,7 aB
12	7,0 ± 0,6 bA	6,8 ± 0,7 bA	5,1 ± 0,7 aB	5,0 ± 0,6 aB
15	6,2 ± 0,7 cA	6,1 ± 0,9 cA	4,9 ± 0,5 aA	4,8 ± 0,6 aA

1. Médias ± EPM, seguidas de letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5% (Teste Tukey). Letras minúsculas comparam as colunas e maiúsculas as linhas.

2. Entre parênteses estão as repetições de cada grupo.

IV.4.3 IMUNOGLOBULINAS (T-G) SÉRICAS

Como descrito anteriormente e com o objetivo de ampliar o estudo sobre imunoglobulinas, foi analisada, também, a diferença entre as Imunoglobulinas Totais e Imunoglobulinas G. Deste modo os dados de Ig(T-G), apesar de extraídos matematicamente, estão relacionados à presença de imunoglobulinas 2 mercapto-etanol-sensíveis (2ME-) as quais são em maior porcentagem Imunoglobulinas M (Ig M).

O gráfico da figura 4.3 mostra as variações das diferenças entre os títulos de Ig totais e Ig G, ao longo dos 15 dias que sucederam à imunização.

Pelo fato de não haver imunoglobulinas G no 3º dia, os níveis de imunoglobulinas (T-G) eram exatamente iguais aos níveis de Ig totais. Deste modo, o incremento de imunoglobulinas totais nos animais normais em relação aos animais septais, observado neste dia (tabela 2), se deve às imunoglobulinas 2ME-sensíveis (tabela 4).

No 6º e 9º dias, os diferentes grupos de animais analisados não apresentaram diferenças significativas nos níveis de imunoglobulinas (T-G). Conclui-se, portanto, que o decréscimo de 63%, em média, nos níveis de Ig Total dos grupos de animais septais em relação aos seus controles, observado no 9º dia, é devido à diminuição do título de imunoglobulinas G dos animais septais, no mesmo período.

No 12º dia após a imunização, os dados

mostraram que o grupo com a área septal íntegra, porém estressado (ES) teve um incremento no nível de Ig (T-G) de 72% em relação ao grupo controle, mas do ponto de vista estatístico, esta diferença não é significativa ao nível de 5% (tabela 4). Por outro lado, os animais estressados mas com os núcleos septais lesados apresentaram um decréscimo de 85% no título de Ig (T-G) quando comparados com os animais estressados e com o cérebro íntegro (tabela 4). Este dado, estatisticamente significativo, exclui a possibilidade do aumento do nível de Ig totais do grupo de animais normais estressados, observado no 12º dia, ser devido às imunoglobulinas G.

Finalmente no 15º dia, de maneira semelhante à descrita para as imunoglobulinas G e Totais, não houve diferenças significativas nos níveis de Ig (T-G) entre os diferentes grupos experimentais analisados (tabela 4)

Cinética dos Níveis Séricos de Ig(T-G)

Do dia da imunização ao 3º dia, observamos que o aumento das Ig(T-G) foi pequeno, comparado com os outros dias, em todos os grupos, especialmente nos animais com lesão septal, os quais praticamente não tiveram variações nos níveis de imunoglobulinas, neste período.

Do 3º ao 6º dia, a comparação dos coeficientes angulares ($\text{tg } \alpha$) das retas de elevação dos níveis de Ig(T-G) dos vários grupos (figura 4.3), mostra que neste período, a velocidade com que Ig(T-G) aparece na

circulação foi 12 vezes maior que no período anterior, nos animais com área septal íntegra e 80 vezes maior nos animais com lesão da área septal. Estes resultados são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) pelo Teste Estatístico ANOVA aplicado entre as médias das diferenças entre os níveis de Ig (T-G) dos dias 3 e 6 dos grupos de animais normais e dos grupos de animais septais.

O decréscimo verificado a partir do 6º dia, caracteriza o pico da presença de Ig(T-G) sérica, neste dia, para todos os grupos analisados (figura 4.3).

Com exceção do grupo de animais normais submetidos ao estresse, que apresentou valores de títulos de Ig (T-G) estatisticamente semelhantes do dia 6 ao dia 12 pós-imunização, os demais grupos apresentaram um título máximo de imunoglobulinas 2ME-sensíveis (Ig T-G) no 6º dia e valores estatisticamente semelhantes do dia 9 ao dia 15 pós-imunização (tabela 4).

Resumo

A análise da diferença entre as Imunoglobulinas totais e as Imunoglobulinas G, demonstrou que o decréscimo de Ig Total nos animais com lesão septal, em relação os animais normais, é na maior parte das vezes, devido as diferenças observadas nos níveis de Ig G, entre estes grupos. Contudo, no 3º dia, onde não foi encontrado nenhuma resposta de Ig G à inoculação de hemácias de carneiros, os níveis de Ig 2ME-sensíveis estavam

significativamente inferiores nos animais septais.

No período entre a imunização e o 3º dia após a imunização, a velocidade com que as Ig 2ME-sensíveis aparecem na circulação é 10 vezes maior nos animais com cérebro íntegro que nos animais com lesão septal. Contudo, entre o dia 3 e o dia 6, a velocidade com que as Ig 2ME-sensíveis aparecem na circulação é a mesma nos animais com lesão septal e nos animais com o cérebro íntegro, recuperando, a diferença de concentração desta imunoglobulina, observada no 3º dia após a imunização.

Apesar dos níveis totais de imunoglobulinas, no 3º dia, representarem apenas 15% da média dos níveis de imunoglobulinas 2ME-sensíveis ao longo da resposta imune analisada, as alterações verificadas neste período, indicam que a lesão dos núcleos septais altera, de alguma forma, a dinâmica destas imunoglobulinas.

Além disso, a lesão septal e o estresse, quando associados refletiu, no 12º dia, em uma diminuição significativa dos níveis de imunoglobulinas 2ME-sensíveis. Ao contrário, animais normais estressados mantiveram altos os níveis destas imunoglobulinas do 6º ao 12º dia..

Figura 4.3-

Dinâmica das Imunoglobulinas (Total-G), expressas em Título, ao longo dos 15 dias que sucederam à imunização dos Grupos de Animais com Lesão Septal mantidos em Condições Basais (SB) e Estressados (SE), do Grupo de Animais Normais Estressados (ES) e do Grupo Controle (CO).

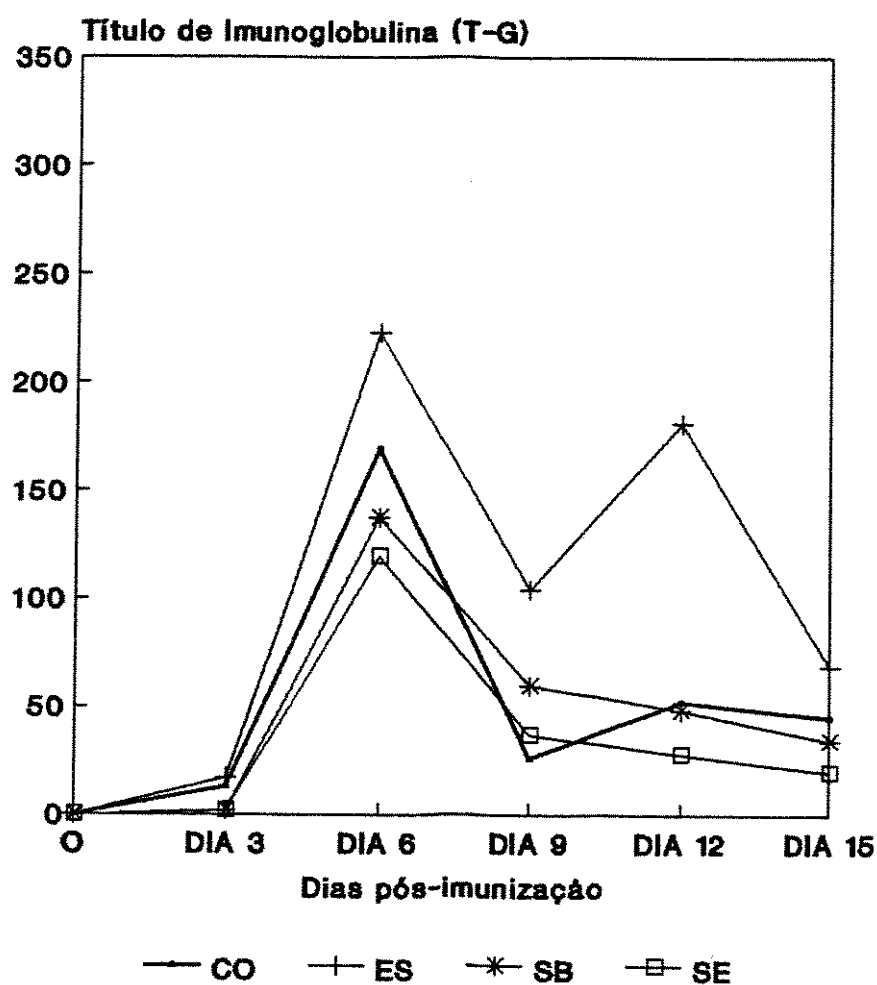


Tabela 4-

Média¹ dos Log₂ dos títulos de imunoglobulinas (T-G) no soro dos animais imunizados dos grupos² controle (CO), de ratos normais estressados (ES), ratos com lesão septal mantidos em condições basais (SB) e ratos com lesão septal estressados (SE), nos dias 3, 6, 9, 12 e 15 após a imunização.

DIAS	GRUPOS			
	CO (10)	ES (10)	SB (15)	SE (15)
3	3,7 ± 0,6 cA	4,1 ± 0,5 cA	0,7 ± 0,6 cB	0,8 ± 0,7 cB
6	7,4 ± 0,6 aA	7,8 ± 0,7 aA	7,1 ± 0,7 aA	6,9 ± 0,6 aA
9	4,7 ± 0,5 bA	6,7 ± 0,4 aA	5,9 ± 0,6 bA	5,2 ± 0,7 bA
12	5,7 ± 0,6 bAB	7,5 ± 0,7 aA	5,6 ± 0,6 bAB	4,8 ± 0,7 bB
15	5,5 ± 0,8 bA	6,1 ± 1,2 bA	5,1 ± 0,9 bA	4,3 ± 0,8 bA

3. Médias ± EPM, seguidas de letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5% (Teste Tukey). Letras minúsculas comparam as colunas e maiúsculas as linhas.

2. Entre parênteses estão as repetições de cada grupo.

IV.5 CORTICOSTERONA SÉRICA

IV.5.1 Níveis Basais de Corticosterona

Os resultados mostram que não houve diferenças significativas ($p < 0,05$) nos níveis basais da corticosterona entre os animais com lesão septal e os animais submetidos à lesão simulada. As coletas de sangue foram realizadas 1 semana antes da imunização. Os animais com área septal íntegra, tiveram em média um nível basal de corticosterona de 207 ng de hormônio por ml de soro e os animais com área septal aspirada, 166 ng/ml, 20% inferior aos níveis basais dos animais normais (tabela 5).

IV.5.2 Níveis de Corticosterona no Estresse (Imunização)

Imediatamente após retirar-se os animais dos tubos de contenção, foram coletadas amostras de sangue para as dosagens de corticosterona e em seguida os animais foram imunizados, conforme descrito no item III.10.

Os animais com área septal aspirada e estressados, quando foram imunizados estavam com níveis de corticosterona 3,5 vezes mais alto que o grupo controle e os animais normais estressados, com os níveis de corticosterona 2,5 vezes mais alto que os animais normais não estressados.

Nos animais normais o estresse provocou um incremento de 158% no nível de corticosterona em relação ao

nível basal do grupo e nos animais com lesão septal o incremento foi de 337% em relação ao seu basal.

O estresse de contenção por 12 horas, elevou os níveis de corticosterona nos animais lesados 135% a mais que nos animais normais. Deste modo, estatisticamente, as concentrações de corticosterona nos animais com lesão septal diferem, no estresse, dos animais com área septal íntegra, que por sua vez são significativamente superiores que os animais controle (tabela 5).

IV.5.3 Cinética da Corticosterona ao longo da Resposta Imune

Como mostra o gráfico da figura 5.1, no 3º dia após a imunização, o Grupo de animais normais mantidos em condições basais teve um aumento de 20% nos níveis séricos de corticosterona em relação ao seu pré-imunização (tabela 5). Nos animais normais estressados, no dia 3 após o estresse, o decréscimo de 31% nos níveis deste hormônio fez com que não houvesse mais diferença significativa entre os animais com área septal íntegra.

