

FERNANDO LUIZ GIACOMINI

**EFEITOS DA LESÃO DA EMINÊNCIA MÉDIA HIPOTALÂMICA
NAS ALTERAÇÕES DO TIMO E RESPOSTA IMUNOLÓGICA
INDUZIDAS PELO ESTRESSE EM RATOS**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato a)
Fernando Luiz Giacomini
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Gilberto A. Fernandes

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

ORIENTADOR: *Prof. Dr. Gilberto Da Assunção Fernandes*

Campinas - São Paulo

1994

A Ana Cristina, minha esposa
e Lúidia, minha filha.

Razões da minha vida !

Razões do meu amor !

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. ***Gilberto Da Assunção Fernandes***, pela orientação, amizade e confiança.

À Coordenação do curso de Pós-Graduação em Fisiologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, e aos seus professores.

Aos Profs. Drs. ***Alcyr Kraemer, Elenice A. Moraes Ferrari e Iara M. Silva De Luca***, pela análise prévia deste trabalho.

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

Aos Profs. Drs. ***César A. L. Pires, Antônio A. Pretto e Alcyr Kraemer***, do Departamento de Fisiologia e Biofísica da Universidade de Passo Fundo, pelo apoio, confiança e amizade.

Aos Funcionários do Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, em especial aos colegas de laboratório, **Roberto C. Stahl, Tereza C. Baptiston, Cintea Rossi, Paulo C. Granado, Antônio R. do Prado, William A. da Silva e Jorge A. Cicala**, pelo apoio técnico na elaboração deste trabalho, pelo companheirismo e amizade.

À Coordenadoria do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Passo Fundo.

Aos professores e funcionários do Departamento de Histologia e Embriologia do Instituto de Biologia da UNICAMP, em especial aos profs. Drs. **Norair S. dos Reis e Iara M. Silva De Luca**, pelo auxílio no desenvolvimento e análise da parte histológica deste trabalho.

Ao amigo **Fernando Guimarães**, pelo auxílio na elaboração final deste trabalho e pela amizade sincera.

Aos meus familiares, pela solidariedade, carinho e amor.

Fernando Luiz Giacomini

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

- Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior - CAPES.
- Fundação de Apoio ao Ensino e à Pesquisa (FAEP),
Pró-Reitoria de Pesquisa - UNICAMP

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. OBJETIVOS.....	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1. Modelo Experimental.....	27
3.2. Lesão da Eminência Média.....	30
3.3. Estresse Osmótico.....	32
3.4. Procedimento Anestésico.....	39
3.5. Sacrifício.....	39
3.6. Análise do Timo.....	40
3.7. Análise das Adrenais.....	45
3.8. Dosagem da Corticosterona Plasmática.....	45
3.9. Imunização.....	47
3.10. Resposta Imune-Humoral.....	48
3.11. Análise Estatística.....	50
4. RESULTADOS.....	51
4.1. Dosagem Hormonal.....	52
4.2. Timo.....	56
4.2.1. Peso do Timo.....	57
4.2.2. Análise Morfométrica.....	65
4.3. Adrenais.....	75
4.4. Resposta Imune-Humoral.....	77

5. DISCUSSÃO.....	87
6. CONCLUSÕES.....	105
7. RESUMO.....	108
8. SUMMARY.....	110
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	112

1. INTRODUÇÃO

Os estudos da interação entre os sistemas nervoso, endócrino e imunológico são bastante evidentes na literatura recente. Embora o campo da neuroimunoendocrinologia tenha sido definido, em parte, no final da década de 70 (BESEDOWSKI & SORKIN, 1977), sua origem é muito mais antiga. Em meados da década de 20, as conclusões dos trabalhos de Metal'Nikov e Chorine apontavam na direção de que o sistema nervoso central poderia estar envolvido na resposta imune (METAL'NIKOV & CHORINE, 1926). A explicação para esse fato surgiu com o desenvolvimento do conceito de estresse (SELYE, 1936a) e baseou-se nas observações de que o timo sofria involução em consequência do estresse (SELYE, 1936b). Atualmente, embora se saiba da complexidade da interação entre esses sistemas *in vivo* (ADER et al, 1990) ela é largamente aceita e difundida entre os pesquisadores, principalmente no que se refere ao controle neuroendócrino sobre o sistema imune. Menos aceito, mas talvez o mais importante e recente avanço em neuroimunomodulação é o reconhecimento de que o sistema imune pode regular as funções neuroendócrinas, tomando essa comunicação bidirecional (BLALOCK, 1989). Além disso, o sistema nervoso central, o sistema endócrino e o sistema imunológico interagem e respondem a estímulos fisiológicos e farmacológicos de maneira coordenada (DE SOUZA, 1993).

A manutenção da homeostasia é requisito essencial para o bom desempenho das diferentes funções do organismo. Entre os

sistemas homeostáticos, os eixos imune e endócrino têm relevância especial na restauração do balanço fisiológico quando o organismo entra em contato com antígenos (RIVIER, 1993). Embora considerados por muito tempo praticamente independentes um do outro, esses eixos são, agora, sabidamente comunicáveis através de receptores e ligantes comuns (BLALOCK et al, 1985; BLALOCK, 1989; WEIGENT & BLALOCK, 1987).

Em ratos, os glicocorticóides são, usualmente, imunossuppressores (CLAMAN, 1988). Em geral é suposto que a elevação dos níveis de esteróides adrenocorticais é responsável pela modulação da atividade imunológica, frequentemente, associada ao estresse. Entretanto, sabe-se hoje que a ação moduladora do sistema neuroendócrino sobre a resposta imune é mais complexa e não depende da ação exclusiva dos glicocorticóides (BLALOCK, 1989). Embora os hormônios esteróides sejam importantes na imunomodulação (CUPPS & FAUCI, 1982), recentemente foi demonstrado que vários hormônios, e em particular, alguns neuropeptídeos apresentam receptores nas células imunorreguladoras envolvidas na interação celular do sistema imune podendo, portanto, modular a função imunológica (MORLEY et al, 1987).

Os hormônios peptídicos, na sua maioria, podem modular diretamente a resposta imune (BLALOCK, 1989). O ACTH que, inicialmente, parecia interferir na imunomodulação somente através

da esteroidogênese, demonstrou ser também eficaz na regulação das funções dos principais tipos celulares do sistema imunológico, suprimindo a síntese das imunoglobulinas e do gama-Interferon (JOHNSON et al, 1982; JOHNSON et al, 1984), estimulando a proliferação das células *B* (ALVAREZ-MON et al, 1985; BOST et al, 1987) e suprimindo a ativação de macrófagos mediada pelo gama-interferon (KOFF & DUNEGAN, 1985). O ACTH também demonstrou ser capaz de interferir, de maneira inibitória, na resposta aos antígenos T-dependentes (SRBC) e aos antígenos T-independentes (DNF) em ensaio-PFC *in vitro* (JOHNSON et al, 1982), além de suprimir a produção de linfocinas pelos linfócitos-T *in vitro* (JOHNSON et al, 1984). Vários outros derivados peptídicos apresentam atividade imunomoduladora, como a substância *P*, que promove um aumento na proliferação de células *T* (GOETZL et al, 1985) e o TSH, que aumenta a síntese de imunoglobulinas (BLALOCK et al, 1985; KRUGER & BLALOCK, 1986).

Os opióides endógenos, por sua vez, são capazes de influenciar as funções dos principais tipos celulares dentro do sistema imune. As endorfinas e as encefalinas podem modificar a proliferação de linfócitos antígeno-específicos ou mitógeno-dependentes *in vitro* (FONTANA et al, 1987; GILMAN et al, 1982), a atividade das células *NK* (FROELICH & BANKHURST, 1984; KAY et al, 1984), a resposta de anticorpos (HEIJNEN et al, 1986; JOHNSON et al, 1982), a produção de gama-interferon (BROWN & VAN EPPS, 1986) e a quimiotaxia dos fagócitos (VAN EPPS & SALAND, 1984). A

resposta final da ação dessas substâncias será estimulatória ou inibitória, dependendo da sequência de aminoácidos ligada ao receptor opióide ou não-opióide (CARR, 1988; SIBINGA & GOLDSTEIN, 1988) e do estágio de ativação ou diferenciação do linfócito que se ligou à endorfina em questão (SMITH et al, 1986). Exemplificando, a alfa-endorfina e o ACTH inibem (JOHNSON et al, 1982), enquanto a beta-endorfina aumenta (HEIJNEN et al, 1986; SMITH et al, 1986;) ou não afeta (JOHNSON et al, 1982) a resposta primária de anticorpos anti-SRBC.

As encefalinas, no entanto, ligam-se a receptores específicos no cérebro e em linfócitos, e são imunomoduladoras em relação a formação de anticorpos *in vitro* e *in vivo*, ao número de leucócitos no sangue periférico, ao peso do timo, à resistência a antígenos virais e tumorais, à migração de linfócitos, à citotoxicidade celular dependente de anticorpos, e à produção de interleucina-2 e expressão do receptor para interleucina-2 (JOHNSON et al, 1982). JOHNSON et al. (1982) mostraram que a alfa-endorfina é potente supressora da produção de anticorpos, enquanto que a beta e gama-endorfinas não apresentam essa propriedade. Como visto acima, um aspecto interessante da atividade imunomoduladora das endorfinas reside no fato de que apesar das formas alfa, beta e gama terem a terminação NH_2 idêntica, elas exercem funções imunorreguladoras diferentes (SMITH et al, 1985).

Outros dados que demonstram a participação do sistema neuroendócrino no controle da resposta imune provêm dos experimentos de ROSZMAN et al. (1985) que concluíram, em seus estudos, que lesões no hipotálamo anterior são imunossupressivas, e essa redução da resposta imune não é devida a um aumento nos níveis de corticosteróides, mas sim, à supressão dos macrófagos. Eles demonstraram, também, que lesões no hipocampo, amígdala e nos corpos mamilares acentuam a resposta imune. Entretanto, a retirada da hipófise aboliu muitos dos efeitos inibitórios sobre o sistema imune, desencadeados pelas lesões no hipotálamo, e todos os efeitos facilitatórios das lesões do hipocampo e amígdala. Portanto, muitas das alterações imunológicas induzidas por lesões no sistema nervoso central são mediadas pela hipófise ou outros componentes endócrinos (ROSZMAN et al, 1985).

Embora várias outras substâncias oriundas do sistema neuroendócrino possam exercer efeitos imunomoduladores, como vimos acima, indubitavelmente os hormônios adrenocorticais persistem como os principais protagonistas da imunomodulação.

Os glicocorticóides são sintetizados e liberados pelo córtex adrenal, sempre que o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal for estimulado. O hormônio liberador da corticotrofina (CRH), demonstrado, primeiramente, em extratos hipotalâmicos (GUILLEMIN & ROSENBERG, 1955; SAFFRAN & SCHALLY, 1955) e, posteriormente, isolado e sequenciado por VALE et al. (1981), é

um peptídeo sintetizado, principalmente, nos neurônios parvocelulares do núcleo paraventricular hipotalâmico (ANTONI et al, 1983; BLOOM et al, 1982; BRUHN et al, 1984; BUGNON et al, 1982; JESSOP et al, 1990; MERCHENTHALER et al, 1982; OLSCHOWKA et al, 1982; SWANSON et al, 1983). Os neurônios produtores de CRH apresentam projeções que alcançam a camada externa da eminência média hipotalâmica (zona neurohemal), onde o hormônio é secretado nos capilares porta-hipofisários (plexo primário) em resposta a estímulos apropriados (THOMPSON et al, 1987). O sangue portal, subsequentemente, flui para a hipófise anterior (plexo secundário), onde o CRH estimula a liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) tanto em condições basais, como em resposta ao estresse (JESSOP et al, 1990). Portanto, a integridade da eminência média hipotalâmica é de fundamental importância para o funcionamento adequado do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (McCANN, 1953).

O hipotálamo é uma área cerebral que contém muitos dos peptídeos que modulam as funções neuroendócrinas (SWANSON, 1987), sendo considerado o centro para a via de comunicação bidirecional entre os eixos neuroendócrino e imune (RIVIER, 1993). Os sinais neurais associados ao estresse são traduzidos em respostas endócrinas através de seus efeitos em nível do hipotálamo medio-basal (MEANEY et al, 1993). Qualquer que seja a origem do estresse, esse tem sua expressão neuroendócrina

definida somente após o hipotálamo modular a informação e enviar o mensageiro químico CRH para a adeno-hipófise pelos vasos porta-hipofisários da eminência média (RIVIER & VALE, 1983). Lesões hipotalâmicas, particularmente da eminência média, abolem a liberação do ACTH hipofisário e dos esteróides adrenais em resposta ao do estresse (McCANN, 1953). Desse modo, a estrutura chave para a transmissão da mensagem neuroendócrina, em condições basais ou em resposta ao estresse, é a junção neurovascular da eminência média hipotalâmica. A sua destruição desconecta anatômica e funcionalmente o hipotálamo da adeno-hipófise, bloqueando a expressão endócrina ao estresse.