Por outro lado, os animais com lesão septal não estressados, apresentaram, no 3º dia após a imunização, um incremento de 56% em relação aos níveis de corticosterona dos animais normais não estressados.

Os animais com lesão septal submetidos ao estresse, neste dia, permaneciam com seus níveis de

corticosterona significativamente acima dos animais com área septal íntegra e também submetidos ao estresse, apesar de observarmos uma redução de 37% nos níveis deste hormônio em relação ao dia no qual os animais foram imunizados (figura 5.3).

No 3º dia após a imunização, estatisticamente, os dois grupos de animais com lesão septal não diferiram entre si, porém a Análise Fatorial dos dados mostrou que os níveis de corticosterona dos animais lesados eram superiores aos animais normais estressados, que por sua vez, possuíam níveis de corticosterona iguais aos controles (tabela 5).

Demonstrando que esta elevação da corticosterona, nos animais com lesão septal, estava relacionada com a imunização, o grupo de animais com lesão septal, mantidos em condições basais, mas que não foram imunizados, apresentaram, no 3º dia, níveis de corticosterona 244% inferiores aos níveis dos animais septais imunizados.

Pelo fato da Análise Fatorial dos dados ser um teste que compara a média das concentrações de corticosterona de todos os grupos para cada dia, a diferença estatística apenas entre o grupo de animais com lesão simulada e imunizados e o grupo de animais com lesão septal não imunizados não pode ser comprovada (tabela 5). Porém a Análise da Variância (ANOVA) entre estes dois grupos, mostrou que a elevação de 40% no 3º dia e 45% no 12º dia,

nos níveis de corticosterona dos animais normais não estressados mas imunizados, com relação aos animais septais não imunizados, são significativas ao nível de 5%.

O mesmo teste estatístico (ANOVA) mostra que as concentrações deste hormônio, no Grupo de animais normais não estressados mas imunizados, nos 3º e 12º dias são significativamente mais altos que os valores pré-imunização.

No 6º dia, os níveis séricos de corticosterona, tanto nos animais septais estressados, quanto nos animais septais mantidos em condições basais, sofreram um decréscimo de 48% em relação ao 3º dia, aproximando dos nível de corticosterona dos grupos de animais com lesão simulada. Por conta destes dados, não houve, neste dia, diferenças significativas na concentrações de corticosterona entre os grupos de ratos.

No 9º dia após a imunização, também não encontrou-se diferenças significativas nos níveis de corticosterona entre os diferentes grupos experimentais, como mostra a tabela 5.

No 12º dia, porém, os animais com área septal aspirada, submetidos ou não ao estresse, apresentaram, em média, um incremento de 52% , com relação ao grupo Controle.

A exemplo do 3º dia, o 12º dia foi caracterizado por um pico nos níveis de corticosterona dos animais com lesão septal. Também neste dia, os animais com lesão da área septal que não foram imunizados, não apresentaram nenhuma variação nos níveis de corticosterona.

Pela Análise Fatorial dos dados, estatisticamente foi encontrada uma diferença significativa entre os animais com lesão septal não imunizados e os animais do grupo controle, os quais apresentavam um incremento de 71% em relação aos animais não imunizados.

No 15º dia após a imunização, um decréscimo de 76%, em média, nos níveis de corticosterona dos grupos com lesão septal, fez com que não houvesse mais diferenças significativas entre os vários grupos analisados, inclusive entre os animais septais não imunizados (tabela 5).

Resumo

A análise dos dados obtidos neste experimento, permite concluir que o estresse de contenção por 12 horas induz um aumento nos níveis de corticosterona dos animais normais e um aumento significativamente maior nos animais com área septal aspirada.

Nos animais com área septal íntegra porém estressados, no 3º dia após a imunização já apresentavam valores de corticosterona estatisticamente iguais aos controles.

Os animais com lesão septal, a despeito do estresse de contenção, apresentaram 2 picos de corticosterona ao longo dos 15 dias que sucederam a imunização.

O gráfico da figura 5.1 mostra, confirmado

pelos testes estatísticos, que a imunização induziu aumentos significativos de corticosterona no 3º e 12º dias, quando comparados a valores pré-imunização, nos animais normais mantidos em condições basais.

Os animais com lesão dos núcleos septais, mantidos em condições basais e que não foram imunizados, não apresentaram flutuações nos níveis de corticosterona, analisados nos mesmos dias nos quais foram observados elevações dos níveis de corticosterona em animais imunizados. As diferenças estatisticamente significativas, entre os níveis de corticosterona dos animais septais imunizados com hemácias de carneiro e os animais septais pseudo-imunizados com salina, demonstra que as elevações pós-imunização dos níveis de corticosterona sérica está relacionada com a presença do antígeno hemácia de carneiro.

Neste sentido, os resultados obtidos mostram que há uma correlação entre a imunização, pico de resposta imune e secreção de corticosterona, maior nos animais com lesão dos núcleos septais, apesar de não ter sido demonstrado relações cronológicas entre estes eventos.

Figura 5.1-

Dinâmica da Corticosterona sérica, expressas em ng/ml de soro, avaliada antes do estresse (0), no dia da imunização (IMUN.) e ao longo dos 15 dias que sucederam a imunização dos grupo de animais septais mantidos em condições basais (SB) e estressados (SE), do grupo de animais normais estressados (ES) e do grupo controle (CO), além do grupo de animais septais não imunizados (SBN).

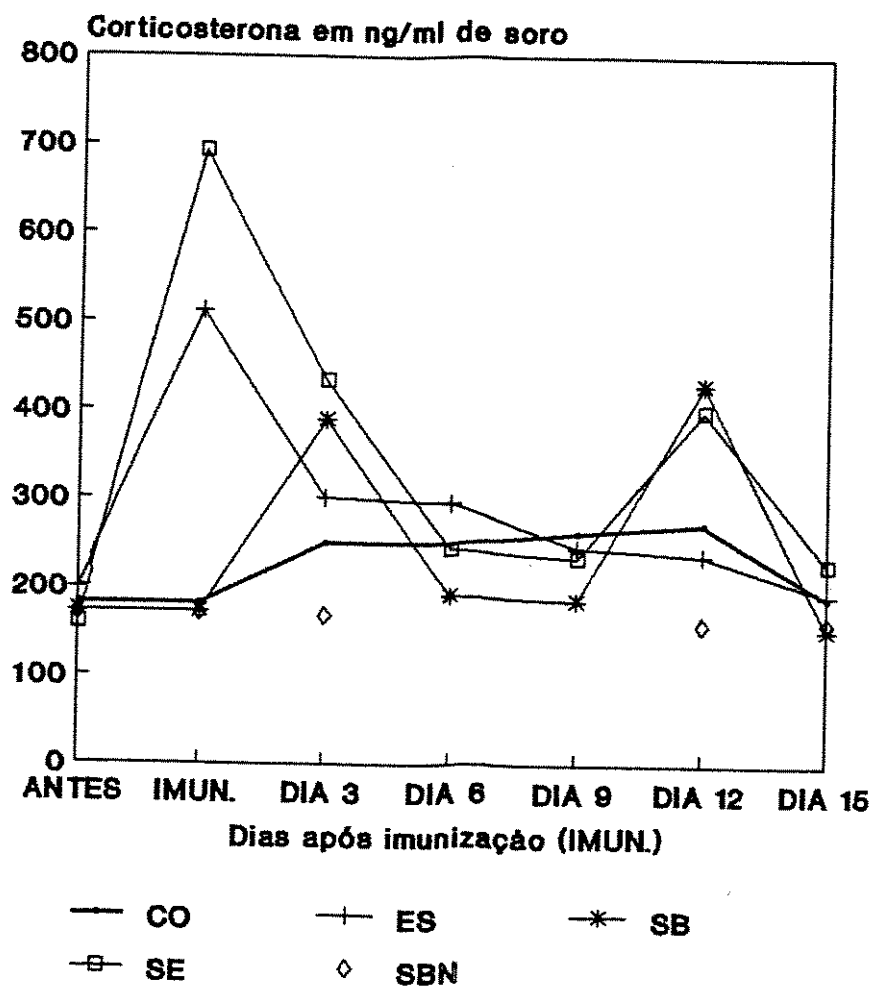


Tabela 5-

Médias¹ das Concentrações de Corticosterona Séricas Expressas em ng/ml nos Dias 3, 6, 9, 12 e 15 pós-imunização nos Grupos de animais normais imunizados (CO), animais normais estressados e imunizados (ES), nos Grupos com Lesão Septal imunizados (SB), com Lesão Septal não imunizados (SB_N) e no Grupo de animais com Lesão Septal, Estressados e Imunizados (SE)

GR.	BASAL	ESTR.	DIAS POS-IMUNIZAÇÃO				
			DIA 3	DIA 6	DIA 9	DIA12	DIA15
CO	180,8aA	*****	250,0bA	249,5aA	261,3aA	271,5bA	189,1aA
ES	198,8aB	511,7bA	300,7bB	295,3aB	245,0aB	236,9bB	191,9aB
SB	172,0aB	*****	389,2aA	190,6aB	185,2aB	429,0aA	152,6aB
SE	158,4aC	692,0aA	433,2aB	243,2aC	233,4aC	399,2aB	226,4aC
SB _N	170,3aA	*****	168,0bA	*****	*****	158,6cA	160,0aA

1. Média seguida de letras distintas diferem entre si ao nível de significância de 5% (Tukey). Letras minúsculas comparam as colunas e maiúsculas as linhas.

IV. DISCUSSÃO

A Lesão Septal e os Níveis de Corticosterona

Parece não restar dúvidas que o estresse eleva os níveis de corticosterona nos animais normais (NATELSON et alii, 1988 e PITMAN, OTTENWELLER e NATELSON, 1988), porém, as informações da literatura a respeito dos reflexos neuroendócrinos nos animais com lesão septal, sugerem que durante o estresse, a falta desta estrutura límbica provoca uma resposta exagerada do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, refletindo em um aumento anormal dos níveis séricos de corticosterona, como demonstrado por ENDRÖCZI e NYAKAS (1971), WILSON e CRITCHLOW (1974), SEGGIE e BROWN (1973) e SEGGIE et alii (1974).

Como demonstrado na figura 5.1, os dados deste experimento demonstram claramente, que os animais com lesão da área septal apresentaram uma hiper-reação do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal diante do estresse de contenção por 12 horas, quando comparados com os animais normais submetidos às mesmas condições de estresse.

Alguns trabalhos, como o de MOBERG et alii (1971) e SEGGIE e BROWN (1971), sugeriram, a princípio, que lesões da área septal pudessem elevar os valores basais de corticosterona, alterando o ritmo circadiano deste hormônio. Em condições ambientais normais, UHLIR, SEGGIE e BROWN

(1974) , SEGGIE et alii (1974b) e SEGGIE, UHLIR e BROWN (1974) observaram que lesões da área septal provocavam um aumento dos valores séricos de corticosterona analisados até 5 dias após a lesão. Os dados destes autores, obtidos nos primeiros dias após a lesão, provavelmente, se deve ao fato de um ambiente considerado bom para manter animais com o cérebro íntegro em condições basais, pode ser estressantes para animais com lesão septal. Estímulos ambientais normais são frequentemente percebidos pelos animais septais como estímulos estressores.

Neste sentido, acredita-se que além de um rígido controle ambiental, o fato dos animais com lesão septal terem permanecido no biotério durante 30 dias sendo constantemente manipulados e tratados pelo bioterista, influenciou nos níveis séricos basais da corticosterona dos animais septais, que praticamente, não diferiram dos animais com o cérebro íntegro (tabela 5). Provavelmente os ratos utilizados neste experimento foram habituados aos estímulos ambientais que nos primeiros dias lhes eram estressantes.

Dados semelhantes foram encontrados por, ENDRÖCZI e NYAKAS (1971), SEGGIE et alii (1974b), e WILSON e CRITCHLOW (1974), os quais observaram que animais que permaneciam em ambientes rigorosamente controlados, não apresentavam alterações nos níveis basais de corticosterona, mesmo nas primeiras horas após a lesão.

O fato da hiper-reatividade do eixo Hipotálamo-

hipófise-Adrenal (H.H.A.) dos animais com lesão septal, ser atenuada com a habituação destes animais aos estímulos ambientais (ALBERT e BRAYLEY, 1979 e POPLAWSKY e ROBBIM, 1989), provavelmente colaborou para que os níveis basais de corticosterona dos animais septais não diferissem dos animais normais.

Contudo experiências pré- ou pós-operatórias dos animais com lesão septal, podem atenuar a hiperreatividade relativa apenas aos estímulos aos quais os animais foram habituados (HAMMOND e THOMAS, 1971 ; GOTSICK e MARSHALL, 1972 e ALBERT e CHEW, 1980), deste modo, o estresse de contenção por 12 horas, demonstrou-se, nestas condições experimentais, ser eficiente para induzir uma hiperreação do eixo H.H.A. dos ratos septais,

Durante a coleta de sangue, os animais foram retirados do biotério, colocados em uma caixa durante 30 segundos, cuja temperatura ficava em torno de 38°C e submetidos a um corte transversal na cauda. ENDRÖCZI et alii (1971) ; ALBERT e CHEW (1980) e DONOVICK et alii (1981), demonstraram em seus experimentos que tanto o calor como novos ambientes induziam uma resposta adreno-cortical, nos animais septais, maior que os animais com o cérebro íntegro.

De acordo com os dados deste experimento (tabela 5), os estímulos estressores da coleta de sangue, não foram suficientes para induzir aumentos significativos nos níveis basais de corticosterona dos animais septais. Ao contrário, observou-se uma tendência destes animais apresentarem níveis

basais de corticosterona inferiores aos dos animais controle. Dois fatos podem explicar tais dados:

Primeiro: foi demonstrado que os núcleos septais estão, de alguma forma, envolvidos nos mecanismos cerebrais de nocicepção e analgesia, provavelmente pelo envolvimento de neurônios originários das vias septo-hipocampus colinérgicas, (ASSAF e MILLER, 1978 e DUTAR, LAMOUR e JOBERT, 1985) e por prováveis relações com a área pré-óptica (CARSTENS, MAC KINNON e GUIMAN, 1982, e MESULAN, MUFSON, LEVEY e WAINER, 1981). FELDMAN e CONFORTI (1980), também demonstraram que a estimulação neural periférica não induzia respostas do eixo hipotálamo-adrenal. Deste modo, o corte na cauda ao qual os animais normais foram submetidos, pode ter refletido em um aumento dos níveis basais de corticosterona, o que não ocorreu nos animais septais.

Segundo: o fato da coleta de sangue ter sido realizada em um intervalo de tempo de no máximo 5 minutos, desde a retirada dos animais do biotério, pode ser insuficiente para que o aumento dos níveis de corticosterona devido os estímulos estressantes da coleta, seja acusado nas amostras de sangue.

Diferenças na extensão da lesão, atingindo diferentes núcleos septais, restringe sobremaneira, a comparação dos dados deste experimento com poucos trabalhos contidos na literatura.

Muitos autores atribuem à lesão dos núcleos septais laterais e medial, o comportamento hiper-reativo do

eixo hipotálamo-adrenal (BLANCHARD, BLANCHARD, LEE e NAKAMURA, 1974 ; GAGE e OLTON, 1975, e ALBERT e BRAYLEY, 1979), outros autores atribuem tal comportamento apenas à lesão dos núcleos laterais (ENDROCZI et alii, 1971 ; ALBERT e WONG, 1979 e KOHLER e SREBRO, 1980), sendo a lesão do núcleo medial responsável, segundo MYHRER (1989), por uma inibição do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (H.H.A.), durante o estresse.

Funções diferentes dos núcleos septais laterais e medial, no controle do eixo H.H.A. também foram demonstradas por BRAYLEY e ALBERT (1977); FELDMAN, CONFORTI e SIEGEL (1982) e DUNN (1987).

Desta forma, com relação aos dados deste experimento (figura 5.1), pode-se afirmar que o aumento da atividade do eixo hipotálamo-adrenal observado, esta associado ao estresse e à lesão ampla da área septal, envolvendo todos os núcleos septais. O incremento de 35% nos níveis séricos de corticosterona dos animais com lesão septal, em relação aos animais normais, durante o estresse (tabela 5), está de acordo com os dados obtidos por SEGGIE et alii (1974a,b) ; UHLIR, SEGGIE e BROWN (1974); WILSON e CRITCHLOW (1974) e SEGGIE e BROWN (1973) que trabalharam com ratos submetidos a lesões septais semelhantes à realizada neste experimento.

Com base nestes dados, pode-se concluir que a soma dos efeitos das lesões dos diferentes núcleos septais, relativos à estimulação ou inibição do eixo Hipotálamo-

Hipófise-Adrenal, não é igual ao efeito da lesão global dos mesmos núcleos.

Pelos dados deste trabalho, a lesão ampla dos núcleos septais induziu uma resposta de corticosterona sempre maior que nos animais com cérebro íntegro, seja durante o estresse ou na imunização.

Apesar das projeções septais do fórnix terem sido lesadas na totalidade das aspirações da região septal realizadas neste trabalho, estudos da influência do fórnix nos níveis de corticosterona plasmática, demonstraram que esta estrutura abole apenas temporariamente os ritmos diurnos do eixo H.H.A, retornando aos valores normais na 3ª semana após a lesão. Assim, o fórnix não seria uma estrutura chave na mediação das influências extra-hipotalâmicas da corticosterona plasmática (OLTON e GAGE, 1974, e CONFORTI e FELDMAN, 1976). Contudo estes dados são relativos a estudos com ratos lesados exclusivamente no fórnix e mantidos em condições basais (LENGVARIE e HALAZZ, 1973 e MOBERG, SCAPAGNINI, DE GROOT e GANONG, 1971), não havendo na literatura informações a respeito da participação desta estrutura no controle da atividade do eixo HHA nas lesões amplas da área septal, ou em condições de estresse.

Apesar dos efeitos no eixo H.H.A, observados neste experimento serem semelhantes aos dados de muitos autores, o fato dos animais septais terem sido usados na experimentação propriamente dita, 30 dias após a lesão dos núcleos septais, dá um caráter crônico a esta lesão, o que diferencia

substancialmente, do ponto de vista morfo-funcional, dos animais usados na maioria dos trabalhos da literatura, que analisaram os efeitos agudos da lesão septal (ENDROCZI et alii, 1971 ; SEGGIE e BROWN, 1973 ; ALBERT e BRAYLEY, 1974; GAGE e OLTON, 1975 ; SEGGIE et alii , 1974a,b ; WILSON e CRITCHLOW, 1974; UHLIR, SEGGIE e BROWN, 1974 ; BLANCHARD et alii, 1979 ; KOHLER e SREBRO, 1980 ; ALBERT e WONG, 1979, e POPLAWSKY e ISAACSON, 1990).

Mesmo tendo sido demonstrado que a área septal é um agregado de núcleos que serve como um ponto de convergência entre as informações corticais e periféricas, além das informações entre as várias estruturas do Sistema Límbico (BURSTEIN e GIESLER, 1989 ; BLAND, COLOM e FORD, 1990 ; O'BRIAN et alii, 1990 e ISAACSON, 1990), pouco se sabe a respeito dos reflexos funcionais da lesão septal na organização neural do cérebro. Neste sentido, considerando os recentes trabalhos realizados por KOLB e GIBB (1991) e IRLE (1987) demonstrando que o tamanho da lesão nem sempre é um impedimento para a recuperação funcional do cérebro, os dados deste experimento permitem afirmar que, mesmo passados 30 dias da cirurgia, os núcleos da região septal, participam, de alguma forma, da organização neural do sistema central de controle do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, durante o estresse.

O Estresse e a Resposta Imune Primária (Timo e Imunoglobulinas)

A opção pela imunização dos animais estressados logo após o término da contenção por 12 horas, quando estes animais apresentavam os níveis de corticosterona acima dos valores basais, foi feita a partir de informações obtidas da literatura, onde constatou-se que na maioria dos trabalhos envolvendo estresse e resposta imune, a imunização era realizada logo após a aplicação do estímulo estressante (OKIMURA e NIGO, 1986 ; OKIMURA, OGAMA, YAMAMUSHI e SASAKI, 1986 ; RAAB et alii, 1986 ; TESHIMA et alii, 1987 ; RABIN, LYTE, EPSTEIN e GAGGIULA, 1987 ; CROISET et alii, 1987 e BALUTSOV, 1989, 1990).

Normalmente quando o estresse é aplicado antes da imunização é observado uma depressão dos eventos imunes, mas esta relação temporal não deve ser considerada uma regra, como demonstrou ZALCMAN, MINKIEWICZ-JANDA, RICHTER e ANISMAN, (1988). Alguns estudos evidenciaram um aumento da resposta imune após a aplicação de estresse brando em ratos imunizados com antígeno timo-dependente (CROISET et alii, 1987).

Os dados contidos nas tabelas 2, 3 e 4 expressam claramente que o estresse de contenção por 12 horas, em nenhum dos 5 dias analisados, induziu uma queda dos níveis séricos de imunoglobulinas, tanto nos animais normais quanto

nos animais septais. Também não foi, por si, responsável por alterações no peso do timo e das adrenais (tabela 1).

De acordo com COHEN (1987), MORLEY, KAY, SOLOMEN e PLOTNIKOFF (1987), e GRIFFIN (1989), o efeito do estresse tanto na imunidade, como nas respostas neuro-endócrinas depende das características físicas e psicológicas do agente estressor, das características individuais da resposta a ser analisada e do tempo de aplicação do estímulo estressante, relativo aos eventos verificados.

Com relação à qualidade do estresse, a contenção aplicada antes da imunização, tem sido demonstrado que provoca uma diminuição nos níveis circulantes de imunoglobulinas (OKIMURA e NIGO, 1986 ; OKIMURA et alii, 1986 e BALUTSOV, 1989, 1990) e uma diminuição do P.F.C. (Células Formadoras de Placas) no baço de animais imunizados com hemácias de carneiro (BORANIC et alii, 1987, e PERICIC et alii, 1987). Entretanto, estes trabalhos têm em comum a contenção por 24 horas dos animais a serem imunizados.

É provável que a contenção, por 12 horas, usada neste experimento, não tenha sido suficiente para induzir uma diminuição das imunoglobulinas circulantes. Estes dados estão de acordo com a afirmação feita por LYSLE, LYTE, FOWLER e RABIN (1987) que o efeito supressivo de um agente estressor é proporcional à intensidade do mesmo.

Ainda à luz da intensidade do estímulo, os dados deste trabalho também estão de acordo com TESHIMA et alii (1987), que apesar de analisarem o número de linfócitos T

circulantes em animais imunizados com hemácias de carneiro, não observaram nenhuma alteração na quantidade total destas células após o estresse de contenção por 17 horas.

Com relação ao peso do timo, no 15º dia após a imunização, a figura 3.2 mostra que não houve diferenças entre os animais controle e os animais com os cérebros íntegros submetidos ao estresse. Não é possível afirmar, contudo, que nos primeiros dias após a imunização, o estresse não tenha reduzido o peso do timo dos animais submetidos à contenção, a exemplo do observado por TESHIMA et alii (1987), que verificaram também uma recuperação progressiva do peso deste órgão ao longo dos dias que secederam a imunização.

Por outro lado, nos animais com lesão da área septal, o estresse apesar de não ser o fator determinante da atrofia tímica observada (figura 3.2), acentuou significativamente a perda de peso deste órgão, mesmo após 15 dias da aplicação do estímulo estressor (tabela 1).

Todavia, é importante realçar que a variável estresse foi introduzida neste experimento principalmente pelo fato dos animais septais apresentarem um reflexo acentuado do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal diante de um estímulo estressor, como referia a literatura pertinente ao assunto e comprovada neste experimento. Neste sentido, apesar de não restar dúvidas a respeito dos efeitos imunossupressivos da corticosterona (BATEMAN et alii, 1989), o mesmo não pode ser afirmado com relação ao estresse que

apesar de induzir um aumento dos níveis de corticosterona, nem sempre promove uma imunossupressão (GRIFFIN, 1989).

Como pode ser verificado nas tabela 5, apesar do estresse ao qual os animais foram submetidos terem elevado os níveis séricos de corticosterona em 158%, nos animais normais e 337%, nos animais septais, não foi verificado, por conta disso, nenhuma diminuição nos níveis de imunoglobulinas G ou Totais.