Os efeitos dos glicocorticóides sobre o sistema imune são extremamente diversificados. Esses hormônios alteram a concentração circulante de células brancas do sangue, causando monocitopenia (FAUCI & DALE, 1974; FAUCI, 1976) e linfocitopenia (FAUCI & DALE, 1974; FAUCI, 1975; FAUCI, 1976). Contrariamente, ocorre um rápido aumento de neutrófilos na circulação associado ao nível elevado de cortisol endógeno ou após administração exógena do hormônio (DALE et al, 1975). Os glicocorticóides além de bloquearem a produção de interleucina-1 em nível de transcrição e tradução (KNUDSEN et al, 1987; KERN et al, 1988; LEW et al, 1988) exercem, ainda, efeito na síntese de outras citocinas, tais como, o fator de necrose tumoral (BEUTLER & CERAMI, 1988), a interleucina-2 e gama-interferon (ARYA et al, 1984; GESSANI et al,

1988; GRABSTEIN et al, 1986) e a interleucina-3 (CULPEPPER & LEE, 1985). A atividade das células *NK* apresenta-se diminuída após tratamento com corticosteróides (CAVALLO et al, 1986; GATTI et al, 1987; HOLBROOK et al, 1983; OSHIMI et al, 1980), entretanto, a natureza desse mecanismo inibitório não está esclarecido.

No timo, os glicocorticóides induzem a morte celular em timócitos pela ruptura da integridade do *DNA* (COMPTON & CIDLOWSKI, 1986). Além disso, a administração de glicocorticóides *per se*, ou em conjunto com catecolaminas, resulta em diminuição significativa no peso do timo e no número de timócitos (DURANT, 1986). Frente a estímulos estressantes, o timo de ratos sofre involuções estruturais provocadas pelos glicocorticóides (CLAMAN, 1988). No entanto, o efeito dos hormônios esteróides sobre as células *B* é bastante controverso. Alguns estudos mostram uma diminuição na produção de anticorpos em linfócitos tratados com corticosteróides (PRUETT et al, 1987; ROESS et al, 1982), enquanto outros evidenciam o contrário (COOPER et al, 1979; FAUCI et al, 1977).

Um fator importante que deve ser considerado quando se estuda a ação dos glicocorticóides é a sensibilidade das células imunológicas a esses hormônios, a qual varia muito nas diferentes espécies. A produção de anticorpos em espécies esteróide-sensíveis, como é o caso do rato, é facilmente inibida pelos glicocorticóides. O mecanismo parece ser principalmente pela inibição ou lise dos linfócitos (CLAMAN, 1988).

Por outro lado, a ativação de vários componentes do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal pelo sistema imunológico é um evento, atualmente, bem fundamentado (BERARDINI & SCAPAGININI, 1988; BLALOCK, 1989). A origem dessa interação, em parte, provém dos estudos de BESEDOWSKY et al. (1975) que revelaram uma elevação transitória da corticosterona sérica em camundongos e ratos concomitantemente com o pico da resposta imune. Mais recentemente essa idéia de que o sistema imune interfere com o sistema neuroendócrino recebeu importante reforço pelos achados de que a interleucina-1 altera a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (BERKENBOSCH et al, 1987; RIVIER & VALE, 1989; SAPOLSKY et al, 1987; UEHARA et al, 1987).

As células imunológicas ativadas liberam as interleucinas, as quais estimulam a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (RIVIER, 1993). A administração central de interleucina-1 afeta o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal estimulando a secreção do CRH hipotalâmico (BERKENBOSCH et al, 1987; SAPOLSKY et al, 1987) e aumentando a concentração plasmática de ACTH (BESEDOVSKY et al, 1986; UEHARA et al, 1987). Tanto a alfa interleucina-1 como a beta interleucina-1 causam aumento dose-dependente nos níveis plasmáticos de ACTH e corticosterona (RIVIER et al, 1989). A interleucina-1 usada exogenamente *in vivo* provoca a liberação de ACTH e corticosterona ao ser administrada periférica ou centralmente (BESEDOWSKY et al, 1986; HARBUZ et al, 1992;

SAPOLSKY et al, 1987). Provavelmente essa ação seja devida a uma ativação hipotalâmica, uma vez que esses efeitos estimulatórios sobre a secreção hormonal são bloqueados pela deafferentação do hipotálamo basal medial (OVADIA et al, 1989) ou pela imunoneutralização do CRH endógeno (BERKENBOSCH et al, 1987). Além disso, RIVEST & RIVIER (1991) demonstraram que lesões do núcleo paraventricular atenuam as respostas do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal à interleucina-1. Tal fato sugere que esse núcleo hipotalâmico é necessário para que haja resposta à interleucina-1, e, é consistente com o envolvimento do CRH. Corroborando a idéia de que existe um efeito direto das citocinas nas células secretoras de CRH, estão os relatos de que as interleucinas estimulam a liberação de CRH de fragmentos hipotalâmicos isolados (CAMBRONERO et al, 1992; TSAGARAKIS et al, 1989), ou por infusão direta no hipotálamo (BARBANEL et al, 1990). Por outro lado, a interleucina-1 também exerce ações diretas em órgãos-alvo endócrinos, como a hipófise (BERNTON et al, 1987; FAGARASAN et al, 1989; FUKATA et al, 1989; WOLOSKEY et al, 1985), estimulando a secreção hormonal. Entretanto, ainda é controverso se a interleucina-1 induz a secreção de ACTH através de estimulação direta das células hipofisárias, ou indiretamente via estimulação da secreção do CRH (DE SOUZA, 1993).

Há evidências de que a interleucina-1 possa ser um importante mediador das respostas endócrinas, fisiológicas, neuroquímicas e

comportamentais durante estados patológicos (DUNN, 1993). É provável que outras citocinas sintetizadas e secretadas com a estimulação imunológica podem também participar nessa resposta (DUNN, 1993).

Outras citocinas também podem interferir no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, entre elas tem-se o interferon, que foi o primeiro produto de macrófagos e linfócitos observado a ter função hormonal (BLALOCK & STANTON, 1980). Durante experimentos clínicos, observou-se que o alfa-interferon causa elevação nos níveis de cortisol circulante no homem (ROOSTH et al, 1986). Estudos *in vitro* demonstraram que o interferon induz um efeito esteroideogênico semelhante ao ACTH em cultura de células adrenais (BLALOCK & HARP, 1981). A interleucina-2, por sua vez, mostrou capacidade de elevar não só o ACTH como também o cortisol em experimentos clínicos (LOTZE et al, 1985).

Os peptídeos tímicos também têm grande potencialidade para modular várias funções neuroendócrinas (MORLEY et al, 1987). A fração 5 da timosina, um grupo de peptídeos de baixo peso molecular extraídos de timos bovinos, estimula as células hipofisárias a aumentarem sua secreção de GH e prolactina (SPANGELO et al, 1987). Esses dados sugerem a existência de uma alça de retroalimentação entre o timo e a hipófise.

A ação moduladora do sistema imune sobre o sistema neuroendócrino fica evidente com estudos de HEALY et al. (1983) os

quais demonstraram que a fração 5 da timosina apresenta potente ação estimuladora da secreção de ACTH e cortisol. Os mesmos autores corroboram a idéia da existência de um eixo timo-hipotálamo-hipófise-adrenal mostrando, experimentalmente, que macacos atímicos apresentam uma diminuição significativa dos níveis circulantes de ACTH e beta-endorfina (HEALY et al, 1983). Além disso, a fração 5 da timosina mostrou ser eficaz na inibição da ligação da dexametasona em tímócitos (OSHEROFF, 1981) e na capacidade de aumentar a secreção de corticosterona em roedores *in vivo* (McGILLIS et al, 1985).

A interação imune-neuro-endócrina tem grande relevância no presente trabalho. Como descrito acima, essa interação entre os sistemas é bastante complexa e extremamente importante para a manutenção da homeostasia do organismo. Outro aspecto importante neste trabalho é a determinação do impacto do estresse anestésico e cirúrgico sobre a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, e por extensão, sobre a resposta imune-humoral e tímica. Nas situações de estresse, independente da causa ou origem do mesmo, a interação entre os sistemas imune, nervoso e endócrino exerce papel fundamental na manutenção do estado de equilíbrio do organismo, evitando fenômenos patológicos.

O conceito de estresse, no sentido biológico, foi introduzido na medicina por Hans Selye, na década de 30. As bases fisiológicas da

resposta ao estresse foram atribuídas, inicialmente, a uma ativação de fatores endócrinos envolvendo o eixo simpático-adrenomedular (CANNON, 1935). Na década seguinte, SELYE (1946) descreveu a resposta de animais de laboratório expostos a estímulos nocivos, denominada de *Síndrome Geral de Adaptação*. Posteriormente, esses conceitos foram sofrendo modificações mais abrangentes (SELYE, 1973; EWBANK, 1985).

O reconhecimento cognitivo de um estímulo adverso deflagra uma série de respostas neuroendócrinas, incluindo, estimulação do sistema neurovegetativo, ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, produção de neurotransmissores e neuropeptídeos, e produção de peptídeos e receptores neuroimunológicos, os quais facilitam a transmissão de sinais bidirecionais entre o sistema nervoso central e o sistema linforreticular (GRIFFIN, 1989). A ativação do sistema hipotálamo-hipófise-adrenal e o aumento concomitante dos níveis de glicocorticóides plasmáticos são largamente usados para monitorar a intensidade de estresse em animais (FRANZMANN et al, 1975; JOHNSTON & BUCKLAND, 1976; LEACH, 1982), sendo a ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal parte da resposta fisiológica normal ao estresse (LIGHTMAN et al, 1993).

Até a identificação do efeito da ativação adrenomedular e consequente produção de catecolaminas pelo estresse (MASON, 1968), os corticosteróides reinavam como os hormônios do estresse.

Entretanto, sabe-se hoje que além dos hormônios esteróides, várias outras substâncias são produzidas e liberadas na síndrome do estresse em animais (ROTH, 1985). A ativação do sistema hipófise-adrenal induzida pelo estresse é mediada pelos neurônios hipotalâmicos que contêm CRH e vasopressina localizados na região do núcleo paraventricular (MAKARA, 1985). Outros mediadores como as catecolaminas, serotonina e angiotensina podem também desempenhar um papel nessa ativação desse sistema, em certas condições (MAKARA, 1985). O CRH parece ser um dos neurotransmissores-neuromoduladores cruciais do sistema nervoso central que ativa e coordena as respostas endócrinas, comportamentais, autonômicas, e imunológicas ao estresse (DE SOUZA, 1993). O aumento da liberação do CRH ocorre em resposta a vários estímulos, tais como, a inalação de éter e o estresse cirúrgico, mas são raras as condições de estresse que inibem a resposta hipotalâmica-hipofisária (JESSOP et al, 1989; JESSOP et al, 1990). Com exceção do estado fisiológico da lactação, durante o qual a resposta da corticosterona ao estresse está atenuada (LIGHTMAN & YOUNG, 1989), o estresse osmótico crônico é a única condição experimental em que ocorre inibição do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (JESSOP et al, 1990). Então, as demais situações estressantes, com exceção do estresse osmótico crônico, levam à estimulação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e à produção aumentada de glicocorticóides.

O estímulo osmótico crônico influencia o eixo hipotalâmico-hipofisário inibindo a secreção basal do ACTH, bem como a secreção acentuada desse hormônio induzida pela adrenalectomia (CHOWDREY et al, 1991; JESSOP et al, 1990). Tais fatos sugerem a existência de um mecanismo central de controle dos neurônios parvocelulares hipotalâmicos produtores do CRH, independente do mecanismo de retroalimentação negativa dos glicocorticóides. A diminuição do CRH nos neurônios parvocelulares e na eminência média de animais tratados cronicamente com salina hipertônica, sugere fortemente que o controle osmótico sobre a liberação de ACTH tem sua ação principal em nível hipotalâmico. Entretanto, os fatores que integram a resposta hipotalâmica para o estímulo osmótico permanecem desconhecidos (RESS et al, 1971)

O estresse anestésico e cirúrgico é uma condição determinante na avaliação da atividade do sistema hipotálamo-hipófise-adrenal, bem como da resposta imunológica. As observações de que são frequentes as infecções em pacientes no período pós-operatório (CRUSE & FOORD, 1973), e a ocorrência de depressão da medula óssea verificada após prolongadas exposições anestésicas (LASSEN et al, 1956) evidenciam que há muito tempo existe a preocupação de pesquisadores a respeito do potencial impacto dos agentes anestésicos e do trauma cirúrgico sobre os mecanismos de neuroimunomodulação. Muitas das funções normais do sistema imune são deprimidas após exposição à combinação de

anestesia e cirurgia (STEVENSON et al, 1990). Uma grande parte das alterações imunes observadas em pacientes cirúrgicos são primeiramente resultantes do trauma operatório (cauterizações e manipulação de tecidos e órgãos) e de respostas endócrinas (aumento de ACTH, catecolaminas e corticosteróides), bem como dos efeitos adversos das drogas anestésicas (MOUDGIL, 1986; STEVENSON et al, 1990). Grandes cirurgias provocam marcante resposta endócrina ao estresse, e tem sido sugerido que a imunossupressão pós-operatória é mediada pela resposta endócrina ao estresse durante o período peri-operatório (WEISSMAN, 1990). Corroborando esse fato estão os dados de que procedimentos cirúrgicos com anestesia geral promovem diminuição da resposta imune, ao passo que com anestesia regional essa alteração não ocorre (TONNENSEN & WAHLGREEN, 1988; WHELAN & MORRIS, 1982). O mecanismo proposto para essa preservação da resposta imune seria o bloqueio do eixo neuroendócrino pela anestesia regional (HOLE et al, 1982).