Os dados deste trabalho não estão de acordo com os obtidos por OKIMURA et alii (1986) que demonstraram que a imunossupressão observada em camundongos submetidos à contenção por 24 horas era corticosterona-dependente, e que os animais estressados estavam com seus níveis de corticosterona duas vezes superior aos controles. Outros autores, como SAPOLSKY e DONNELLY, 1985, e PERICIC et alii, 1987, apesar de trabalharem com estímulos estressores diferentes ao utilizado neste experimento, constataram uma imunossupressão devido elevações dos níveis de corticosterona iguais ou menores que as obtidas neste experimento.

Por outro lado, KORNEVA e SHKLINEK (1990) demonstraram que apesar de certos tipos de estresse induzirem um grande aumento nos níveis de corticosterona, nem sempre é observada uma redução dos níveis séricos de imunoglobulinas Totais e Ig G, podendo ocorrer, inclusive, um aumento destas imunoglobulinas ao mesmo tempo que elevadíssimos níveis de corticosterona são encontrados.

MUNCK, GUYRE e HOLBROOK (1984), BLALOCK et alii (1985), CUPPS e FAUCI (1982) e ESTERLING e RABIN (1987) também não encontraram, em seus experimentos, diminuição da resposta imune devido o estresse.

Muitos fatores atuam na modulação da resposta imune pelo estresse, que não apenas os glicocorticóides. Durante o estresse outros hormônios e neuropeptídeos são liberados na circulação e acredita-se que muitos destes possuem propriedades imunomodulatórias (GRIFFIN, 1989; BATEMAN et alii, 1989, e DANTZER E KELLY, 1989).

As β -endorfinas e encefalinas são neuropeptídeos que, ao contrário da corticosterona, são descritas como estimuladoras da resposta imune (GILMAN et alii, 1982 ; PLOTNIKOFF et alii, 1985a,b ; BROWN e VAN EPPS, 1986 e MANDLER, BIDDISON, MANDLER e SERRAT, 1986). Outro hormônios, frequentemente liberados no estresse, como a vasopressina, ocitocina, GH, prolactina, insulina e TSH (WIDEMAN e MURPHY, 1985 e HIESTAND et alii, 1986) atuam em células imunocompetentes estimulando-as (BLALOCK et alii, 1985 JOHNSON e TORRES, 1985 ; SNOW, 1985 ; KRUGER e BLALOCK, 1986 BELUSSI et alii 1987 ; BERTON et alii 1987 ; KIESS et alii, 1988 e KELLEY, 1989).

Segundo COHEN (1987), DUNN (1988 b) e GRIFFEN (1989) é uma interseção entre os fatores característicos do estímulo estressor, do hospedeiro e do evento imune analisado que determina o efeito do estresse na resposta imune.

É provável que algum(s) destes hormônios ou neuro-peptídeos, sobrepondo ao efeito inibidor da corticosterona, esteja envolvido, não apenas no fato de não ter sido observada uma diminuição das imunoglobulinas circulantes após a contenção dos ratos por 12 horas (tabelas 2 e 3), mas também no fato de, ao contrário, o estresse ter estimulado, do 6º ao 12º, a quantidade de Ig M circulante, do grupo de animais normais submetidos ao estresse (figura 4.1). Resultados semelhantes foram encontrados por GHANTA et alii (1985), CROISET et alii (1987) e KORNEVA e SHKHINEK (1990), os quais observaram um aumento da atividade imune durante o estresse.

O Efeito da Lesão Septal na Resposta Imune Primária

Como pode ser observado na figura 4.2, com relação aos níveis séricos de Ig G, os animais septais tiveram em todos os dias, valores significativamente menores que os animais com cérebro íntegro (tabela 3).

Também o timo dos animais com lesão septal, tiveram seus pesos diminuídos em relação aos pesos dos timos dos animais com cérebro íntegro e neste caso, o estresse acentuou este decréscimo (tabela 1).

Embora exista uma íntima relação dos núcleos septais com os sistemas extra-hipotalâmicos de controle da

corticosterona durante o estresse, como demonstrado neste experimento (figura 5.1), não se sabe se estas relações estão envolvidas também na depressão da resposta imune observada nos animais septais, como revela os dados deste trabalho.

Alguns trabalhos demonstraram que lesões na região medial do hipotálamo, provocam uma redução na atividade dos linfócitos, independente de alterações na atividade do eixo hipotálamo-adrenal, que permanece inalterado com a lesão (BELLUARDO et alii, 1987 ; ABRANSKY et alii, 1987 e KADLECOVA et alii, 1987). Outros trabalhos demonstram que a influência do hipotálamo na resposta imune estava ligada ao controle dos glicocorticóides e catecolaminas por esta estrutura (SAPHIER et alii, 1987).

Os dados deste experimento, que revelaram uma diminuição nos níveis circulantes de imunoglobulinas 2ME-resistente, nos grupos de ratos com lesão septal, são semelhantes aos dados obtidos por BERCZI, NAGY, KOVACS e HORVATH, (1981) nos animais hipofisectomizados, os quais apresentaram níveis significativamente baixos de imunoglobulinas 2ME-resistente. Entretanto, nestes animais, os níveis de imunoglobulinas 2ME-sensíveis se encontravam também com seus níveis inferiores aos animais normais (BERCZI et alii, 1981), o que não ocorre com os animais com lesão dos núcleos septais (figura 4.1 E figura 4.3).

KATAYAMA et alii (1987) demonstraram que as porções anteriores e posteriores do hipotálamo desempenham

um papel na modulação dos linfócitos T e o hipotálamo medial foi considerado um sítio do mecanismo de controle tanto dos linfócitos T como dos linfócitos B, atuando, deste modo, mais diretamente no controle da produção e liberação de imunoglobulinas.

Como demonstrado por muitos autores, os núcleos septais laterais projetam fibras eferentes primárias para as porções anteriores do hipotálamo (ALBERT e CHEW, 1980 ; FERRIS et alii, 1980 ; FELDMAN, CONFORTI e SIEGEL, 1982 e MEIBACH e SIEGEL, 1987a) e estimulações das porções posteriores do hipotálamo modificam o potencial de ação dos neurônios septais (BLAND, COLOM e FORD, 1990). As relações entre a área septal e o hipotálamo são mais evidentes no controle da liberação de CRF (Fator de Liberação de Corticotrofina), como demonstrado por muitos autores (FELDMAN et alii, 1982 ; DUNN, 1987 ; SEGGIE e BROWN, 1973, e ALBERT e BRAYLEY, 1979) e confirmado neste trabalho. Contudo, à luz da morfologia, há evidências que suportam a hipótese de que esta relação entre os núcleos septais e o hipotálamo esteja envolvida no fato da lesão septal ter induzido uma diminuição da concentração de Ig G circulante, independentemente da relação entre estas duas estruturas límbicas no controle do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (H.H.A.).

Por outro lado, de acordo com a literatura, em relação aos aspectos fisiológicos da área septal, seria praticamente impossível, pensarmos a respeito das

influências dos núcleos septais na resposta imune sem que fizéssemos uma abordagem do eixo H.H.A.

Foi demonstrado que a estimulação eletrogênica dos núcleos septais laterais de ratos anestesiados induzia uma ativação do sistema timo-linfático (KARKAVI et alii, 1988), estimulação esta que, em circunstâncias semelhantes, também induziu um aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona (DUNN, 1987).

Entretanto, a diminuição dos níveis de Ig G e principalmente do peso do Timo, encontrados nos animais lesados e imunizados com hemácias de carneiro deste experimento, são achados frequentes na imunossupressão induzida pela corticosterona (OKIMURA e NIGO, 1986 ; ZALCMAN et alii, 1988 ; BALUTSOV, 1989, 1990 e KORNEVA e SHKLINEK, 1990).

Apesar de JEONG, NAKOINZ e RALPH (1986) e RALPH et alii (1984) terem demonstrado que a dexametasona induz a síntese de BIF, uma substância produzida pelos linfócitos T mitógeno-estimulado a qual estimula a produção de imunoglobulinas, McMILLAN, LONGMIRE e YELENOVSKY (1976) verificaram que ao contrário do baço, a produção de Ig G na medula ossea e no sangue estavam significativamente diminuídos em ratos tratados com dexametasona. Segundo estes autores, a atividade do BIF não influi na inibição da síntese de Ig G pela corticosterona, in vivo, pois a ação inibitória deste hormônio ocorre basicamente a nível de medula óssea, onde a maior parte das células ainda não

foram sensibilizadas pelo antígeno. Uma vez que 95% da síntese de imunoglobulina G ocorre na medula (COOPER et alii, 1979), de acordo com este mecanismo, é provável que a corticosterona afete drasticamente os níveis séricos de Ig G (BUTLER, 1975, e SMITH et alii, 1977).

Outros autores compartilham desta hipótese, pois não encontraram, em seus experimentos, alterações significativas na síntese de imunoglobulinas e na proliferação de linfócitos B após serem estimulados pelo antígeno (ESTERLING e RABIN, 1987 ; BLALOCK et alii, 1985 ; CROISET et alii, 1987 ; LUSTER e col., 1987, e DENNIS e col., 1987).

Pelo fato dos animais com lesão septal terem apenas os níveis de Ig G diminuídos e um elevado nível de corticosterona, em determinados dias ao longo da resposta imune (figura 5.1), é provável que este mecanismo de ação medular da corticosterona tenha alguma relação com os dados obtidos neste experimento (Mc MILLAN, LONGMIRE e YELENOSKY, 1976; BUTLER, 1975 e SMITH et alii, 1977).

Nos animais com lesão septal, apesar do estresse ao qual parte destes animais foram submetidos, ter elevado sobremaneira os níveis séricos de corticosterona (tabela 5), não houve diferenças, entre eles, em relação aos níveis séricos de imunoglobulinas G analisados ao longo dos 15 dias que se sucederam à imunização (tabela 3).

A muitos outros hormônios igualmente tem-se atribuído funções de mediadores do efeito do estresse na

resposta imune, conforme discutido anteriormente, porém pouco se sabe, com exceção dos glicocorticóides, sobre o controle e liberação destes hormônios nos animais com lesões dos núcleos septais.

Apesar da prolactina, ser um hormônio hipofisário frequentemente liberado durante o estresse e possuir efeitos imunomodulatórios (BELUSSI et alii, 1987 ; BERTON et alii, 1988 , 1987), provavelmente não está envolvida na modulação da resposta imune dos animais septais, pois foi demonstrado que os níveis de prolactina não se alteram de maneira anormal, nos animais com lesão da área septal, submetidos a estresse (UHLIR, SEGGIE e BROWN, 1974 ; BROWN et alii, 1974 e POLKOVITS et alii, 1980).

Entretanto, também nos animais com os núcleos septais lesados, a ativação do eixo Hipófise-Adrenal é feita às custas da liberação de CRF (Fator de Liberação de Corticotrofina) pelos neurônios parvocelulares do núcleo paraventricular do hipotálamo (ANTONI, 1986) e de acordo com RIVIER e PLOTSKY (1986) o CRF é capaz de estimular a secreção não apenas de ACTH, mas de todos os derivados da proopiomelanocortina, inclusive as β -endorfinas, que deste modo, também são liberados na circulação, durante o estresse (GRIFFIN, 1989 ; MUNCK, GUYRE e HOLBROOK, 1984 e PLOTNIKOFF e MURGO, 1985).

Muitos autores têm atribuído ao ACTH e principalmente às β -endorfinas propriedades imunorregulatórias (GILMAN et alii, 1982 ; WYBRAN, 1985 ;

SHAVIT et alii, 1984 ; JOHNSON et alii, 1984 e ALVAREZ-MON, KEHRL e FAUCI, 1985). Deste modo é possível que estes neuro-peptídeos, de alguma forma, estejam também relacionados com as alterações observadas na resposta imune dos animais septais.

A análise das variações dos níveis de imunoglobulinas totais ao longo dos 15 dias que sucederam à imunização, mostrou que no 3º dia os animais com lesão septal praticamente não apresentavam imunoglobulinas séricas. Ao contrário os animais com cérebro íntegro tinham 5 vezes mais imunoglobulinas (tabela 2). Apesar da quantidade de imunoglobulinas, neste dia, representarem apenas 7% da média das imunoglobulinas circulantes dos demais dias, é notória a influência da lesão dos núcleos septais, retardando o aparecimento de imunoglobulinas totais na circulação. Como no 3º dia não houve ocorrência de Ig G circulantes, as imunoglobulinas circulantes, neste dia, são na sua maioria Ig M (tabela 4).

Os mecanismos que permitiram a manutenção dos níveis elevados de Ig M, nos animais normais estressados, discutidos anteriormente, provavelmente não funcionaram nos animais com lesão dos núcleos septais. Também a velocidade de resposta de Ig M demorou para aparecer e desapareceu mais rapidamente nos animais lesados estressados (figura 4.3).

É possível que os mecanismos relacionados com a diminuição dos níveis de Ig G nos animais septais influenciaram o retardo no aparecimento de Ig M destes

animais.

O peso do timo, apesar de avaliado 15 dias após a imunização, quando os níveis de imunoglobulinas já se encontravam com valores baixos, é um dado que permite conclusões interessantes. Como mostra a figura 3.3, não houve diferenças nos pesos dos timos entre os animais com cérebro íntegro, demonstrando que o estresse aplicado neste experimento, não alterou o peso deste órgão, ou se houve alguma atrofia, nos primeiros dias, esta não estava mais presente passados 15 dias da imunização, a exemplo do observado por TESHIMA et alii (1987). Os animais com lesão septal não imunizados, ao contrário dos animais septais imunizados, também não apresentaram diminuição no peso do timo. Estes dados, por si, demonstram que a atrofia tímica, nos animais septais, está relacionada a eventos imunes, ou no mínimo, depende da presença de antígenos.

Entre os animais com lesão na área septal, o estresse apenas acentuou a diminuição do peso do timo (figura 3.1).

Acrescentando a estes dados o fato dos níveis de corticosterona, durante o estresse dos animais septais terem, se elevado bem acima do normal, a ponto de suas adrenais apresentarem uma hipertrofia, mesmo passados 15 dias da contenção à qual os animais foram submetidos, é possível que os glicocorticóides tenham uma participação efetiva na atrofia tímica dos animais septais estressados.

O efeito da corticosterona estresse-induzida na

atrofia tímica de animais normais imunizados foi relatada por muitos autores (TESHIMA et alii, 1987 ; BALUTSOV, 1989, 1990 ; OKIMURA e NIGO, 1986 ; OKIMURA et alii, 1986 ; RABIN et alii, 1987 e LYSLE et alii, 1987) e a ação da corticosterona na atrofia tímica, desvinculada do estresse, foi também demonstrada em alguns trabalhos (SAPOLSKY e DONNELLY, 1985 e DANTZER e KELLY, 1989).

Por conta destes dados, a corticosterona certamente é uma forte candidata a mediadora da imunossupressão observada nos animais septais.

Apesar das especulações a respeito da ação dos glicocorticóides na resposta imune e os prováveis mecanismos envolvidos na inibição da resposta imune observada nos animais com lesão septal, a participação do timo, como mediador das influências neuro-endócrinas na imunidade, parece certa (HADDEN, 1987 e DESCHAUX e ROVABHIA, 1987).

O Sistema Nervoso Autônomo, por inervar diretamente o parênquima do timo e do baço promove um importante controle da atividade imune destes órgãos (FELTEN et alii, 1985). Neste sentido, as catecolaminas são consideradas importantes mediadoras do efeito imunossupressivo constantemente observados após o estresse agudo, principalmente da atrofia tímica (SIBINGA e GOLDSTEIN, 1988 e KOFF e DUNAGAN, 1988). Contudo sua participação no efeito da lesão septal na diminuição da resposta imune, observada neste trabalho, é incerta.

Cinética da Corticosterona ao longo da Resposta Imune

Independente da participação ou não da corticosterona nos mecanismos envolvidos na diminuição dos níveis de IgG dos animais com lesão septal, as flutuações deste hormônio foi avaliada, ao longo da reposta imune, para termos uma idéia da influência dos eventos imunes no eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal dos animais septais.

Como demonstrado na figura 5.1, os grupos de animais com lesão na área septal, apresentaram, dois picos de elevação dos níveis de corticosterona, nos 30 e no 120 dias após a imunização. Os dados obtidos pela análise dos níveis deste hormônio nos animais septais não imunizados, não deixam dúvidas que esta elevação nos níveis de corticosterona está associada ao evento imune, em última análise, à presença do antígeno.

A comparação entre os níveis de corticosterona no grupo de animais normais mantidos em condições basais, imunizados com hemácias de carneiro (HC) e os níveis deste hormônio no grupo de animais septais, também mantidos em condições basais, porém não imunizados, revela que a partir do 3º dia após a imunização ocorre uma tendência dos níveis de corticosterona dos animais imunizados se elevarem, em relação aos animais não imunizados. Mais do que isto, a análise estatística entre estes dois grupos comprova que no 3º e 12º dia, os níveis plasmáticos de corticosterona estão

significativamente mais altos nos animais imunizados (tabela 5). Também a comparação dos níveis de corticosterona, no grupo de animais normais não estressados, mostra que os níveis deste hormônio no 3º e 12º dia pós-imunização são significativamente maiores que os níveis pré-imunização (item IV.5.3).

Resultados semelhantes foram encontrados por BESEDOVSKY, SORKIN, KELLER e MULLER (1975), e BESEDOVSKY, DEL REY e SORKIN (1985a) os quais revelaram elevações nos níveis de ACTH e corticosterona em ratos imunizados com hemácias de carneiro e por BESEDOVSKY et alii (1985b) e DUNN e POWELL (1987) em ratos imunizados por vírus NDV.

Muitos autores têm atribuído às interleucinas-1 (IL-1) esta função de mensageiro entre o Sistema Imune e o eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal, promovendo a liberação de ACTH e consequentemente corticosterona (BESEDOVSKY et alii, 1985a,b ; DEL REY e col., 1987 e LUMPKIN, 1987).

BERKENBOCH et alii (1987) ; SAPOLSKY, ARMANINI, PACKAN e TOMBAUGH (1987) e DUNN (1988a,b), demonstraram que as interleucinas-1 eram capazes de induzir a liberação de CRF pelo hipotálamo. Entretanto, a partir dos dados destes autores não se pode afirmar que o hipotálamo seja o único sítio de ação das IL-1.

Muitos autores sugerem que as IL-1 penetram no Sistema Nervoso Central, através das lacunas encontradas na barreira hematencefálica, para atuar em vários sítios do cérebro (PARTRIDGE, 1983, e COCEANI, LEES e DINARELLO,

1988).

Como demonstrado por KATSURA, GOTTSCHALL, DAHL e ARIMURA (1988) injeções intracerebroventriculares de interleucina-1 são capazes de induzir um aumento de ACTH circulante, 100 vezes mais facilmente que injeções intraperitoniais.

Provavelmente, as interleucinas-1 estejam envolvidas nos aumentos de corticosterona observados nos animais com lesão dos núcleos septais e imunizados com HC. A afirmação feita por RABIN, LYTE, EPSTEIN e CAGGIULA (1987) e RAAB et alii (1986), que o estresse raramente afeta as funções macrófago/monócitos, aumenta a probabilidade das IL-1 serem as mediadoras do efeito da resposta imune nos níveis de corticosterona dos animais septais, uma vez que as interleucinas-1 são citocinas liberadas principalmente pelos macrófagos.

Foi demonstrado que também as interleucinas-6 exercem um efeito estimulatório do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HHA), aumentando a liberação de corticosterona em ratos (NAITOH et alii, 1988). Não se pode descartar, portanto, a idéia destas citocinas estarem, também, envolvidas nos mecanismos de ação da resposta imune no eixo HHA dos animais septais.

De qualquer forma, os dados deste trabalho confirmam as relações bidirecionais entre o Sistema Imune e o eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal, postulado por muitos autores (BATEMAN et alii, 1989), além de sugerir a

participação dos núcleos septais do Sistema Límbico, nestas relações.

Animais Septais: Um modelo do Efeito da Corticosterona na Resposta Imune ?

Como já era de se esperar, o segundo pico de imunoglobulinas, observado no 9º dia após a imunização é devido a presença de IgG. Certamente o primeiro pico de imunoglobulinas, no 6º dia após a imunização, observado pelo Título de Ig Totais, seja devido à presença, na maioria, de IgM (FELDMANN e MALE, 1989).

Coincidentemente, a análise da cinética da corticosterona nos animais com lesão dos núcleos septais, revelaram a existência de dois picos deste hormônio ao longo da resposta imune avaliada, um primeiro no 3º dia e um segundo pico no 6º dia após a imunização.

Apesar das imunoglobulinas e os níveis de corticosterona terem sido analisados nos mesmos dias, possivelmente, as diferenças nos sítios e no tempo de liberação entre as IgG, IgM e corticosterona, colaborou para que as relações temporais entre os picos de imunoglobulinas e do hormônio, analisados no plasma, não guardassem uma equivalência mais evidente entre si, a qual foi demonstrada por BESEDOVSKY et alii (1975).

Mesmo assim, de acordo com as evidências descritas na literatura (BESEDOVSKY et alii, 1975 ; BESEDOVSKY et

alii, 1985a,b ; DUNN e POWELL, 1987; LUMPKIN, 1987 ; DEL REY e col., 1987; COCEANI, LEE e DINARELLO, 1988, e KATSURA et alii, 1988) é muito provável que os picos nos níveis de corticosterona dos animais septais, observados no 3º e 12º dias após a imunização, estejam relacionados com os picos de imunoglobulinas da resposta imune primária.

A resposta hormonal à imunização, mais rápida e intensa nos animais septais, pode ter provocado um retardo na resposta de imunoglobulinas M e um tamponamento da resposta de Imunoglobulinas G, observada nestes animais (figura 4.1 e figura 4.2). Contudo, este fato não descarta a hipótese de outros mecanismos estarem relacionados com estes efeitos observados.

Apesar dos dados deste trabalho não serem conclusivos a respeito da ação única da corticosterona na imunodepressão observada nos animais septais, os dados deste trabalho permite sugerir que as citocinas que medeiam as influências dos eventos imunes no eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal, atuam a nível de núcleos septais do sistema límbico de modo semelhante aos estímulos estressores. Isto, de alguma forma, deve ser importante para que as informações vindas dos órgãos ou células imunocompetentes estimulem o sistema neuro-endócrino para a modulação da própria resposta imune (SEGGIE e NYAKAS, 1987 ; WILSON e CRITCHLOW, 1973 ; DUNN, 1987 ; BATEMAN et alii, 1989 ; GRIFFEN, 1989 ; DANTZER e KELLY, 1989).

V. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permite as seguintes conclusões:

1. Os núcleos septais participam da organização do Sistema Nervoso Central no controle extra-hipotalâmico do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal, apenas durante o estresse.

2. O estresse de contenção por 12 horas, eleva os níveis séricos de corticosterona, mas não reduz significativamente as concentrações das imunoglobulinas no sangue, ao contrário, mantém alto os níveis de Ig M.

3. A lesão ampla da área septal provoca involução tímica em ratos imunizados com Hemácias de Carneiro, um antígeno timo-dependente, porém não afeta o timo de animais não imunizados.

4. Nos ratos imunizados, o estresse acentua a atrofia tímica provocada pela lesão dos núcleos septais, mas não pode ser considerado a causa desta atrofia observada após 15 dias da imunização.

5. A lesão ampla da área septal, o estresse e a imunização associados, induzem uma hipertrofia das adrenais, observada após 15 dias da imunização.

6. A lesão ampla da área septal diminui significativamente os níveis séricos de imunoglobulinas G, independentemente do estresse de contenção aplicado.

7. A lesão dos núcleos septais também altera a dinâmica das imunoglobulinas M, retardando o seu aparecimento na circulação, mas aumentando a velocidade de incremento destas imunoglobulinas, nos animais não estressados, além de aumentar a velocidade de decréscimo de Ig M nos animais estressados.

8. A imunização nos animais com lesão septal, induz uma resposta hiperreativa do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, elevando os níveis de corticosterona sérica relativamente às elevações máximas de imunoglobulinas circulantes, durante a resposta imune.

VI. RESUMO

O efeito da lesão septal e estresse na resposta imune primária e no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal foi investigado em ratos imunizados com hemácias de carneiro.

Ratos machos da linhagem Wistar, com idade entre 2 a 3 meses, foram submetidos à aspiração bilateral dos núcleos septais com auxílio de um aparelho estereotático. O procedimento de estresse utilizado foi a contenção noturna por 12 horas.

Amostras de sangue foram coletadas para a determinação dos níveis séricos de corticosterona e imunoglobulinas, ao longo dos 15 dias que sucederam a imunização.

Os resultados mostraram que a lesão septal diminuiu o aparecimento de imunoglobulinas 2-mercaptoetanol-resistentes (Ig G) na circulação, altera a dinâmica das imunoglobulinas 2-mercaptoetanol-sensíveis (Ig M), nos primeiros dias após a imunização, e induz uma resposta hiperreativa do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, nos animais imunizados, independente do estresse aplicado.