Os agentes anestésicos podem ter efeitos tanto diretos, como efeitos mediados por hormônios, sobre os mecanismos imunológicos, embora as ações hormonais não específicas a longo prazo, em função do estresse anestésico e cirúrgico, possam ter implicações mais profundas posteriormente (WALTON, 1979). A associação do trauma anestésico e cirúrgico promove uma diminuição do número absoluto de linfócitos-T circulantes

(TONNENSEN & WAHLGREEN, 1988) e redução da proliferação de linfócitos-T em resposta a mitógenos (SALO et al, 1984; TONNENSEN et al, 1987). Estudos *in vivo*, usando vários agentes anestésicos, indicam que a combinação de anestesia e cirurgia diminui o número de linfócitos-B e a sua resposta proliferativa à mitógenos (ESKOLA et al, 1984; KURZ et al, 1983; SLADE et al, 1975). No entanto, o efeito sobre o nível de imunoglobulinas é controverso. Existem relatos indicando diminuição (COHNEN, 1972; ESKOLA et al, 1984; MEALY et al, 1987), aumento (KURZ et al, 1983), ou não alteração (ESPANOL et al, 1974; SALO et al, 1984; SLADE et al, 1975) dos níveis circulantes de imunoglobulinas, relacionados com o estresse cirúrgico e anestésico.

Embora não seja conclusivo, parece que a redução da resposta imune tanto celular (linfócito T), como humoral (linfócito B) está relacionada mais com o grau do trauma cirúrgico que com os agentes anestésicos empregados (STEVENSON et al, 1990). O mecanismo exato pelo qual a estimulação cirúrgica diminui a resposta imune ainda não é conhecido. Entretanto, a capacidade de determinadas técnicas anestésicas regionais em bloquear total ou parcialmente alguns componentes da supressão imune, observada no período pós-operatório, pode implicar o eixo neuroendócrino nesse mecanismo (STEVENSON et al, 1990).

Entre as drogas usadas como anestésicos nos procedimentos cirúrgicos, encontram-se algumas com potencial efeito sobre o eixo

hipotálamo-hipófise-adrenal e o sistema imunológico. Os barbitúricos são drogas amplamente usadas na clínica médica. Essas drogas exercem várias ações no organismo, entre as quais podemos incluir efeitos hipnótico-sedativos e anestésicos, relaxamento muscular, ação anticonvulsivante e ansiolítica, depressão respiratória e cardiovascular, e hipotermia. Entretanto alguns derivados do ácido barbitúrico exercem efeitos excitatórios, convulsivantes e estimulantes sobre a função respiratória (RICHTER & HOLTMAN.JR, 1982).

Os barbitúricos agem de forma importante na transmissão sináptica. Essas drogas inibem a transmissão sináptica excitatória e acentuam a transmissão sináptica inibitória (HO & HARRIS, 1981). O aumento da transmissão inibitória foi estudado, em detalhes, em uma variedade de sinapses que usavam o GABA (ácido gama-amino-butírico) como neurotransmissor (BOWERY & DRAY,1978; NICOLL, 1977; SCHLOSSER & FRANCO,1979). Nessas sinapses, os barbitúricos mostravam-se capazes de acentuar os efeitos do GABA, reverter os efeitos de seus antagonistas, e, em alguns casos, mimetizar seus efeitos (BOWERY & DRAY,1978; NICOLL, 1977; SCHLOSSER & FRANCO,1979). A sensibilidade e seletividade das sinapses *GABAérgicas* aos barbitúricos sugere que as mesmas são um importante sítio para a ação dessas drogas (HO & HARRIS,1981).

A administração aguda de pentobarbital aumenta a síntese de

GABA em cérebro de ratos e este aumento pode estar envolvido na narcose barbitúrica (TZENG & HO, 1977). Estudos mais recentes têm mostrado que os barbitúricos acentuam os efeitos do muscimol (um agonista GABAérgico) no *turnover* da dopamina na retina de ratos (KAMP & MORGAN, 1980). Os barbitúricos, portanto, causam muitos de seus efeitos no sistema nervoso através do sistema GABAérgico (OLSEN et al, 1986). O GABA, por sua vez, regula a função neuroendócrina afetando a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (DeFEUDIS 1984; ELIAS et al, 1982; RACAGNI et al, 1982). A maioria dos relatos mostra que o GABA inibe a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (IXART et al, 1983; JONES et al, 1976; LAKIC et al, 1986; MAKARA & STARK, 1974), embora existam relatos contraditórios (ALDEGUNDE et al, 1984; GARCY & MAROTTA, 1978). GREER & ALLEN (1975) descreveram que o pentobarbital pode exercer algum efeito depressor nos mecanismos do sistema nervoso central reguladores do ritmo nicterohemeral da secreção de ACTH.

Os barbitúricos podem agir no sistema imunológico, indiretamente, através da interferência com o sistema neuroendócrino e, além disso, essas drogas podem atuar diretamente no sistema imune. O tiopental mostrou-se eficaz em diminuir a citólise de células tumorais pelos monócitos estimulados por mitógenos (HOLE, 1984).

O éter etílico, no entanto, é um potente agente estressor

(LOPEZ-JIMENEZ et al, 1989), sendo sua influência sobre o sistema neuroendócrino e a atividade imunológica de grande relevância. O efeito estimulatório do éter sobre a atividade do sistema hipotálamo-hipófise-adrenal é inquestionável, e existem evidências claras de que o estresse provocado pelo éter está relacionado às vias neurais direcionadas ao hipotálamo ântero-lateral (KARTESZI et al, 1980). ZIMMERMANN & CRITCHLOW (1967), mostraram que o estresse pelo éter produz um aumento importante na corticosterona plasmática, sendo esse aumento indistinguível entre os períodos da manhã ou da tarde. Os dados de YASUDA et al. (1976), evidenciaram que o estresse pelo éter aumenta de forma significativa os níveis plasmáticos de ACTH em ratos, sendo esse aumento mais importante no período matinal, quando a corticosterona plasmática está baixa.

Em relação ao sistema imunológico, estudos antigos demonstraram leucocitose pós-operatória após anestesia com dietil-éter (MANN, 1916). A leucopenia transitória evidenciada após anestesia com barbitúricos, dietil-éter e clorofórmio (SCHWEITZER, 1932; SMITH et al, 1948; USENIK & CRONKITE, 1965) foi atribuída ou à toxicidade direta ou à redistribuição dos leucócitos. O dietil-éter deprime diretamente a mobilização de fagócitos (BRUCE & WINGARD, 1971).

Os derivados opióides também exercem efeitos tanto em nível do sistema imunológico, como em nível do sistema neuroendócrino.

Em animais de laboratório, a administração aguda de morfina promoveu a supressão da atividade das células NK (BAYER et al, 1990; SHAVIT et al, 1984). O tratamento crônico com essa droga levou à supressão da produção de IgM específica à SRBC (BUSSIERE et al, 1992). Em altas doses, a morfina pode interagir não somente com receptores opióides cerebrais (SHAVIT et al, 1986), mas também com os receptores opióides encontrados nas células do sistema imune, as quais incluem as células imunológicas esplênicas que medeiam a atividade das células NK (CARR et al, 1994). Além dessa ação direta, os derivados opióides podem interferir no sistema imune através da estimulação do sistema neuroendócrino, uma vez que essa droga ativa o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (GEORGE & WAY, 1955). Por outro lado, existem estudos sugerindo que a imunossupressão induzida pela morfina envolve a ativação do sistema nervoso simpático (CARR et al, 1994). Corroborando essa idéia, a administração intracisternal de morfina produz um aumento dos níveis plasmáticos das monoaminas, incluindo a norepinefrina, a epinefrina e a dopamina (APPEL et al, 1986).

Entretanto, quando se avalia o sistema neuroendócrino, percebe-se que o uso isolado de opióides aumenta marcadamente tanto o CRH hipotalâmico como o ACTH plasmático e hipofisário, ao passo que, quando usados em ratos previamente tratados com barbitúrico, a resposta do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal ao

estresse fica abolida (BUCKINGHAM, 1981). Esses dados corroboram os relatos de BRIGGS & MUNSON (1955), que indicavam uma redução da atividade hipotálamo-hipófise-adrenal em ratos tratados com morfina e pentobarbital. Por outro lado, a depressão respiratória provocada pela associação de morfina com nembital, além de causar uma grande mortalidade de animais, frequentemente promove aumento dos níveis de corticosterona plasmática em virtude da má oxigenação sanguínea relacionada com a dificuldade respiratória (ARIMURA et al, 1967). No entanto, as fenotiazinas, como a clorpromazina, demonstraram exercer menor toxicidade quando comparadas com as outras drogas hipnótico-sedativas, além de potencializarem os efeitos dessas drogas e anestésicos. A associação de clorpromazina com morfina e nembital torna possível a redução na dosagem das duas últimas drogas e, também, a prevenção da depressão respiratória (ARIMURA et al, 1967).

2. OBJETIVOS

Considerando que a eminência média hipotalâmica é a estrutura chave para a transmissão da mensagem neuroendócrina e, que, a sua destruição desconecta anatômica e funcionalmente o hipotálamo da adeno-hipófise, bloqueando a expressão endócrina ao estresse, o presente trabalho se propôs a determinar os efeitos da lesão da eminência média hipotalâmica e do estresse anestésico e cirúrgico nas alterações do timo e o seu impacto sobre a resposta imunológica frente a antígenos T-dependentes.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - MODELO EXPERIMENTAL

3.1.1) Animais: Foram utilizados ratos machos da linhagem Wistar s.p.f., de 2 a 3 meses de idade, fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP. Os animais foram mantidos por um período de 8 dias no biotério do laboratório de Fisiologia Clínica Experimental para se adaptarem às condições do novo ambiente. Esse biotério possui ciclo periódico claro/escuro de 12 horas (com iluminação das 06h às 18h) e temperatura em torno de 25°C. Após esse período de adaptação, os ratos foram mantidos em gaiolas individuais por 7 dias antes do procedimento experimental com ração (Purina) para roedores e água *ad libitum*. Após o procedimento cirúrgico, os animais retornaram às gaiolas individuais aguardando o momento da imunização. Depois da imunização os animais permaneceram em gaiolas individuais por mais 5 dias até o momento do sacrifício. Foram utilizados 90 animais no experimento.

3.1.2) Grupos Experimentais: Os animais foram divididos em diferentes grupos, discriminados da seguinte maneira, como segue:

- GRUPO A: animais anestesiados com tiopental sódico e submetidos à lesão cirúrgica simulada (gaLS) ou lesão da eminência média hipotalâmica (gaLEM).
- GRUPO B: animais anestesiados com éter etílico e submetidos à lesão cirúrgica simulada (gbLS) ou lesão da eminência média hipotalâmica (gbLEM).
- GRUPO C: animais que fizeram a ingestão de salina hipertônica durante doze dias (estresse osmótico) anestesiados com éter etílico e submetidos à lesão cirúrgica simulada (gcLS) ou lesão da eminência média hipotalâmica (gcLEM).
- GRUPO D: animais anestesiados com a associação de clorpromazina + meperidina + tiopental sódico e submetidos à lesão cirúrgica simulada (gdLS) ou lesão da eminência média hipotalâmica (gLLEM).
- GRUPO E: grupo controle (gCo).

A Figura 1 mostra a representação esquemática do planejamento experimental proposto. Os animais do grupo controle foram somente imunizados, não sendo, portanto, submetidos a qualquer manipulação cirúrgica ou anestésica.