VII. SUMMARY

The effects of septal lesion and stress on the primary immune response and hypothalamic-pituitary-adrenal axis were investigated in rats immunized with sheep red blood cells.

Male Wistar rats were set up on a stereotaxic instrument and their septal nucleus were bilaterally aspirated. The stress procedure used was the restraint for 12 hours during the dark period.

Blood samples were collected for determination of corticosterone levels and serum immunoglobulins, during 15 days after immunization.

The results had shown that the septal lesion decreases the level of 2-mercaptoethanol-resistant immunoglobulins (Ig G) in the blood stream, modifies the dynamics of 2-mercaptoethanol-sensitive immunoglobulins (Ig M) until the third day after immunization and induces hiperreactivity of hipotalamic-pituitary-adrenal axis associated with the immune response, independently of the applied stress.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRANSKY, O.; WERTMAN, E.; RECHES, A.; BRENNER, T. & OVADIA, H. (1987) Effect of hypothalamic lesions on experimental autoimmune diseases in rats. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 496 : 360
- ALBERT, D.S. & BRAYLEY, N.K. (1979) Mouse killing and hiper- reactivity following lesions of medial hypothalamus and lateral septum. *Physiology and Behavior* 23 : 439
- ALBERT, D.S. & CHEW, G.L. (1980) The septal forebrain and the inhibitory modulation of attack and defense in the rat. A Review. *Behavioral and Neural Biology* 30 : 357
- ALBERT, D.S. & STORLIEN, L.H. (1969) Hyperphagia with cuts between the ventromedial and lateral hypothalamus. *Science* 65 : 599
- ALBERT, D.J. & WONG, R.C.K. (1978) Interanimal aggression and hyperreactivity following hypothalamic infusion of local anesthetic in the rat. *Physiol. and Behav.* 20 : 755
- ALVAREZ-MON, M.; KEHRL, J.H. & FAUCI, A.S. (1985) A potencial role for adrenocorticotropin in regulating human B lymphocyte function. *J. Immunol.* 135 : 3823
- ANTONI, F.A. (1986) Hypothalamic control of adrenocorticotropin secretion: Advances since the discovery of 41-residue corticotropin-releasing factor. *Endocr. Rev.* 7 : 351

- ASSAF, S.Y. & MILLER, J.J. (1978) The role of a raphe serotonin system in the control of septal unit activity and hippocampal desynchronization
Neuroscience 3 : 539
- BALUTSOV, M. (1989) The effect of immobilization stress on primary humoral immuno response in white rats. *Eksp. Med. Morf.* 28(2) : 29
- BALUTSOV, M. (1990) The effect of thyroid- and parathyroidectomy on stress-induced changes in the primary humoral immune response of white rats. *Eksp. Med. Morfol.* 29(3) : 55
- BATEMAN, A.; SINGH, A.; KRAL, T. & SOLOMON, S. (1989) The Immune-Hypothalamic-Pituitary-Adrenal axis *Endocrine Reviews* 10(1) : 92
- BELLUARDO, N.; MUDO, G.; CELLA, S.; SANTONI, A.; FORNI, G. & BINDONI, M. (1987) Hypothalamic control of certain aspects of natural immunity in the mouse. *Immunology* 62 : 321
- BELUSSI, G.; MUCCIOLI, G.; CORRADO, G. & DiCARLO, R. (1987) Prolactin binding sites in human erythrocytes and lymphocytes. *Life Sciences* 41 : 951
- BERCZI, I.; NAGY, E.; KOVACS, K. & HORVATH, E. (1981) Regulation of humoral immunity in rats by pituitary hormones. *Acta Endocrinologica* 98: 506
- BERKENBOCH, F.; VAN OERS, J.; DEL REY, A.; FILDERS, F. & BESEDOVSKY, H.O. (1987) Corticotropin releasing factor producing neurons in the rat activated by interleukin-1. *Science*, 238 : 524

- BERTON, E.W.; METZLER, M.S.; HOLADAY, J.W.; SMALLRIDGE, R.C. & FEIN, H.G. (1987) Release of multiple hormones by a direct action of interleukin-1 on pituitary cells. *Science* 238: 519
- BESEDOVSKY, H.O.; SORKIN, E.; KELLER, M. & MÜLLER, J. (1975) Changes in blood hormones levels during the immune responses. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 150 : 466
- BESEDOVSKY, H.O.; DEL REY, A. & SORKIN, E. (1985) Immune-neuroendocrine interactions. *J. Immunol.* 135 : 750
- BESEDOVSKY, H.O.; DEL REY, A.E.; SORKIN, E.; LOTZ, W. & SCHWULERA, V. (1985) Lymphoid cells produce an immunoregulatory glucocorticoid increasing factor (GIF) acting through the pituitary gland. *Clin. Exp. Immunol.* 59 : 622
- BLAND, B.H.; COLOM, L.V. & FORD, R.D. (1990) Responses of septal theta-on and theta-off cells to activation of the dorsomedial-posterior hypothalamic region *Brain Res. Bull.* 24(1) : 71
- BLALOCK, J.E.; JOHNSON, H.M.; SMITH, E.M. & TORRES, B.A. (1985) Enhancement of the *in vitro* antibody response by thyrotropin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 125 : 30
- BLALOCK, J.E. & SMITH, E.M. (1985) A complete regulatory loop between the immune and neuroendocrine system. *Fed. Proc. (FASEB)* 44(1) : 108
- BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J.; LEE, E.M.C. & NAKAMURA, S. (1979) Defensive behaviour in rats following septal and septal-amygdala lesions. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 93: 379

- BORANIC, M.; PERICIC, D.; POLJAK-BLAZI, M.; SVERO, V. & MAROLTE, T. (1987) Suppression of immune response in rats by stress and drugs interfering with metabolism of serotonin. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 496 : 485
- BRAYLEY, R.N. & ALBERT, D.J. (1977) Suppression of VMH-Lesion induced reactivity and aggressiveness by electrical stimulation ventral to the anterior septum. *Physiol. and Behav.* 18 : 567
- BROWN, G.M.; UHLIR, I.V.; SEGGIE, J.; SCHALLY, A.V. & KASTIN, A. J. (1974) Effect of septal lesions on plasma of MSH, corticosteron, GH and prolactin before and after exposure to novel environment: Role of MSH in the Septal Syndrome *Endocrinology* 94 : 583
- BROWN, L.S. & Van EPPS, D.E. (1986) Opioid peptides modulate production of interferon by human mononuclear cells. *Cell Immunol.* 103 : 19
- BUTLER, W.T. (1975) Corticosteroids and immunoglobulin synthesis. *Transplant Proc.* 7 : 49
- BURSTEIN, R. & GIRSLER Jr, G.J. (1989) Retrograde labeling of neurons in spinal cord that project directly to nucleus accumbens or the septal nuclei in the rat. *Brain Res.* 497: 149
- CAO, N.H.; INANAMI, O.; SATO, A. & SOTO, Y. (1989) Stimulation of the septal complex increases local cerebral blood flow in the hippocampus in anesthetized rats. *Neurosc. Lett.* 107(1-3) : 135

- CARSTENS, E.; MacKINNON, J.D. & GUIMAN, M.J. (1982) Inhibition of spinal dorsal horn neuronal responses to noxious skin heating by medial preoptic and septal stimulation in the cat. *J. Neurophysiology*, 48(4) : 981
- CAVALLO, R.; SARTORI, M.L.; GATTI, G. & ANGELI, A. (1986) Cortisol and immune interferon can interact in the modulation of human natural killer cell activity. *Experientia* 42 : 11
- COCEANI, F.; LEES, J. & DINARELLO, C.A. (1988) Occurrence of interleukin-1 in cerebrospinal fluid of the conscious cat. *Brain Res.* 446 : 245
- COFFEY, R.G. & HADDEN, J.W. (1985) Neurotransmitters, hormones and cyclic nucleotides in lymphocyte regulation. *Fed. Proc. (FASEB)* 44(1) : 112
- COHEN, J.J. (1987) Methodological issues in behavioural immunology. *Immunol. Today* 8 : 33
- COMPTON, M.W. & CIDLOWSKI, J.A. (1986) Rapid *in vivo* effects of glucocorticoids on the integrity of rat lymphocyte genomic deoxyribonucleic acid. *Endocrinology* 118 : 38
- CONFORTI, N. & FELDMAN, S. (1976) Effects of dorsal fornix section and hippocampectomy on adrenocortical responses to sensory stimulation in the rat. *Neuroendocrinology* 22 : 1

- COOPER, D.A.; DUCKETT, M.; PETTS, V. & PENNY, P. (1979) Corticosteroid enhancement of immunoglobulin synthesis by pokeweed mitogen stimulated human lymphocytes. *Clin.Exp.Immunol.* 37 : 145
- CROISET, G.; HEIJNEN, C.J.; VELDHUIS, H.D.; WIED, D. & BALLIEX, R.E. (1987a) Modulation of the immune response by emotional stress. *Life Sciences* 40 : 775
- CROISET, G.; VELDHUIS, H.D.; BALLIEX, R.E.; De WIED, D. & HEIJNEN, C.J. (1987b) The impact of mild emotional stress induced by passive avoidance procedure on immune reactivity. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 496 : 477
- CUPPS, T.R. & FAUCI, A.S. (1982) Corticosteroid mediated immunoregulation in man. *Immunol. Rev.* 65 : 133
- DANTZER, R. & KELLY, K.W. (1989) Stress and immunity: An integrated view of relationships between the brain and the immune system. *Life Sciences* 44 : 1995
- DEL REY, A.; BESEDOVSKY, H.; SORKIN, E. & DINARELLO, C.A. (1987) Interleukin-1 and glucocorticoid hormones integrate an immunoregulatory feedback circuit. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 496 : 85
- DENNIS, G.; JUNE, C.H.; MIZUGUCHI, J.; OHARA, J.; WITHESSPOON, K.; FINKELMAN, F.D.; Mc MILLAN, V. & MOND, J.J. (1987) Glucocorticoids suppress calcium mobilization and phospholipid hydrolysis in anti-Ig antibody-stimulated B cells. *J. Immunol.* 139 : 2573
- DESCHAUX, P. & ROWABHIA, M. (1987) The thymus: key organ between endocrinology and immunology systems. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 496 : 49

- DINARELLO, C.A. (1988) Biology of interleukin-1. *FASEB J.* 2 : 108
- DONOVICK, P.J.; BURRIGHT, R.G. & BENGELLOUN, W.A. (1979) The septal region and behavior: An example of the importance of genetic and experiential factor in determining effects of brain damage. *Neurosc. Biobehav. Rev.* 3 : 83
- DONOVICK, P.J.; BURRIGHT, R.G.; FANELLI, R.J. & ENGELLEMME, W.J. (1981) Septal lesions and avoidance behavior: genetic neurochemical and behavioral considerations. *Physiol. Behav.*, 26 : 495
- DUNN, A.J. (1988a) Systematic interleukin-1 administration stimulates hypothalamic norepinephrin and metabolism paralleling the increased plasma corticosterone. *Life Science* 43 : 429
- DUNN, A.J. (1988b) Nervous system-immune system interactions: An overview. *J. Receptor Res.* 8(1-4) : 589
- DUNN, A.J. & POWELL, M.L. (1987) Virus-induced increases in plasma corticosterone. *Science* 238 : 1423
- DUNN, J.D. (1987) Differential plasma corticosterone responses to electrical stimulation of medial and lateral septal nuclei. *Neuroendocrinology* 46(5) : 406
- DUNN, J.D. & MILLER, D. (1986) Differential plasma corticosterone responses to electrical stimulation of the medial septal-diagonal band complex. *Neurosc. Abstract* 12: 1520 (in Abstract)