FLUXOGRAMA

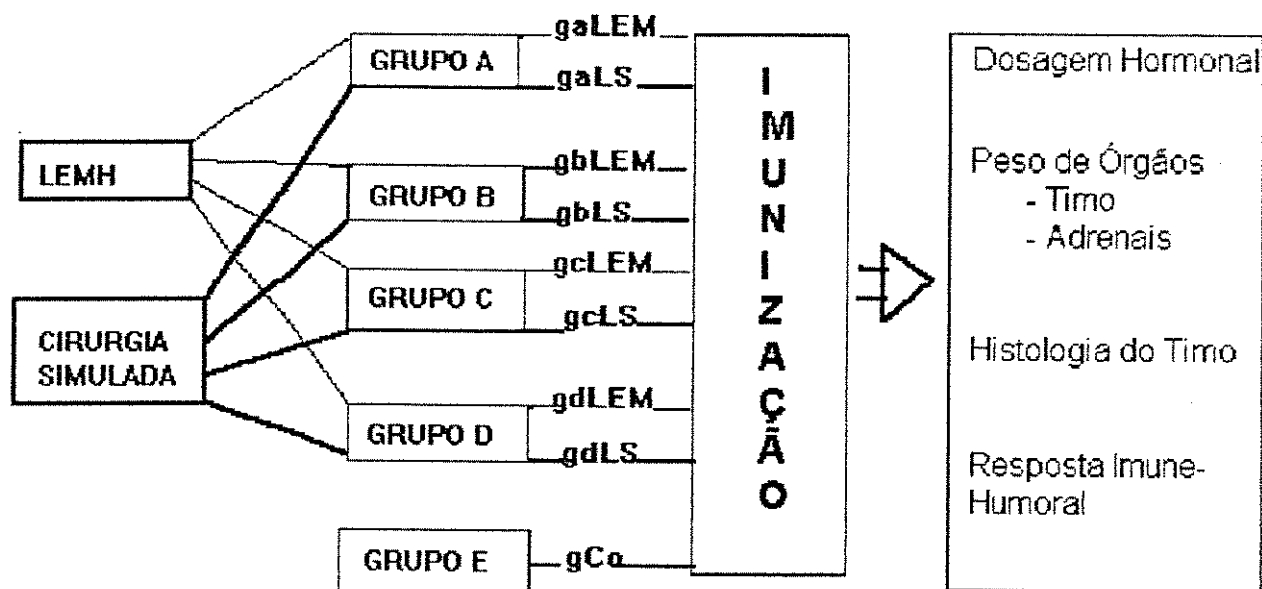


FIGURA 1: Representação esquemática do planejamento experimental: **GRUPO A:** anestesia com tiopental sódico (gaLS = cirurgia simulada; gaLEM = lesão da EMH), **GRUPO B:** anestesia com éter etílico (gbLS = cirurgia simulada; gbLEM = lesão da EMH), **GRUPO C:** anestesia com éter etílico + estresse osmótico (gcLS = cirurgia simulada; gcLEM = lesão da EMH), **GRUPO D:** anestesia com a associação de clorpromazina + meperidina + tiopental sódico (gdLS = cirurgia simulada; gdLEM = lesão da EMH) e **GRUPO E:** controle. EMH = Eminência Média Hipotalâmica.

3.2 - LESÃO DA EMINÊNCIA MÉDIA:

Os animais dos grupos lesados foram submetidos à estereotaxia e lesão, por eletrocoagulação, da eminência média hipotalâmica. Essa técnica consiste na implantação de um eletrodo, estereotaxicamente, na região da eminência média do hipotálamo e passagem de uma corrente contínua através do eletrodo ligado a um lesionador.

3.2.1) Procedimento cirúrgico:

Depois de anestesiado o animal foi tricotomizado na região da calota craniana. Em seguida foi posicionado e fixado no aparelho estereotáxico tipo David Kopff (Figura 2). Uma incisão longitudinal de aproximadamente 2cm foi efetuada na pele e tecido subcutâneo. Após hemostasia dos vasos o periósteo foi afastado, expondo-se o osso parietal. A partir disso localizou-se o bregma (ponto de intersecção entre as suturas sagital e coronal na convexidade craniana), o qual foi o ponto de referência zero para definir o local exato da lesão (Figura 3). Utilizando-se as escalas milimétricas do aparelho e seguindo-se as coordenadas extraídas do Atlas de PAXINOS & WATSON (1986) foram determinadas as posições de trepanação bilateral da calota craniana, para introdução

do eletrodo. Nesses locais, o osso do crânio foi perfurado com o auxílio de uma broca esférica de aço (Figura 4). De acordo com as coordenadas estereotáticas (2,56mm posterior ao bregma e 0,6mm bilateralmente à linha mediana) o eletrodo (0,5mm de diâmetro) foi introduzido através dos orifícios da trepanação na superfície da calota craniana (Figura 5), a uma profundidade de 9,5mm. As lesões foram produzidas por eletrocoagulação, induzida por uma corrente de 2 mA durante 10 segundos, com o eletrodo ligado ao lesionador. O eletrodo indiferente estava ligado à cauda do rato, para fechar o circuito. A pele foi suturada com fio de seda 3-0 (Ethicon). Os animais receberam uma dose de pentabiótico veterinário (Wyeth) i.m. no período pós-operatório imediato, e mais uma dose diária i.m. nos dois dias subsequentes. Utilizou-se os animais nos experimentos 4 dias após o procedimento cirúrgico.

Os animais com lesão cirúrgica simulada foram submetidos a um procedimento similar, com exceção de que o eletrodo foi introduzido somente 2mm no córtex cerebral, sem passagem de corrente elétrica.

Os animais com lesão da eminência média hipotalâmica apresentaram quadro clínico de diabetes insipidus transitório, que durou no máximo 72 horas.

3.2.2) Controle da localização e extensão da lesão:

A lesão foi verificada histologicamente nos cérebros congelados dos ratos lesados na eminência média hipotalâmica por seccionamento no plano coronal em histocriótomo. Depois de corados com hematoxilina-eosina (HE), os cortes histológicos de 50 μ m de espessura foram observados em lupa estereoscópica. A localização da lesão é mostrada de forma esquemática nas Figuras 6 (plano coronal) e 7 (plano sagital).

Os resultados obtidos com animais cujas lesões tenham excedido a região da eminência média do hipotálamo foram excluídos dos grupos.

3.3 - ESTRESSE OSMÓTICO

O estresse osmótico foi desencadeado pela ingestão crônica de salina hipertônica. Os grupos de animais que fizeram a ingestão de salina hipertônica, receberam salina na concentração de 2% nos bebedouros ao invés de água durante um período de doze dias antes da cirurgia. Através desse método o animal desenvolve um aumento significativo da osmolaridade plasmática, como descrito por JESSOP et al. (1990).

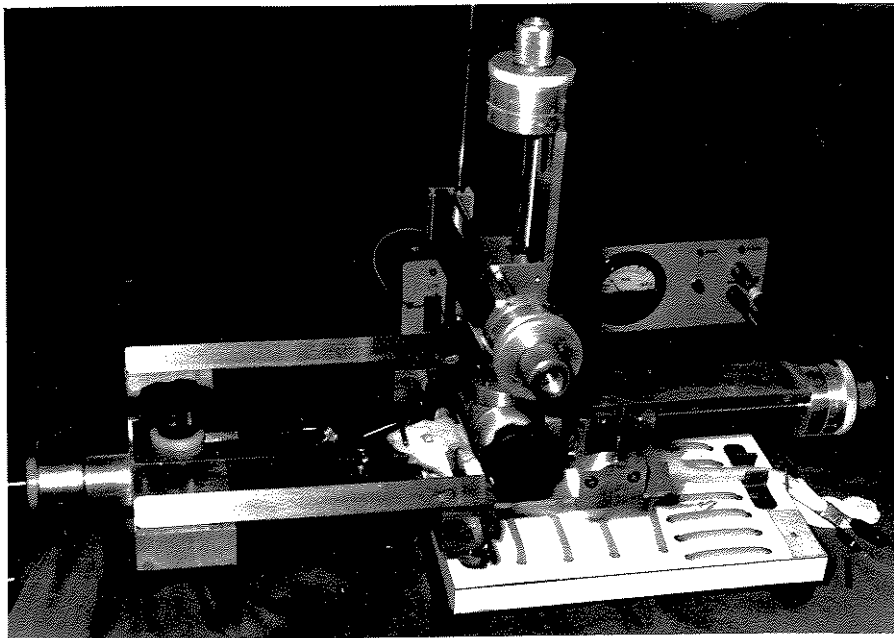


FIGURA 2: Posição do rato fixado no aparelho estereotático tipo David Kopf (A) para execução da lesão por eletrocoagulação, usando-se o eletrodo ligado ao aparelho lesionador (L). O eletrodo indiferente está ligado à cauda do rato (I), para fechar o circuito.

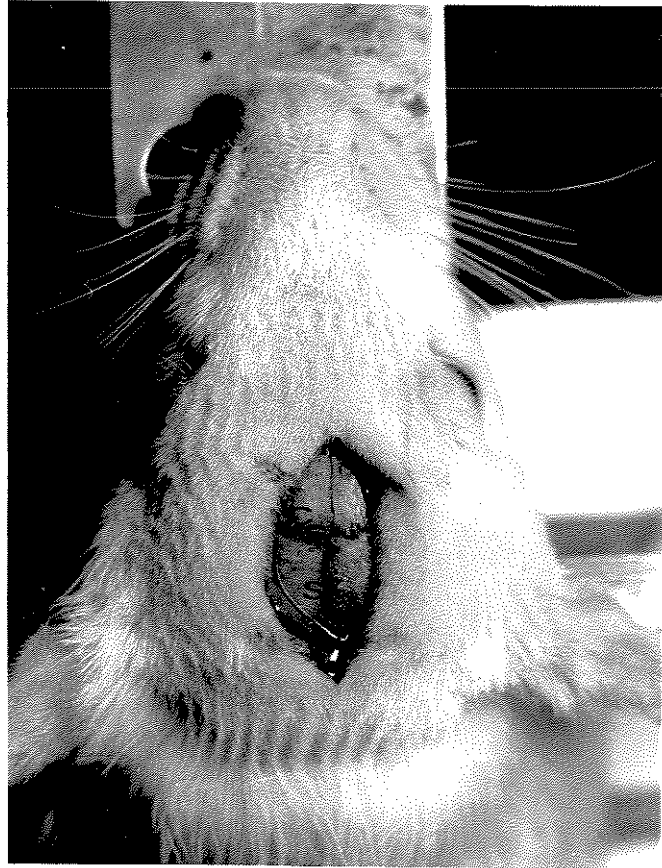


FIGURA 3: Localização do bregma, ponto de Intersecção entre as suturas coronal (C) e sagital (S).

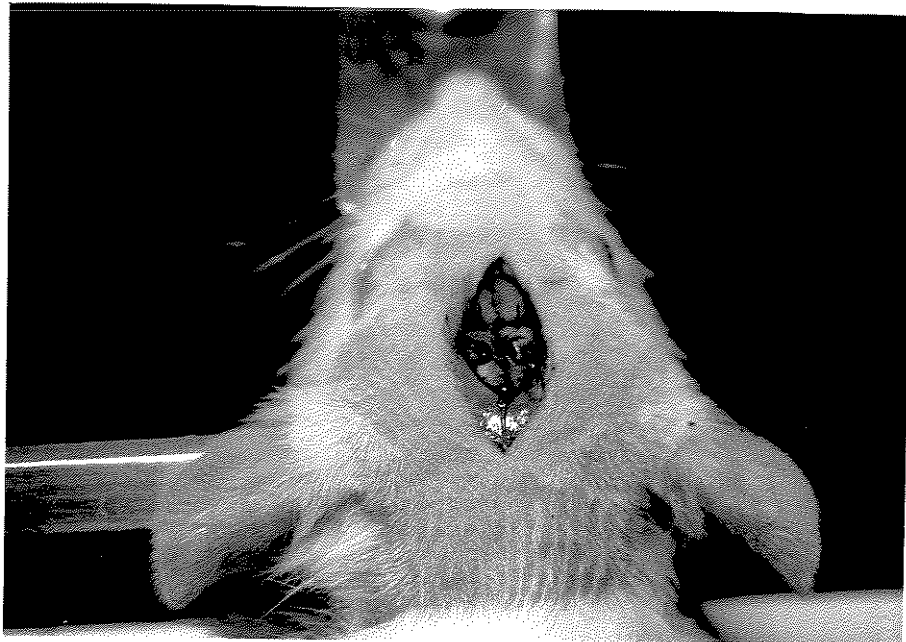


FIGURA 4: Trepanação bilateral (mostradas com as setas) da calota craniana para introdução do eletrodo.



FIGURA 5: Eletrodo introduzido, através dos orifícios da calota craniana, para lesão da eminência média do hipotálamo por eletrocoagulação. O posicionamento do eletrodo foi definido por medidas estereotáticas.

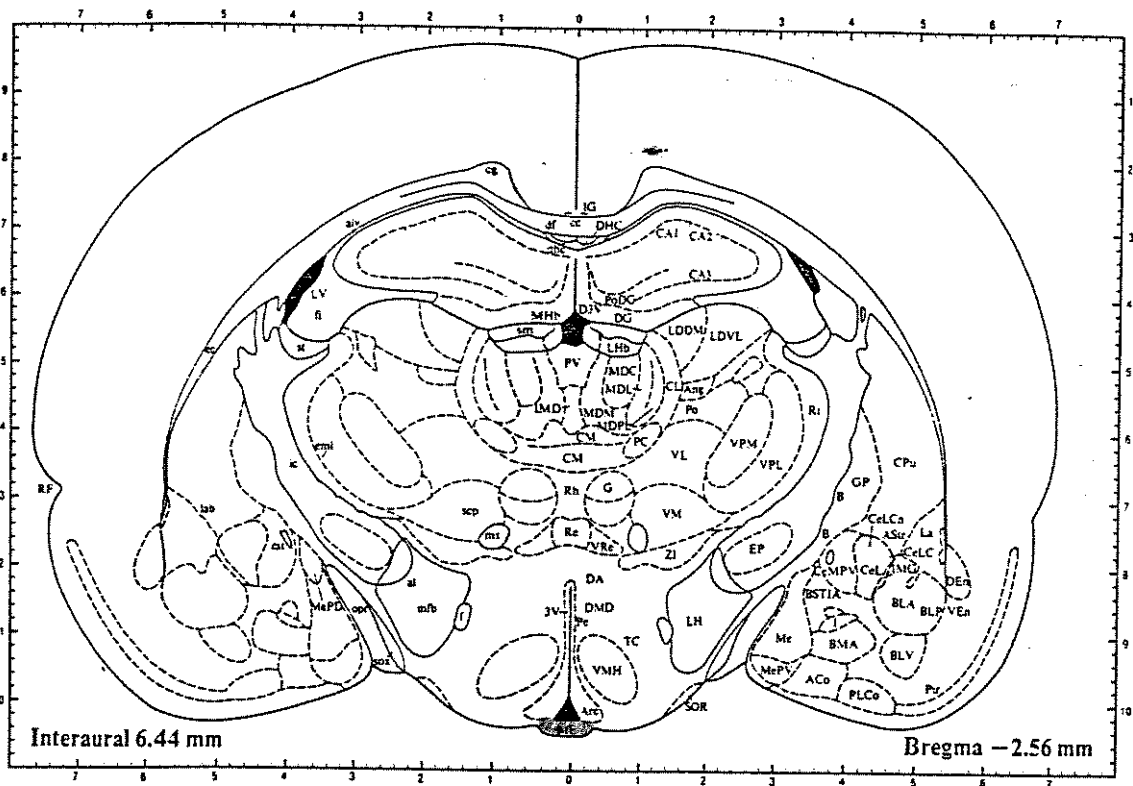


FIGURA 6: Representação esquemática da localização da lesão da eminência média do hipotálamo, em plano coronal. (ME = eminência média).