- DUNN, J.D. & ORR, S. (1984) Differential plasma corticosterone responses to hippocampal stimulation. *Exp. Brain Res.* 54 : 1
- DUNN, J.D. & WHITENER, J. (1986) Plasma corticosterone responses to electrical stimulation of the amygdaloid complex: cytoarchitectural specificity. *Neuroendocrinology* 42: 211
- DURANT, S. (1986) *In vivo* effects of catecholamines and glucocorticoids on mouse thymic cAMP content and thymolysis. *Cell Immunol.* 102 : 136
- DUTAR, P. ; LAMOUR, Y. & JOBERT, A. (1985) Activation of identified septo-hippocampal neurons by noxious peripheral stimulation *Brain Res.* 328 : 15
- ENDROCZI, E. & NYAKAS, C. (1971) Effect of septal lesion on exploratory Activity, Passive Avoidance, Learning and Pituitary-adrenal function in the rat. *Acta Phys. Acad. Scient. Hungr.* 39(4) : 351
- ESTERLING, B. & RABIN, B.S. (1987) Stress-induced alterations of T-lymphocytes subsets and humoral immunity in mice. *Behav. Neurosci.* 101 : 115
- FEIGE, J.J.; COCHET, C.; RAINEY, W.E.; MACLONI, C. & CHAMBAZ, E.M. (1987) Type β transforming growth factor affects adrenocortical cell differentiated functions. *J. Biol. Chem.* 262 : 13491
- FELDMAN, S. & CONFORTI, N. (1980) The role of medial septal nucleus in mediating adrenocortical responses to somato sensory stimulation. *J. Neurosc. Res.* 5 : 19

- FELDEMAN, S.; CONFORTI, N. & SIEGEL, R.A. (1982) Adrenocortical responses following limbic stimulation in rats with hypothalamic deafferentations. *Neuroendocrinology* 35: 205
- FELDMANN, M. & MALE, D. (1989) Cell cooperation in the immune response in: *Immunology* by Roith, I.; Brostoff, I. and Male, D. (eds). Gower Med. Publishing 2^o Ed.
- FELTEN, D.L. ; FELTEN, S.Y. ; CARLON, S.L. ; OLSCHOWKA, T.A & LIVNAT, S. (1985) Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue. *J. Immunol.* 135 : 755
- FERRIS, C.F.; GOLD, L.; DeURIES, G.J. & POTEHAL, M. (1990) Evidence for a functional and anatomical relationship between the lateral septum and the hypothalamus in the control of flank marking behavior in Golden Hamsters. *J. Comp. Neurol.* 293(3) : 476
- FUJIWARA, R. & ORITA, K. (1987) The enhancement of the immune response by pain stimulation in mice. *J. Immunol.* 138 : 3699
- GAGE, F.H. & OLTON, O.S. (1975) Hippocampal influence on hyperactivity induced by septal lesion. *Brain Res.* 98: 311
- GARKAVI, L.K. ; KVAKINA, E.B. ; KOROBE-INIKOVA, E.P. & EVSTRATOVA, O.F. (1988) Morphofunctional state of the organs of the thymico-lymphatic system during various adaptive reactions induced by electric stimulation of emotogenic structures of the brain. *Biull. Eksp. Biol. Med.* 105(5) : 522

- GATTI, G.; CAVALLO, R.; SARTORI, M.L.; Del PONTE, D.; MASERA, R.; SALVADORI, A.; CARIGNOLA, R. & ANGELI, A. (1987) Inhibition by cortisol of human natural killer (NK) cell activity. *J. Steroid Biochem.* 26 : 49
- GHANTA, V.K.; HIRAMOTO, R.N.; SALVASON, H.B. & SPECTOR, N.H. (1985) Neural and environmental influences on neoplasia and conditioning N.K. activity. *J. Immunol.* 135 : 848
- GILMAN, S.C.; SCHWARTZ, J.M.; MILNER, R.J.; BLOOM, F.E. & FELDMAN, J.D. (1982) β -Endorphin enhances lymphocytes proliferative responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79 : 4226
- GOGATE, M.G.; SALGAR, O.C.; BRID, S.V. & WINGKAR, K.C. (1989) Dissociation of feeding and hoarding after bilateral destruction of lateral septal nuclei in rats. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 33(1) : 59
- GOTSICK, J.E. & MARSHALL, R.C. (1972) Time course of the septal rage syndrome. *Physiol. and Behav.* 9 : 685
- GRAND PERRET, J. & LEMAIRE, G. (1986) Dexamethasone inhibits anti-tumor potencial of activated macrophages by a receptor mediated actin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 136 : 130
- GRIFFIN, J.F.T. (1989) Stress and Immunity: a unifying concept. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 20: 263
- GRAY, J.A. & McNAUGHTON, N. (1983) Comparisons between the behavioral effects of septal and hippocampal lesions: A review. *Neurosc. Biobehav. Rev.* 7 : 119

- HADDEN, J.W. (1987) Neuroendocrine modulation of the thymus dependent immune system. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 496 : 39
- HAMMOND, G.R. & THOMAS, G.S. (1971) Failure to reactivate the septal syndrome in rats. *Physiol. and Behav.* 6 : 599
- HEIJNEN, C.J.; CROISET, G.; ZULSTRA, J. & BALLIEX, R.E. (1987) Modulation of lymphocytes function by endorphins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 496 : 162
- HIESTAND, P.C.; MEKLER, P.; NORDMANN, R.; GRIEDER, A. PERMMONGKOL, C. (1986) Prolactin as a modulator of lymphocyte responsiveness provides a possible mechanism of action for cyclosporin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83 : 2599
- IRLE, E. (1987) Lesion size and recovery of function: Some new perspectives. *Brain Research Rev.* 12 : 307
- JEONG, G.; NAKOINZ, T. & RALPH, P. (1986) Independent regulation of B cell inducing factor and IL-2 production by T lymphocytes, and direct and indirect promotion of immunoglobulin secretion by glucocorticosteroid. *Cell Immunol.* 103 : 199
- JOHNSON, H.M. & TORRES, B.A. (1985) Regulation of lymphokine production by arginine vasopressin and oxytocin: modulation of lymphocyte function by neurohypophyseal hormones. *J. Immunol.* 135 : 773

- JOHNSON, H.M.; TORRES, B.A.; SMITH, E.M.; DION, L.D. & BLALOCK, J.E. (1984) Regulation of lymphokine (μ -interferon) production by corticotropin. *J. Immunol.* 132 : 246
- KADLECOVA, O.; MASEK, K.; SEIFERT, J. & PETROVICKY, P. (1987) The involvement of some brain structures in the effect of immunomodulators. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 496 : 395
- KARKAVI, L.K.h; KVAKINA, E.B.; KOROBENIKOVA, E.P. & EVSTRATOVA, O.F. (1988) Morphofunctional state of the organs of the thymico-lymphatic system during various adaptive reactions induced by electric stimulation of emotiogenic structures of the brain. *Biull. Eksp. Biol. Med.* 105(5) : 522-526 (In Abstract)
- KAPCALA, L.P. (1988) Stimulated release of immunoreactive adrenocorticotropin and β -endorphin from extra hypothalamic brain. *Neuroendocrinology* 47 : 50
- KATAYAMA, M.; KOBAYASHI, S.; KURAMOTO, N. & YOKOYAMA, M.M. (1987) Effects of hypothalamic lesions on lymphocyte subsets in mice. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 496 : 366
- KATSWURA, G.; GOTTSCHALL, P.E.; DAHL, R.R. & ARIMURA, A. (1988) Adrenocorticotropin release induced by intracerebroventricular injection of recombinant human interleukin-1 in rats: Possible involvement of prostaglandin. *Endocrinology* 122 : 1773

- KELLER-WOOD, M.E. & DALLMAN, M.F. (1984) Cortisteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocr. Rev.* 5 : 1
- KELLEY, K. (1989) Growth hormone, lymphocytes and macrophages. *Biochemical Pharmacology* 38(5) : 705
- KELSEY, J.E. (1975) Role of pituitary-adrenal system in mediating avoidance behavior of rats with septal lesions. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 88(1) : 271
- KELSO, A. & MUNCK, A. (1984) Glucocorticoid inhibition of lymphokine secretion by alloreactive T lymphocyte clones. *J. Immunol.* 133 : 784
- KIESS, W.; MALOZOWSKI, S.; GELATO, M.; BUTENAND, O.; DOERR, H.; CRISP, B.; EISL, E.; MALUISH, A. & BELOHRADSKY, B.H. (1988) Lymphocyte subset distribution and natural killer activity in growth hormone deficiency before and during short-term treatment with growth hormone releasing hormone. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 48 : 85
- KOFF, W.C. & DUNEGAN, M.A. (1988) Neuroendocrine hormones suppress macrophage-mediated lysis of herpes simplex virus-infected cells. *J. Immunol.* 136 : 705
- KOHLER, C. & SREBRO, B. (1986) Effects of lateral and medial septal lesions on exploratory behavior in the albino rat. *Brain Res.* 182 : 423
- KOLB, B. & GIBB, R. (1991) Sparing of function after neonatal frontal lesions correlates with increased cortical dendritic branching: A possible mechanism for the Kennard effect. *Behavioral Brain Res.* 43 : 51

- KORNEVA, E.A. (1987) Electrophysiological analysis of brain reactions to antigen. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 496 : 318
- KORNEVA, E.A. & SHKLINEK, E.K. (1990) Neuroendocrine mechanisms underlying stress-induced changes in immune reactions. *Intern. J. Neuroscience* 51 : 225
- KRAFT, K.; LANG, R.E.; KIRILOV, G.; MAURER, J.; UNGER, T. & GANTEN, D. (1983) Differential stress induced changes in plasma, pituitary and hypothalamic immunoreactive β -endorphin: Effect of diurnal variation, adrenalectomy, corticosteroid and opiates agonists and antagonists. *Neuroendocrinology* 36 : 225
- KREIGER, D.T. (1983) Brain peptides: what, where, why? *Science* 222 : 975
- KRUGER, T.K. & BLALOCK, J.E. (1986) Cellular requirements for thyrotropin enhancement of *in vitro* antibody production. *J. Immunol.* 137 : 197
- LATHAN, E.E. & THORNE, B.M. (1974) Septal damage and muricid: Effect of strain and handling. *Physiol. and Behav.* 12: 526
- LENGVARIE, I. & HALAZZ, B. (1973) Evidence for a diurnal fluctuation in plasma corticosterone levels after fornix transection in the rat. *Neuroendocrinology* 11 : 191

- LIOLTA, A.S.; LOUDES, C.; Mc KELRY, J.F. & KRIEGER, D.T. (1980) Biosynthesis of precursor corticotropin /endorphin, corticotripin and melanotropin, β -lipotropin, and β -endorphin-like material by cultured neonatal rat hypothalamic neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 : 1880
- LUMPKIN, M.D. (1987) The regulation of ACTH secretion by IL-1. *Science*, 238 : 452
- LUSTER, M.I.; GERMOLIC, P.R.; CLARK, G.; WIEGAND, G. & ROSENTHAL, G.J. (1988) Selective effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p. dioxin and corticosteroid on *in vitro* lymphocyte maturation. *J. Immunol.* 140 : 928
- LYSLE, D.T.; LYTE, M.; FOWLER, H. & RABIN, B.S. (1987) Shock-induced modulation of lymphocyte reactivity: Supression, habituation and recovery. *Life Sciences* 41 : 1805
- Mc GILLIS, J.P.; HALL, N.R.; VAHOUNY, G.V. & GOLDSTEIN, A.L. (1985) Thymosin fraction 5 causes increased serum corticosterone in rodents *in vivo*. *J. Immunol.* 134 : 3952
- Mc GINNIS, M.; NANCE, P.M. & GORSKI, R.A. (1978) Olfactory, septal and amygdala lesions alone or in combination: Effects on lordosis behavior and emotionality. *Physiol. and Behav.* 20 : 435
- Mc MILLAN, R.; LONGMIRE, R. & YELENOVSKY, R. (1976) The effect of corticosterids on IgG synthesis. *J. Immunol.* 116 : 1592

- MANDLER, R.N.; BIDDISON, W.E.; MANDLER, R. & SERRATI, S.A.
(1986) β -Endorphin augments the cytolytic activity and interferon production of natural killer cells. *J. Immunol.* 136 : 934
- MEIBACH, R.C. & SIEGEL, A. (1977a) Efferent connections of the septal area in the rat: An analysis utilizing retrograde and anterograde transport methods. *Brain Res.* 119 : 1
- MEIBACH, R.C. & SIEGEL, A. (1977b) Efferent connections of the hippocampal formation in the rat. *Brain Res.* 124 : 197
- MESULAM, M.M.; MUFSON, E.J.; LEVEY, A.J. & WAINER, B.H.
(1983) Cholinergic innervation of cortex by basal forebrain cytochemistry and cortical connections of the septal area, diagonal band nuclei, nucleus basalis (substantia innominata), and hypothalamus in the Rhesus monkey. *J. Comp. Neurol.* 214(2): 170
- MOBERG, G.P.; SCAPAGNINI, V.; DeGROOT, J. & GANONG, W.F.
(1971) Effects of sectioning the fornix on directional fluctuations in plasma corticosterone levels in the rat *Neuroendocrinology* 7 : 11
- MORLEY, J.E.; KAY, N.E.; SOLOMEN, G.F. & PLOTNIKOFF, N.P.
(1987) Neuropeptides: conductors of the immune orchestra. *Life Sciences* 41 : 527
- MYHRER, T. (1989) Exploratory behavior and reactions to novelty in rats: effects to medial and lateral septal lesions. *Behav. Neurosc.* 103(6) : 1226