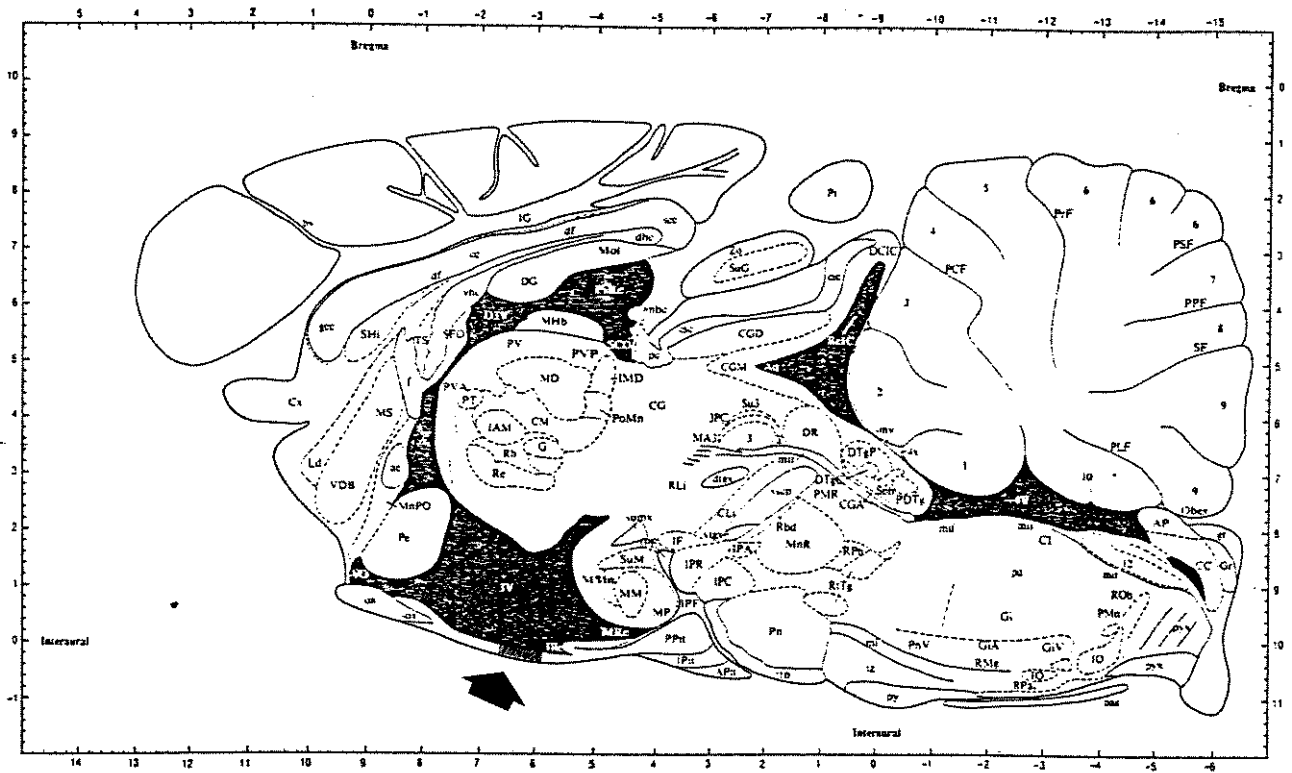


FIGURA 7: Representação esquemática da localização da lesão da eminência média do hipotálamo, em plano sagital. (ME = eminência média).

3.4 - PROCEDIMENTO ANESTÉSICO

No momento da cirurgia os ratos anestesiados com tiopental sódico receberam 70mg/kg de peso de tiopental (Cristália) pela via intraperitoneal. Os grupos de ratos anestesiados com éter etílico foram colocados em cubas de vidro, saturadas com vapor de éter etílico P.A. (Chemco) com tempo cronometrado (90 a 120 segundos) até a anestesia completa. Os animais que foram anestesiados com a associação de clorpromazina + meperidina + tiopental sódico, receberam 10mg/kg de ampicilil (Rhodia) + 20mg/kg de dolantina (Hoechst) + 30mg/kg de tiopental (Cristália) por via intraperitoneal, na sequência acima delineada com pequeno intervalo de tempo entre a administração de cada droga.

3.5 - SACRIFÍCIO

Os ratos foram decapitados por guilhotina, no laboratório experimental, no intervalo de 2 minutos após retirada do biotério anexo, para evitarem-se alterações dos níveis hormonais provocados por procedimentos potencialmente estressantes para os mesmos, tais como, manipulação, mudança de ambiente e

pressentimento de perigo. A variação do nível de corticosterona devido ao ritmo circadiano foi eliminada sacrificando-se os animais sempre no período matinal, entre 09h e 10h.

Depois da decapitação o sangue do tronco foi recolhido em tubos cônicos de vidro. Posteriormente foi centrifugado por 10 minutos a 2000 rpm. O soro obtido foi armazenado em freezer, a -20°C , até o momento da dosagem hormonal. Os cérebros dos ratos operados foram removidos e congelados a -20°C para análise histológica da localização e extensão da lesão. O timo de todos os ratos foi retirado para determinação do peso e posteriormente foi armazenado em frascos de vidro contendo formol a 10% para posterior análise histológica. As adrenais foram removidas de todos os ratos e pesadas. O baço de todos os ratos previamente imunizados com hemácias de carneiro foram retirados para a determinação do número de células formadoras de placas (CFP).

3.6 - ANÁLISE DO TIMO

3.6.1) Pesagem do órgão: Os timos removidos foram dissecados e separados do tecido conjuntivo adventicial e posteriormente pesados em balança de precisão equivalente a 0,01 mg. Os pesos são referidos em miligramas/100gramas de peso corporal do rato.

3.6.2) Histologia: Os timos foram retirados com muito cuidado para se evitar danos teciduais do parênquima do órgão, e imersos em solução de formalina a 10%, onde permaneceram até o início das demais etapas da técnica histológica de rotina para inclusão em parafina. Ao final do processo foram obtidos cortes histológicos de 6µm de espessura, os quais foram corados com hematoxilina-eosina (HE).

3.6.3) Análise morfométrica para a avaliação da fração de volume ocupada pelo estroma (tecido conjuntivo) e pelo parênquima como porcentagem do volume total do timo: É conceito básico da morfometria, teorema proposto por Delesse em 1848, que a fração de volume ocupada por um objeto é igual à sua fração de área em uma transecção, ou seja, fração de volume = fração de área (DELESSE, 1848 apud AHERNE, 1970). Assim, o volume relativo, significando uma fração de volume, é sempre representado por uma porcentagem.

A determinação da fração de área, em cortes histológicos, geralmente é feita com a utilização de um sistema-teste de pontos regularmente espaçados. Contando-se o número de pontos sobre o perfil de um determinado componente a ser medido, num objeto, e dividindo-se esse valor pelo número total de pontos que incidem sobre a transecção do objeto, ter-se-á a estimativa da fração de área do componente considerado.

A fração de volume ocupada pelo estroma e pelo parênquima tímico dos animais controle e dos animais dos diferentes grupos experimentais foi avaliada da maneira que se expõe a seguir.

Considerando-se:

P = número total de pontos (hits)

p = número de pontos (hits) que caem sobre determinado compartimento do órgão, no caso, estroma ou parênquima

Ppi = fração de volume

Então: Se em 10 campos microscópicos **p** for igual a 136 (número de pontos que caíram sobre o estroma do órgão) e **P** for igual a 2500 pontos, ter-se-á:

$$P_{pi} = \frac{p}{P} = \frac{136}{2500} = 0,05 \text{ ou } 5\%$$

A fração de volume ocupada pelo estroma conjuntivo neste exemplo foi de 5%.

Usando-se uma ocular morfométrica com retículo de

integração de 25 pontos, foram contados numa alíquota do órgão (10 campos microscópicos tomados ao acaso) os pontos que caíram sobre o estroma e o parênquima tímico, para cada um dos animais que compunham os diferentes grupos experimentais, bem como para o grupo controle, totalizando 2500 pontos por grupo.

- Avaliação do grau de precisão das estimativas da fração de volume ocupada pelo estroma e pelo parênquima como porcentagem do volume total do órgão. Para avaliar o grau de precisão das estimativas da fração de volume, utilizou-se a relação:

$$e = \sqrt{\frac{1 - P_{pi}}{P \cdot P_{pi}}}$$

Onde:

P_{pi} = Fração de volume referente à fração de volume em estudo.

P = Total de pontos sobre os componentes que forneceram a fração P_{pi} .

e = erro ou coeficiente de variação da média da proporção em estudo.

Para ilustrar o procedimento, apresenta-se o seguinte exemplo:

$P = 2334$ = número total de pontos em 10 campos microscópicos.

$p_1 = 1885$ = número de pontos sobre o parênquima tímico.

$p_2 = 449$ = número de pontos sobre o estroma do órgão.

Ppi_1 = fração de volume ocupada pelo parênquima tímico, que no caso é igual a :

$$\frac{1885}{2334} = 0,81 \text{ ou } 81\%$$

Ppi_2 = fração de volume ocupada pelo estroma, que no caso é igual a:

$$\frac{449}{2334} = 0,19 \text{ ou } 19\%$$

- Erro ou coeficiente de variação para o parênquima tímico:

$$e = \sqrt{\frac{1 - 0,81}{2334 \cdot 0,81}} = \sqrt{\frac{0,19}{1890,54}} = \sqrt{0,0001} = 0,01 = 1\%$$

- Erro ou coeficiente de variação para o estroma do órgão:

$$e = \sqrt{\frac{1 - 0,19}{2334 \cdot 0,19}} = \sqrt{\frac{0,81}{443,46}} = \sqrt{0,002} = 0,04 = 4\%$$

Em todos os grupos, os coeficientes de variação da média obtidos ficaram abaixo de 0,05 ou 5%.

3.7 - ANÁLISE DAS ADRENAIS

- Pesagem do órgão: As Adrenais removidas foram separadas do tecido conjuntivo adventicial e posteriormente pesadas em balança de precisão equivalente a 0,01 mg. Os pesos são referidos em miligramas/100gramas de peso corporal do rato.

3.8 - DOSAGEM DA CORTICOSTERONA PLASMÁTICA

O sangue coletado no dia do sacrifício foi centrifugado por 10 minutos a 2000 rpm, separando-se o soro que foi

armazenado -20°C até o momento da dosagem hormonal. A concentração plasmática de corticosterona foi determinada por radioimunoensaio (RIA). Esse 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 (^3H), pelo sítio de ligação com um anticorpo anti-corticosterona.

O complexo antígeno-anticorpo é precipitado, separado das formas livres, e a radioatividade medida em um contador de radiação beta. 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 conhecidos, relacionando assim, radiação expressa em CPM por concentração em ng/ml. A variação das concentrações dos padrões usados por nós foram 0.1, 0.5, 2.5, 10, 50 e 250 ng/ml.

O coeficiente de variação entre os diferentes RIA foi de 11,56% e o coeficiente de variação intra-ensaio de 4,01%.

3.9 - IMUNIZAÇÃO

Cada rato foi imunizado com 5×10^9 hemácias de carneiro (HC) diluídas em 1ml de solução fisiológica, injetado por via intraperitoneal. As hemácias foram colhidas, assepticamente, em solução de Alsever e mantidas em geladeira por não mais do que 8 dias. Depois de lavadas por três vezes em solução fisiológica preparou-se a suspensão a ser inoculada. O processo de lavagem das hemácias consiste em se colocar um volume adequado da solução de hemácias de carneiro + Alsever dentro de um tubo de ensaio resistente e preencher com solução fisiológica. Agita-se, suavemente, e centrifuga-se a 2000 rpm durante 10 minutos, a 4°C. Depois de centrifugado, aspira-se o sobrenadante, acrescenta-se solução fisiológica novamente e ressuspende-se o precipitado no fundo do tubo, cuidadosamente para não hemolisar. Centrifuga-se novamente e repete-se essa operação mais uma vez. Após a terceira centrifugação, aspira-se o sobrenadante permanecendo no fundo do tubo apenas as células (concentrado de hemácias) lavadas. A concentração da suspensão das hemácias de carneiro a serem inoculadas é definida através da contagem das hemácias diluídas em câmara de Neubauer (Hemocitômetro de Neubauer).

Os animais submetidos à lesão cirúrgica simulada ou à lesão da eminência média hipotalâmica foram imunizados 4 dias após o procedimento cirúrgico. Os animais do grupo controle foram

imunizados 11 dias após colocados em gaiola individual, perfazendo o mesmo período de permanência em isolamento individual para todos os grupos.

3.10 - RESPOSTA IMUNE-HUMORAL

A resposta de anticorpos contra hemácia de carneiro foi avaliada nos diferentes grupos de animais pelo método de Células Formadoras de Placas (CFP) direto, descrito por JERNE et al. (1974) e modificada por DRESSER (1978).

3.10.1) Determinação do número de células formadoras de placas: Os animais foram sacrificados 5 dias após a imunização, sendo removido o baço de cada animal. As células esplênicas foram liberadas em meio mínimo essencial (MME) contendo 1% de soro bovino fetal (SBF), utilizando-se homogeinizador manual de vidro. As células, após serem lavadas 3 vezes, foram ressuspensas em 3ml de MME e a partir dessa suspensão foram feitas diluições de 1/40 e 1/80. Em tubos de vidro de 30 x 5 mm foram pipetados 50 µl destas diluições, em duplicata, juntamente com 50 µl de suspensão de hemácias de carneiro. Esses tubos foram transferidos para banho-maria a 42°C, adicionando-se 200 µl de agarose a 0,8% em MME sem SBF. O conteúdo do tubo foi homogeinizado e disposto em

lâminas de vidro colocadas sobre placa aquecida à temperatura de 42°C. Após solidificação as lâminas foram colocadas invertidas em câmaras acrílicas apropriadas e incubadas em estufa úmida a 37°C por duas horas. As câmaras foram então preenchidas com soro de cobaia (complemento) adsorvido com hemácias de carneiro e diluído na proporção 1:10 em tampão barbitol. As câmaras foram incubadas novamente em estufa a 37°C pelo período de 1 hora e depois fixadas com paraformaldeído 4% em solução balanceada de fosfato (PBS), durante 20 minutos. Pela observação em lupa estereoscópica, foram contadas nas lâminas as regiões de halo ou placa de hemólise, correspondente à localização de um linfócito secretor de anticorpo.

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

3.11 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação estatística entre as médias das variáveis foi determinada usando-se os testes de Wilcoxon e Kruskal-Wallis. O teste de Wilcoxon foi utilizado para comparação entre dois grupos. Para mais de dois grupos foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, que é uma generalização do primeiro (NOETHER, 1990).

Na avaliação de mais de dois grupos entre si, quando o resultado foi significativo, aplicou-se o método de comparações múltiplas de Kruskal-Wallis para se detectar onde se encontravam as diferenças entre os grupos (NOETHER, 1990).

4. RESULTADOS

4.1) DOSAGEM HORMONAL

A dosagem dos hormônios glicocorticóides é frequentemente usada como parâmetro para determinar a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal em modelos experimentais (FRANZMANN et al, 1975; JOHNSTON & BUCKLAND, 1976; LEACH, 1982). A dosagem desse hormônio auxilia, também, na aferição da eficácia funcional da lesão da eminência média hipotalâmica, uma vez que a destruição dessa estrutura bloqueia a ação dos fatores hipotalâmicos sobre a hipófise (OOKI et al, 1973).

4.1.1) Efeitos da lesão da eminência média hipotalâmica:

A Figura 8 mostra que, independentemente do agente anestésico utilizado, todos os grupos de animais submetidos à lesão da eminência média hipotalâmica apresentaram uma redução significativa ($p < 0.05$) dos níveis plasmáticos de corticosterona em relação aos grupos de animais que se submeteram à lesão cirúrgica simulada, bem como ao grupo controle (utilizado como nível basal em nosso modelo experimental). Esses dados demonstram que a integridade da eminência média hipotalâmica é fundamental para a atividade normal do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, assim como fornece um parâmetro funcional da eficácia da lesão cirúrgica dessa estrutura em nosso modelo experimental.

4.1.2) Efeitos dos agentes anestésicos:

Na Tabela 1 observa-se que os grupos de animais submetidos à lesão cirúrgica simulada e anestesiados com tiopental sódico (gaLS) ou anestesiados com éter etílico e expostos ao estresse osmótico (gcLS) não apresentaram diferença significativa nos níveis plasmáticos de corticosterona em relação grupo controle (gCo). Por outro lado, os grupos de animais com cirurgia simulada e anestesiados com éter etílico (gbLS) ou com a associação de clorpromazina + meperidina + tiopental sódico (gdLS) apresentaram um aumento significativo ($p < 0.05$) nos níveis de corticosterona circulantes em relação ao grupo controle (Tabela 1).

Corticosterona Plasmática

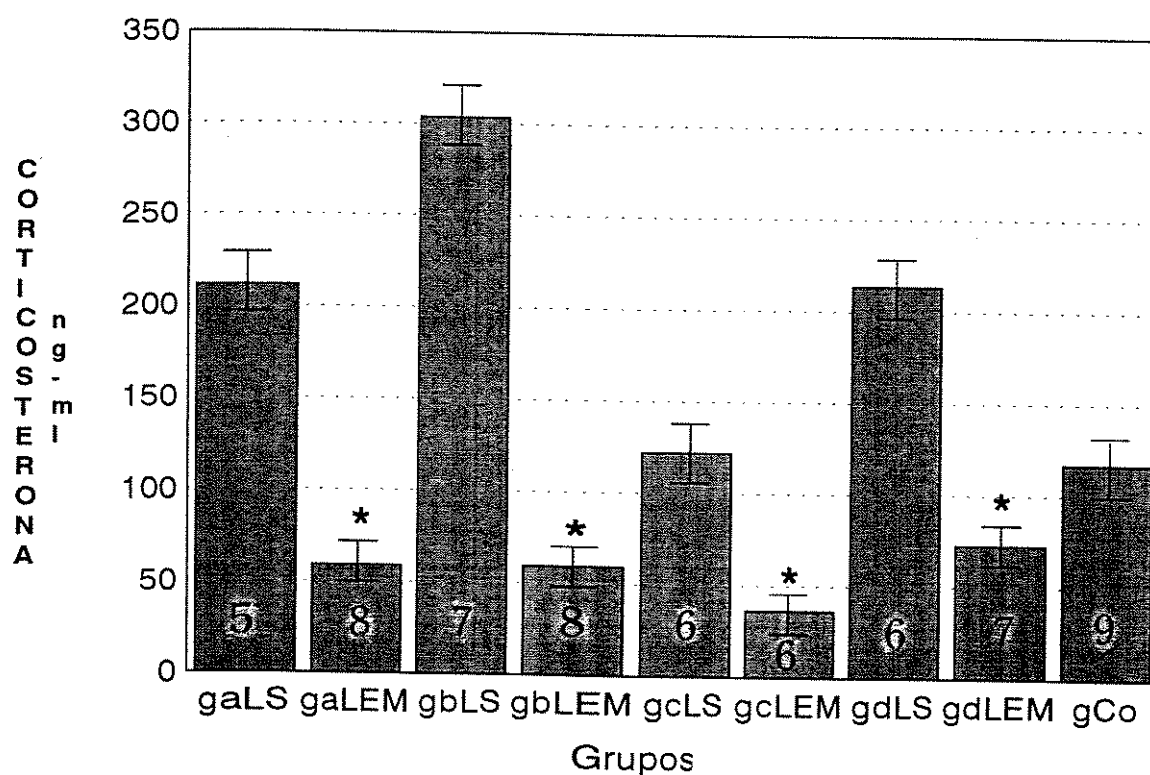


FIGURA 8: Concentração plasmática de corticosterona no grupo controle (gCo) e nos diferentes grupos experimentais, anestesiados com tiopental sódico: lesão simulada (gaLS) ou lesão da EMH (gaLEM); com éter etílico: lesão simulada (gbLS) ou lesão da EMH (gbLEM); com éter etílico + estresse osmótico: lesão simulada (gcLS) ou lesão da EMH (gcLEM); e com a associação de clorpromazina + meperidina + tiopental sódico: lesão simulada (gdLS) ou lesão da EMH (gdLEM).

Os resultados representam a média $\pm$ EPM dos valores do nível plasmático de corticosterona do número de ratos mostrados na base da coluna.

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (gCo).

TABELA 1: Concentração plasmática de corticosterona no grupo controle (gCo) e nos grupos de animais submetidos à lesão cirúrgica simulada e anestesiados com tiopental sódico (gaLS); com éter etílico (gbLS); com éter etílico + estresse osmótico (gcLS); e com a associação de clorpromazina + meperidina + tiopental sódico (gdLS).

GRUPO		Concentração Plasmática de Corticosterona (ng/ml)
gCo	(n=9)	117,10 $\pm$ 17,78
gaLS	(n=5)	211,57 $\pm$ 22,95
gbLS	(n=7)	303,53 $\pm$ 33,86*
gcLS	(n=6)	122,01 $\pm$ 10,84
gdLS	(n=6)	213,69 $\pm$ 34,25*

Os resultados representam a média $\pm$ EPM dos valores do nível plasmático de corticosterona.

(n= número de ratos)

*p<0,05 em relação ao grupo controle

A análise dos grupos de animais submetidos à lesão cirúrgica simulada, enfocando o agente anestésico utilizado (Tabela 1), mostrou que os grupos gbLS (anestesiados com éter etílico) e gdLS (anestesiados com clorpromazina + meperidina + tiopental sódico) apresentaram aumento significativo ($p < 0.05$) dos níveis de corticosterona plasmática em relação ao grupo gcLS (anestesiados com éter etílico e expostos ao estresse osmótico crônico). Os animais do grupo gaLS (anestesiados com tiopental sódico) apresentaram valores de corticosterona plasmática maiores que os do grupo gcLS, entretanto, não há significância estatística nessa diferença (Tabela 1).

4.2) TIMO

O timo é um órgão linfóide primário responsável pela maturação das células linfóides originárias da medula óssea e pelo repovoamento dos órgãos linfóides secundários como o baço e os linfonodos. Quando submetidos a vários tipos de situações estressantes, os camundongos e ratos apresentam lesões timo-atróficas com reações imunossupressivas (HADLER, 1987). Uma das vias pela qual as situações estressantes podem afetar o parênquima tímico é através dos glicocorticóides, uma vez que frente aos

estímulos estressantes, o timo sofre involução estrutural provocada pelos glicocorticóides (CLAMAN, 1988). Por outro lado, a involução do timo, após os animais experimentais terem sido submetidos a atos cirúrgicos no sistema nervoso central, tem sido relatado com frequência na literatura (YAMADA & GREER, 1959). Outro fator importante que pode provocar alterações tímicas é o uso de drogas, que podem agir direta ou indiretamente no órgão. Visando esclarecer o papel da lesão da eminência média hipotalâmica, bem como os efeitos de algumas drogas anestésicas sobre o timo utilizaram-se como parâmetros, em nosso modelo experimental, o peso do timo e um método morfométrico que permitiu a avaliação da fração de volume ocupada pelo parênquima e pelo estroma tímico nos diferentes grupos experimentais.

4.2.1) Peso do Timo

Enfatizando o aspecto da lesão cirúrgica da eminência média hipotalâmica nos diferentes grupos em relação ao peso do timo, observou-se que com exceção dos grupos de animais anestesiados com tiopental sódico (gaLS e gaLEM), em todos os demais grupos ocorreu uma redução do peso do timo nos animais submetidos à lesão da eminência média (gbLEM; gcLEM e gdLEM) em relação aqueles animais lesão simulada (gbLS; gcLS e gdLS, respectivamente). Entretanto, quando comparados com o grupo controle (gCo) todos os grupos, independentemente do agente

anestésico do procedimento cirúrgico empregados, apresentaram uma importante redução ($p < 0,05$) do peso tímico, como demonstrado na Figura 9. Entre os animais submetidos à lesão cirúrgica simulada, verificou-se que o grupo gaLS (anestesiado com tiopental sódico) apresentou o peso relativo do timo significativamente superior ($p < 0,05$) aos grupos gbLS, gcLS e gdLS. Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa no peso relativo do timo, entre os grupos gbLS, gcLS e gdLS.

Na Tabela 2 observa-se que não houve diferença no peso tímico entre os animais anestesiados com tiopental sódico e submetidos à lesão cirúrgica simulada (gaLS) ou à lesão da eminência média hipotalâmica (gaLEM). Entretanto, quando o agente anestésico utilizado foi o éter etílico, verificou-se uma redução significativa do peso do timo ($p < 0,05$) no grupo de animais lesados na eminência média hipotalâmica (gbLEM) em relação ao grupo de animais com lesão simulada (gbLS), como demonstrado na Tabela 3.