- MUNCK, A.; GUYRE, P.M.; HOLBROOK, N.J. (1984)
Physiological functions of glucocorticoid in stress and
their relationship to pharmacological actions. *Endocr.*
Rev. 5 : 25
- NAITOH, Y.; FUKATA, T.; TOMINAGA, T.; NAKAI, Y. & IMURA, H.
(1988) Interleukin-6 stimulates the secretion of
adrenocorticotrophic hormone in conscious freely moving
rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 155 : 1459
- NATELSON, B.H.; OTTENWELLER, J.E.; COOK, J.A.; PITMAN, D.;
Mc CARTY, R. & TAPP, W.N. (1988) Effect of stressor
intensity on habituation of the adrenocortical stress
response. *Physiology & Behavior* 43 : 41
- OATES, E.L.; ALLAWAY, G.P.; ARMSTRONG, G.R.; BOYAJIAN,
R.A.; KEHRL, J.H. & PRAHAKAR, B.S. (1988) Human
lymphocytes produce pro-opiomelanocortin gene-related
transcripts. *J. Biol. Chem.* 263 : 10041
- O'BRIAN, T.S.; SVENDSEN, C.N.; ISACSON, O. & SOFRONIEW, N.V.
(1990) Loss of true blue labelling from the medial
septum following transection of the fimbria-fornix:
evidence for the death of cholinergic and non-
cholinergic neurons *Brain Res.* 508(2) : 249
- OKIMURA, T. & NIGO, Y. (1986a) Stress and immune responses
I: Suppression of cell function in restraint-stressed
mice. *Japan. J. Pharmacol.* 40 : 505
- OKIMURA, T.; OGAWA, M.; YAMAMUSHI, J. & SASAKI, Y. (1986b)
Stress and immune Responses IV: Adrenal involvement in
the alterations of antibody responses in restraint-
stressed mice. *Japan. J. Pharmacol.* 41 : 237

- OLTON, O.S. & GAGE, F.H. (1974) Role of fornix in the septal syndrome. *Physiol. Behav.* 13 : 269
- OTTAWAY, C.A. (1987) Selective effects of vasoactive intestinal peptide with mouse lymphocytes: specific binding and the modulation of mitogen response. *J. Immunol.* 132 : 417
- PARTRIDGE, W.M. (1983) Neuropeptides and the blood-brain barrier. *Ann. Rev. Physiol.* 45 : 73
- PAXINOS, G. & WATSON, C. (1986) The rat brain in stereotaxic coordinates. (2^o Ed.) Academic Press New York U.S.A.
- PERICIC, D.; MANEV, H.; BORANIC, M.; POLJAK-BLAZI, M. & LEKIC, N. (1987) Effect of diazepam on brain neurotransmitters, plasma corticosterone and the immune system of stressed rats. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 496 : 450
- PITMAN, D.L.; OTTENWELLER, J.E. & NATELSON, B.H. (1988) Plasma corticosterone levels during repeated presentation of two intensities of restraint stress: Chronic stress and habituation. *Physiology & Behavior* 43 : 47
- PLOTNIKOFF, N.P. & MURGO, A.J. (1985) Enkephalins-endorphins: stress and the immune system. *Fed. Proc. (FASEB)* 44(1) : 91
- PLOTNIKOFF, N.P.; MURGO, A.J.; MILLER, G.C.; CORDER, C.N. & FAITH, R.E. (1985) Enkephalins: immunomodulators. *Fed. Proc. (FASEB)* 44(1) : 118

- POLKOVITS, M.; MAKAVA, G.B.; LERANTH, C.S. & VAN ARA, H. (1980). Intrahypotalamic terminals of stress conducting fibers. *Brain Res.* 119 : 1
- POLLOCK, R.E.; LOTZOVA, E.; STANFORD, S.D. & ROSENTHAL, M.M. (1987) Effect of surgical stress on murine natural killer cell cytotoxicity. *J. Immunol.* 138 : 171
- POPLAWSKY, A. & ISAACSON, R.L. (1990). Nimodipine accelerates recovery from the hyperemotiuonality produced by septal lesions. *Behav. Neural Biol.* 53 : 133
- POPLAWSKY, A. & JOHNSON, D.A. (1973) Open-field social behavior of rats following lateral or medial septal lesion *Physiol. and Behav.* 11 : 845
- POPLAWSKY, A. & ROBBIN, S.C. (1989) The effects of lateral, medial or complete septal lesions on positive conditioned suppression in rats. *Behav. Neural Biol.* 51 : 377
- RAAB, A.; DANTZER, R.; MICHAUD, B.; MORMED, P.; TAGHZOUTI, K.; SIMON, H. & LeMOAL, M. (1986) Behavioural, physiological and immunological consequences of social status and aggression in chronically coexisting resident-intruder dyads of male rats. *Physiology & Behavior* 36 : 223
- RABIN, B.S.; LYTE, M.; EPSTEIN, L.H. & CAGGIULA, A.R. (1987) Alteration of immune competency by number of mice housed per cage. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 497 : 492

- RALPH, P.; WELT, K.; LEVI, E.; NAKOINZ, I.; LITCOFSKY, P.B.; METELSMANN, R.H. & MOORE, M.A.S. (1984) Human B cell inducing factor(s) for production of IgM, IgG and IgA: Independence from IL-2. *J. Immunol.* 132 : 1858
- RIVIER, C.L. & PLOTSKY, P.M. (1986) Mediation by corticotropin releasing factor (CRF) of adrenohypophysial hormone secretion. *Annu. Rev. Physiol.* 48 : 475
- ROESS, D.A.; BELLONE, C.J.; RUH, M.F.; NADEL, E.M. & RUH, T.S. (1982) The effect of glucocorticoids on mitogen stimulated B lymphocytes: thymidine incorporation and antibody secretion. *Endocrinology* 110 : 169
- SAPHIER, D.; ABRANSKY, O.; MOR, G. & OVADIA, H. (1987) A neurophysiological correlate of an immune response. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 496 : 354
- SAPOLSKY, R.N.; ARMANINI, M.; PACKAN, D. & TOMBAUGH, G. (1987) Stress and glucocorticoids in aging. *Endocrinol. Metab. Clin.* 16 : 965
- SAPOLSKY, R.N. & DONNELLY, T.M. (1985) Vulnerability to stress-induced tumor growth increases with age in rats: Role of glucocorticoids. *Endocrinology* 117(2) : 662
- SCHAFFNER, A. (1985) Therapeutic concentrations of glucocorticoids suppress the antimicrobial activity of human macrophages with-out impairing their responsiveness to interferon. *J. Clin. Invest.* 76 : 1755

- SEGGIE, J. & BROWN, G.M. (1971) Septal lesions and resting adrenal function : A possible explanation of conflicting findings. *Neuroendocrinology* 8 : 367
- SEGGIE, J. & BROWN, G.M. (1973) Effect of dexamethasone on affective behaviour and adrenal reactive following septal lesion in the rat. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 83 : 60
- SEGGIE, J.; UHLER, R. & BROWN, G.M. (1974) Adrenal stress responses following septal lesions in the rat *Neuroendocrinology* 16 : 225
- SEGGIE, J.; SHAW, B.; UHLIR, J. & BROWN, G.M. (1974) Baseline 24-hour plasma corticosterone rhythm in normal, sham operated and septally-lesioned rats. *Neuroendocrinology* 15 : 51
- SHAVIT, Y.; Terman, G.W.; MARTIN, F.C.; LEWIS, J.W.; LIEBESKIND, J.C. & GALE, R.P. (1985) Stress, opioid peptides, the immune system and cancer. *J. Immunol.* 135 : 834
- SHAVIT, Y.; LEWIS, J.W.; Terman, G.W.; GALE, R.P. & LIEBESKIND, J.C. (1984) Opioid peptides mediate the suppressive affect of stress on natural killer cell cytotoxicity. *Science*, 223 : 188
- SHOHAN, S.; DAVENNE, D.; CADY, A.B.; DINARELLO, C.A. & KRUEGER, J.M. (1987) Recombinant tumor necrosis factor and interleukin-1 enhance slow-wave sleep. *Ann. J. Physiol.* 253 : R142

- SIBINGA, N.E.S. & GOLDSTEIN, A. (1988) Opioid peptides and opioid receptors in cells of the immune system. *Ann. Rev. Immunol.* 6 : 219
- SMITH, K.A.; CRABTREE, G.R.; KENNEDY, S.J. & MUNCK, A.U. (1977) Glucocorticoid receptors and sensitivity of mitogen stimulated and unstimulated human lymphocytes. *Nature* 267 : 523
- SMITH, E.N.; MORRILL, A.C.; MEYER III, W.J. & BLALOCK, J.E. (1986) Corticotropin releasing factor induction of leukocyte derived immunoreactive ACTH and endorphins. *Nature*, 321 : 881
- SNOW, E.C. (1987) Insulin and growth hormone function as minor growth factors that potentiate lymphocyte activation. *J. Immunol.* 135 : 776
- SPANGELO, B.L.; HALL, N.R.; GOLDSTEIN, A.L. (1987) Biology and chemistry of thymosin peptides. Modulators of immunity and neuroendocrine circuits. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 496 : 196
- STEIN, M.; KELLER, S.Z. & SCHLEIFER, S.J. (1985) Stress and immunomodulation: the role of depression and neuro- endocrine function *J. Immunol.* 135 : 827
- TAKATSY, G. (1955) The use of spinal loops in serological and virological micro-methods. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* 3 : 189-191
- TAZI, A.; DANTZER, R.; CRESTANI, F. & LE MOAL, M. (1988) Interleukin-1 induces conditioned taste aversion in rats: a possible explanation for its pituitary-adrenal stimulating activity. *Brain Res.* 473 : 369

- TESHIMA, H.; SOGAWA, H.; KIHARA, H.; NAGATA, S.; AGO, Y. & NAKAGAWA, F. (1987) Changes in population of T-cell subsets due to stress. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 496 : 459
- TORRES, J.A.; REJAS, M.T.; BARASOAIN, J.; BORRE, J. & GUAZA, G. (1987) Corticosterone releasing activity of immune mediators. *Life Science*, 40 : 929
- UEHARA, A.; GOTTSCHALL, P.E.; DAHL, R.R. & ARIMURA, A. (1987) Interleukin-1 stimulates ACTH release by an indirect action which requires endogenous corticotropin releasing factor. *Endocrinology* 121 : 1580
- UHLIR, I.; SEGGIE, I. and BROWN, G.M. (1974) The effect of septal lesions on the threshold of adrenal stress responses. *neuroendocrinology* 14 : 351
- USHER, D.R.; LIEBLICH, I. & SIEGEL, R.A. (1974) Pituitary-adrenal function after small and large lesions in the lateral septal area in food-deprived rats. *Neuroendocrinology*, 16 : 156
- WEIGENT, D.A. & BLALOCK, J.E. (1987) Interactions between the neuroendocrine and immune systems: common hormones and receptors. *Immunological Reviews* 100 : 79
- WERB, Z.; FELEY, R. & MUNCK, A. (1978) Interaction of glucocorticoids with macrophages. *J. Exp. Med.* 147 : 1684
- WIDEMAN, C.H. & MURPHY, H.M. (1985) Effects of vasopressin deficiency, age and stress on stomach ulcer induction in rats. *Peptides* (Suppl.) 6 : 63

- WILSON, M. & CRITCHLOW, V.(1974) Effects of septal ablation on rhythmic pituitary-adrenal function in the rat. *Neuroendocrinology* 14 : 333
- WYBRAN, J. (1985) Enkephalins and endorphins as modifiers of the immune system present and future. *Fed. Proc. (FASEB)* 44(1) : 92
- ZALCMAN, S.; MINKIEWICZ-JANDA, A.; RICHTER, M. & ANISMAN, H. (1988) Critical periods associated with stressor effects on antibody titers and on the plaque-forming cell response to sheep red blood cells. *Brain Behav. Immunol.* 2(23) : 254