Peso relativo do timo

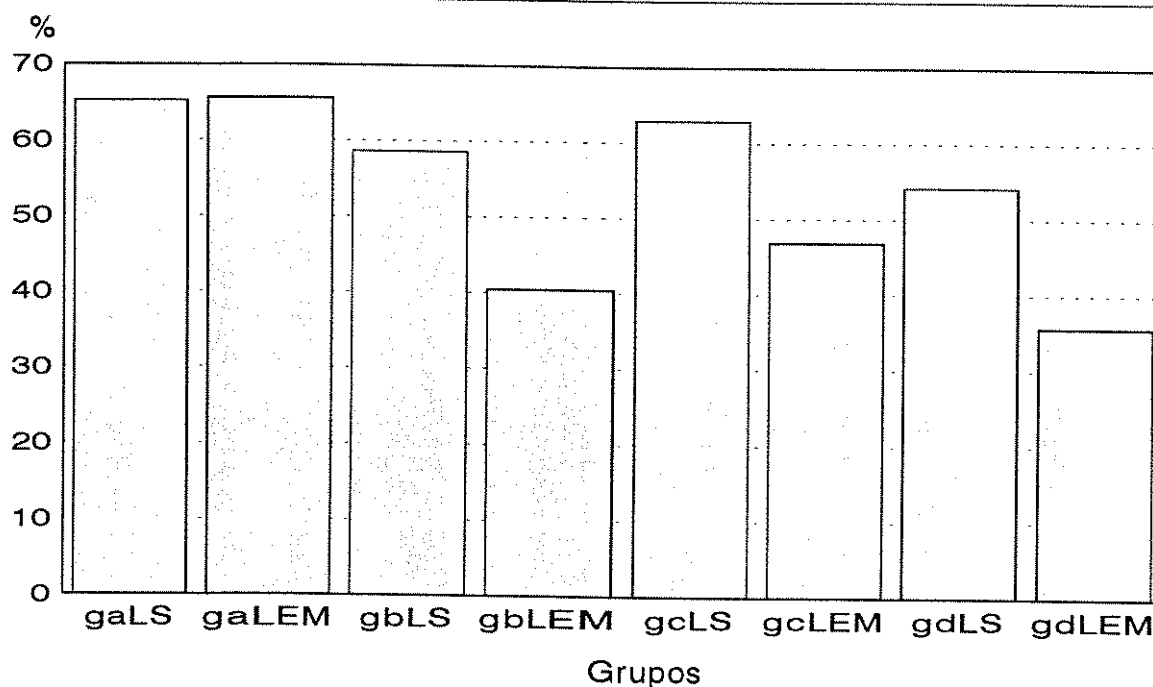


FIGURA 9 - Peso do timo dos grupos submetidos à lesão cirúrgica simulada e anestesiados com tiopental sódico (gaLS), éter etílico (gbLS), éter etílico + estresse osmótico (gcLS) e com a associação de clorpromazina + meperidina + tiopental sódico (gdLS); e dos grupos submetidos à lesão da EMH e anestesiados com tiopental sódico (gaLEM), éter etílico (gbLEM), éter etílico + estresse osmótico (gcLEM) e com a associação de clorpromazina + meperidina + tiopental sódico (gdLEM), expresso em porcentagem, relativos ao grupo controle (gCo). EMH = eminência média hipotalâmica.

TABELA 2: Peso relativo do timo e das adrenais dos grupos de animais anestesiados com tiopental sódico e submetidos à lesão cirúrgica simulada (gaLS) ou submetidos à lesão da eminência média hipotalâmica (gaLEM).

GRUPOS peso dos órgãos (mg/100 gramas de peso corporal)

	TIMO	ADRENAIS
gaLS (n=5)	125.19 $\pm$ 6.31	18.58 $\pm$ 0.67
gaLEM (n=8)	125.94 $\pm$ 5.44	19.86 $\pm$ 0.64

**Os resultados representam a média $\pm$ EPM.
(n=número de ratos)**

TABELA 3: Peso relativo do timo e das adrenais dos grupos de animais anestesiados com éter etílico e submetidos à lesão cirúrgica simulada (gbLS) ou submetidos à lesão da eminência média hipotalâmica (gbLEM).

GRUPOS	peso dos órgãos (mg/100 gramas de peso corporal)	
	TIMO	ADRENAIS
gbLS (n=7)	112.53 $\pm$ 6.23	19.81 $\pm$ 0.71
gbLEM (n=8)	77.67 $\pm$ 6.22*	18.85 $\pm$ 0.55

Os resultados representam a média $\pm$ EPM.

(n=número de ratos)

*p<0,05 em relação ao grupo gbLS

Nos animais submetidos ao estresse osmótico antes da cirurgia e anestesiados com éter etílico, observou-se que o grupo com lesão da eminência média hipotalâmica (gcLEM) apresentou uma redução no peso do timo em relação ao grupo submetido à lesão cirúrgica simulada (gcLS), sendo essa diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$), Tabela 4.

Na Tabela 5, verifica-se a redução significativa do peso tímico ($p < 0.05$) nos animais anestesiados com a associação de clorpromazina + meperidina + tiopental sódico quando submetidos à lesão da eminência média hipotalâmica (gdLEM) em relação aos animais do mesmo grupo submetidos à lesão cirúrgica simulada (gdLS).

TABELA 4: Peso relativo do timo e das adrenais dos grupos de animais que fizeram a ingestão de salina hipertônica durante doze dias (estresse osmótico), anestesiados com éter etílico e submetidos à lesão cirúrgica simulada (gcLS) ou submetidos à lesão da eminência média hipotalâmica (gcLEM).

GRUPOS	peso dos órgãos (mg/100 gramas de peso corporal)	
	TIMO	ADRENAIS
gcLS (n=6)	120,80 $\pm$ 4,34	17,95 $\pm$ 0,48
gcLEM (n=6)	90,01 $\pm$ 5,73*	19,53 $\pm$ 1,57

**Os resultados representam a média $\pm$ EPM.
(n=número de ratos)**

***p<0,05 em relação ao grupo gcLS**

TABELA 5: Peso relativo do timo e das adrenais dos grupos de animais anestesiados com a associação de clorpromazina + meperidina + tiopental sódico submetidos à lesão cirúrgica simulada (gdLS) ou submetidos à lesão da eminência média hipotalâmica (gdLEM).

GRUPOS peso dos órgãos (mg/100 gramas de peso corporal)

		TIMO	ADRENAIS
gdLS	(n=6)	104,12 $\pm$ 6,83	18,93 $\pm$ 0,76
gdLEM	(n=7)	68,57 $\pm$ 5,43*	18,62 $\pm$ 0,49

Os resultados representam a média $\pm$ EPM.
(n=número de ratos)

*p<0,05 em relação ao grupo gdLS

4.2.2) Análise Morfométrica do Timo

A partir da avaliação da fração de volume ocupada pelo parênquima tímico e pelo estroma de sustentação desse órgão (tecido conjuntivo) nos diferentes grupos de animais, conseguiu-se determinar a intensidade das alterações tímicas, pois essa análise morfométrica permitiu aferir o grau de fibrose ocorrida no timo, em consequência dos diferentes tipos de procedimentos experimentais.

A Tabela 6 mostra o percentual de parênquima e estroma do timo nos diversos grupos experimentais analisados. Como parâmetro basal se utilizou o grupo controle (gCo), que apresentou 93,6% de parênquima e 6,4% de estroma. Como viu-se na Figura 9, todos os grupos experimentais submetidos à lesão cirúrgica simulada ou à lesão da eminência média hipotalâmica, independente do agente anestésico utilizado, apresentaram redução do peso tímico em relação ao grupo controle, sendo esta redução maior ou menor, dependendo do grupo avaliado. Com a análise morfométrica pôde-se determinar em que grau as alterações tímicas ocorridas nos diversos grupos afetaram o parênquima do órgão com destruição dos timócitos e consequente substituição por tecido fibroso.

No grupo de animais anestesiados com tiopental sódico verificou-se que com a lesão cirúrgica simulada (gaLS) não houve alteração na proporção do parênquima e do estroma tímico em

relação ao grupo controle (gCo). Nos animais submetidos à lesão da eminência média hipotalâmica (gaLEM) houve um aumento não significativo estatisticamente de estroma (8%) em relação ao grupo controle (6,4%), como demonstrado na Tabela 6.

Os animais submetidos à lesão cirúrgica simulada anestesiados com éter etílico (gbLS) ou éter etílico + estresse osmótico (gcLS) não apresentaram modificações significativas na proporção do parênquima e do estroma do timo em relação ao grupo controle (gCo). O mesmo ocorreu com os animais que utilizaram esses mesmos agentes anestésicos, submetidos à lesão da eminência média hipotalâmica (gbLEM e gcLEM, respectivamente), que apresentaram uma redução parenquimatosa, estatisticamente não significativa, em relação ao grupo controle (Tabela 6).

Por outro lado, quando o agente anestésico utilizado foi a associação de clorpromazina + meperidina + tiopental sódico, tanto os animais com lesão cirúrgica simulada (gdLS) quanto os animais submetidos à lesão da eminência média hipotalâmica (gdLEM) apresentaram redução significativa ($p < 0,05$) do parênquima tímico em relação ao grupo controle (Tabela 6).

Na Figura 10 verifica-se que, dos animais com lesão cirúrgica simulada, somente os anestesiados com a associação de clorpromazina + meperidina + tiopental sódico apresentaram redução significativa do parênquima tímico em relação ao grupo controle. Resultados similares foram obtidos, quando analisaram-se os animais submetidos à lesão da eminência média hipotalâmica, em relação ao grupo controle (Figura 11).

TABELA 6: Fração de volume ocupada pelo parênquima e pelo estroma do timo, obtidos por método morfométrico, no grupo controle (gCo), e nos grupos com lesão cirúrgica simulada e anestesiados com tiopental sódico (gaLS), éter etílico (gbLS), éter etílico + estresse osmótico (gcLS) e com a associação de clorpromazina + meperidina + tiopental sódico (gdLS); e dos grupos submetidos à lesão da EMH e anestesiados com tiopental sódico (gaLEM), éter etílico (gbLEM), éter etílico + estresse osmótico (gcLEM) e com a associação de clorpromazina + meperidina + tiopental sódico (gdLEM). EMH = eminência média hipotalâmica.

GRUPO	PARÊNQUIMA	ESTROMA
gCo	93.6%	6.4%
gaLS	94%	6%
gaLEM	92%	8%
gbLS	95%	5%
gbLEM	91%	9%
gcLS	94%	6%
gcLEM	91%	9%
gdLS*	89.5%	10.5%
gdLEM*	80.4%	19.6%

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (gCo).

Fração de Volume ocupada pelo Estroma e pelo Parênquima Tímico

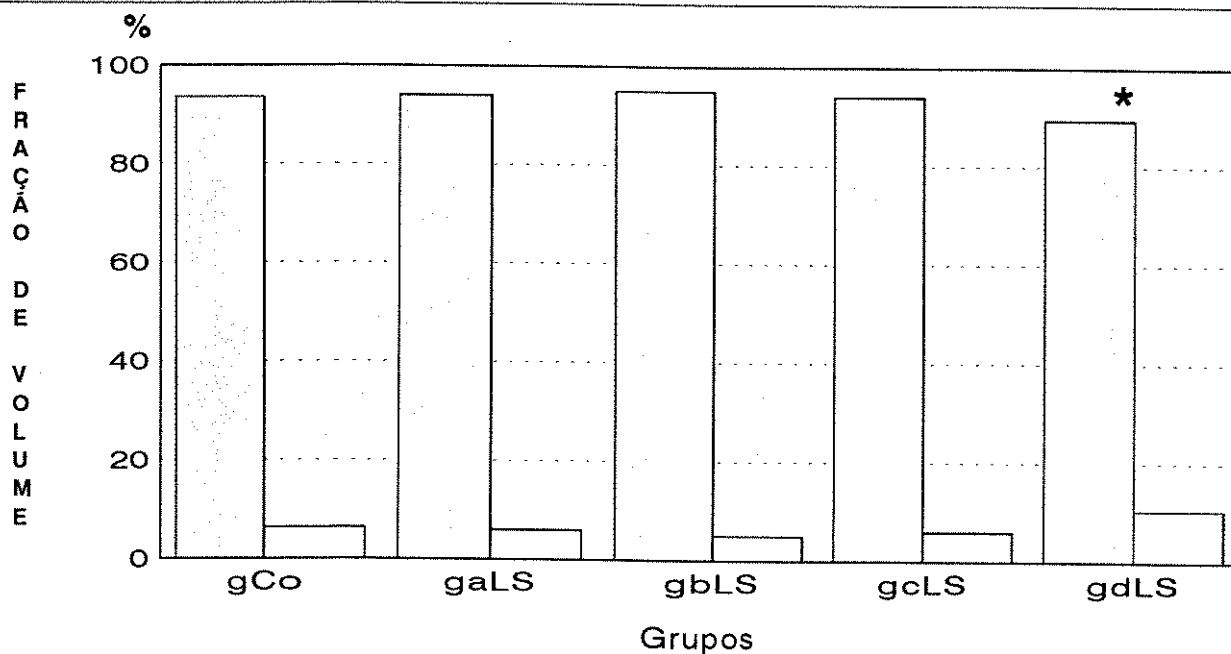


FIGURA 10: Fração de volume ocupada pelo parênquima e pelo estroma do timo nos animais do grupo controle (gCo) e nos animais submetidos à lesão cirúrgica simulada e anestesiados com: gaLS (tiopental sódico); gbLS (éter etílico); gcLS (éter etílico + estresse osmótico); e gdLS (clorpromazina + meperidina + tiopental sódico).

* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (gCo).

Fração de Volume ocupada pelo Estroma e pelo Parênquima Tímico

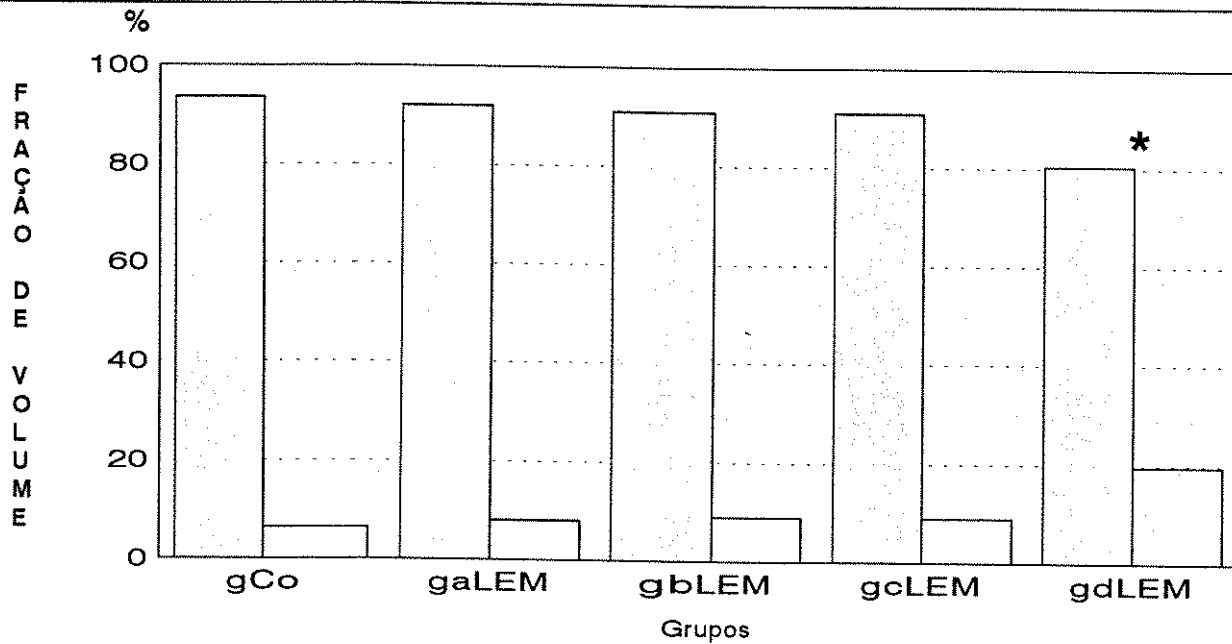


FIGURA 11: Fração de volume ocupada pelo parênquima e pelo estroma do timo nos animais do grupo controle (gCo) e nos animais submetidos à lesão da eminência média hipotalâmica e anestesiados com: gaLEM (tiopental sódico); gbLEM (éter etílico); gcLEM (éter etílico + estresse osmótico); e gdLEM (clorpromazina + meperidina + tiopental sódico).

*** $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (gCo).**

Entretanto, quando a comparação foi feita entre os diferentes grupos enfatizando a lesão da eminência média hipotalâmica verificou-se que, com exceção dos grupos de animais em que o agente anestésico foi o tiopental sódico onde não houve diferença significativa entre os animais submetidos à cirurgia simulada (gaLS) e os animais com lesão da eminência média hipotalâmica (gaLEM), todos os demais grupos com lesão da eminência média (gbLEM, gcLEM e gdLEM) apresentaram redução proporcional significativa ($p < 0,05$) do parênquima tímico em relação aos grupos com cirurgia simulada (gbLS, gcLS e gdLS, respectivamente), como mostrado na Tabela 6. A redução proporcional do parênquima tímico foi mais evidente nos animais anestesiados com a associação de clorpromazina + meperidina + tiopental sódico, em relação aos demais grupos (Tabela 6).

A Figura 12 mostra o aspecto histológico do timo normal (grupo controle). Nas figuras 13, 14 e 15 são mostradas as alterações histológicas do timo induzidas pelos diferentes procedimentos experimentais.



FIGURA 12: Timo normal de rato controle. Notar os lóbulos tímicos separados por finos septos de tecido conjuntivo (setas). Em cada lóbulo tímico pode-se observar a nítida distinção entre o cortex (mais escuro) e a medula (mais clara). H.E. 32X

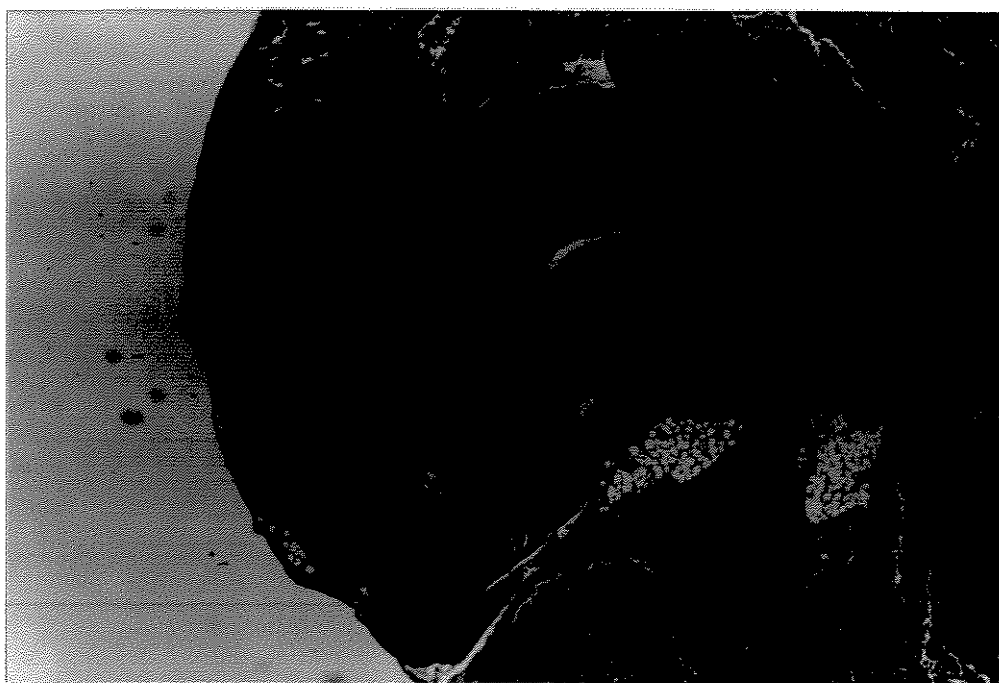


FIGURA 13: Timo de rato do grupo gdLEM (anestesiado com a associação de clorpromazina + meperidina + tiopental sódico e submetidos à lesão da eminência média Hipotalâmica). Observar o aumento acentuado do componente fibroso (fibrose) com consequente diminuição dos lóbulos tímicos. Nestes, pode-se notar a perda da distinção entre a região cortical e medular, e, ainda, uma rarefação celular, em relação ao animal controle. H.E. 32X.

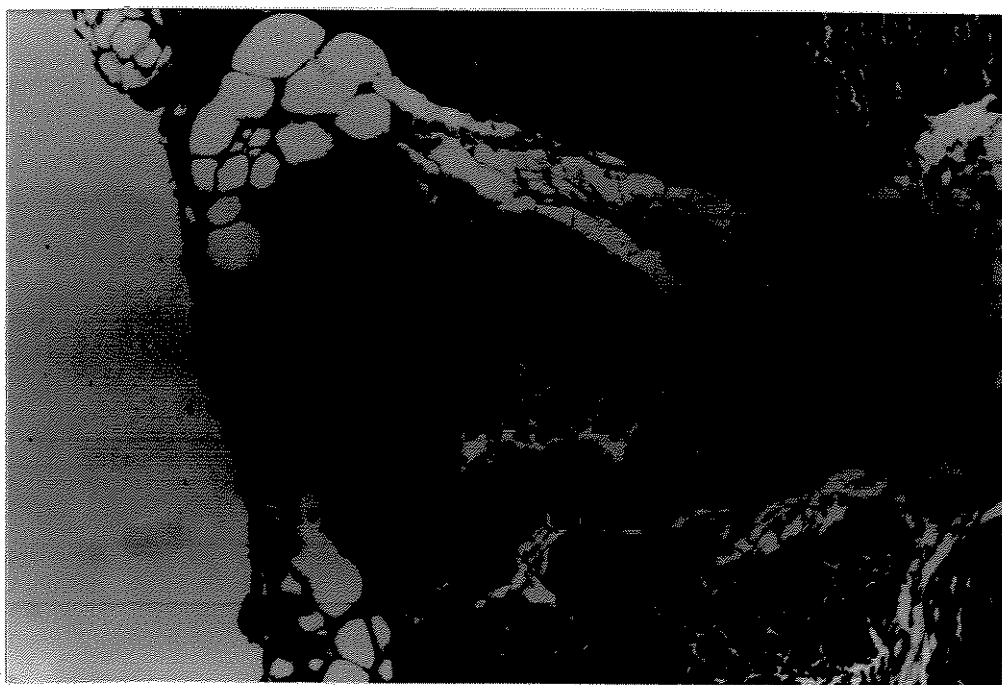


FIGURA 14: Timo de rato do grupo gdLEM (anestesiado com a associação de clorpromazina + meperidina + tiopental sódico e submetidos à lesão da eminência média Hipotalâmica). Nas porções superior e inferior, pode-se observar parte de dois lóbulos tímicos. Na região central, nota-se um lóbulo tímico de tamanho bastante reduzido e apresentando áreas de necrose (N) e áreas de fibrose (F). Entre os lóbulos notam-se áreas claras maiores com poucas fibras colágenas (fibrose incipiente). H.E. 128X

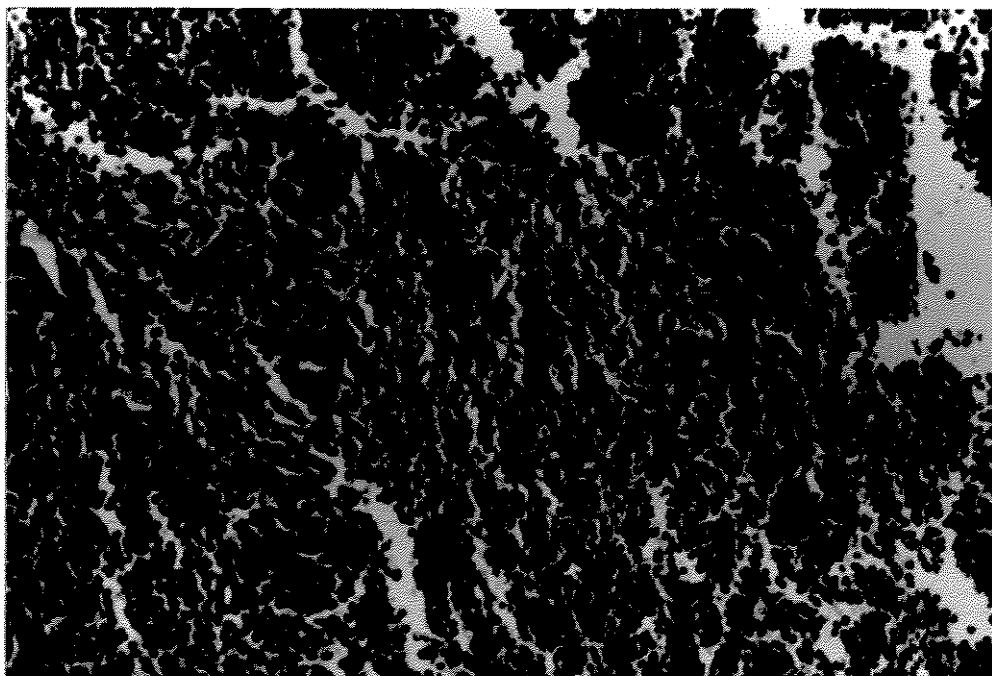


FIGURA 15: Timo de rato do grupo gdLEM (anestesiado com a associação de clorpromazina + meperidina + tiopental sódico e submetidos à lesão da eminência média Hipotalâmica). Observa-se a região central de um lóbulo tímico apresentando expressiva quantidade de fibras colágenas e linfócitos degenerados. Na região periférica do lóbulo (P), nota-se maior quantidade de linfócitos em vias de degeneração. H.E. 250X.

4.3) ADRENAIS

As glândulas adrenais são o órgão alvo do eixo hipotálamo-hipófise-ACTH. Os hormônios glicocorticóides são sintetizados e liberados pela córtex adrenal sempre que esse eixo for estimulado. No presente trabalho, utilizou-se o peso desse órgão como parâmetro auxiliar na aferição da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal.

4.3.1) PESO DAS ADRENAIS

As Tabelas 2, 3, 4 e 5 mostram o peso das glândulas adrenais nos diferentes grupos experimentais estudados. A Figura 16 mostra a comparação percentual do peso das glândulas adrenais dos vários grupos experimentais relativamente ao grupo controle. Verificou-se que não há diferença estatística entre os grupos relacionados entre si, e nem com o grupo controle.

Peso Relativo das Adrenais

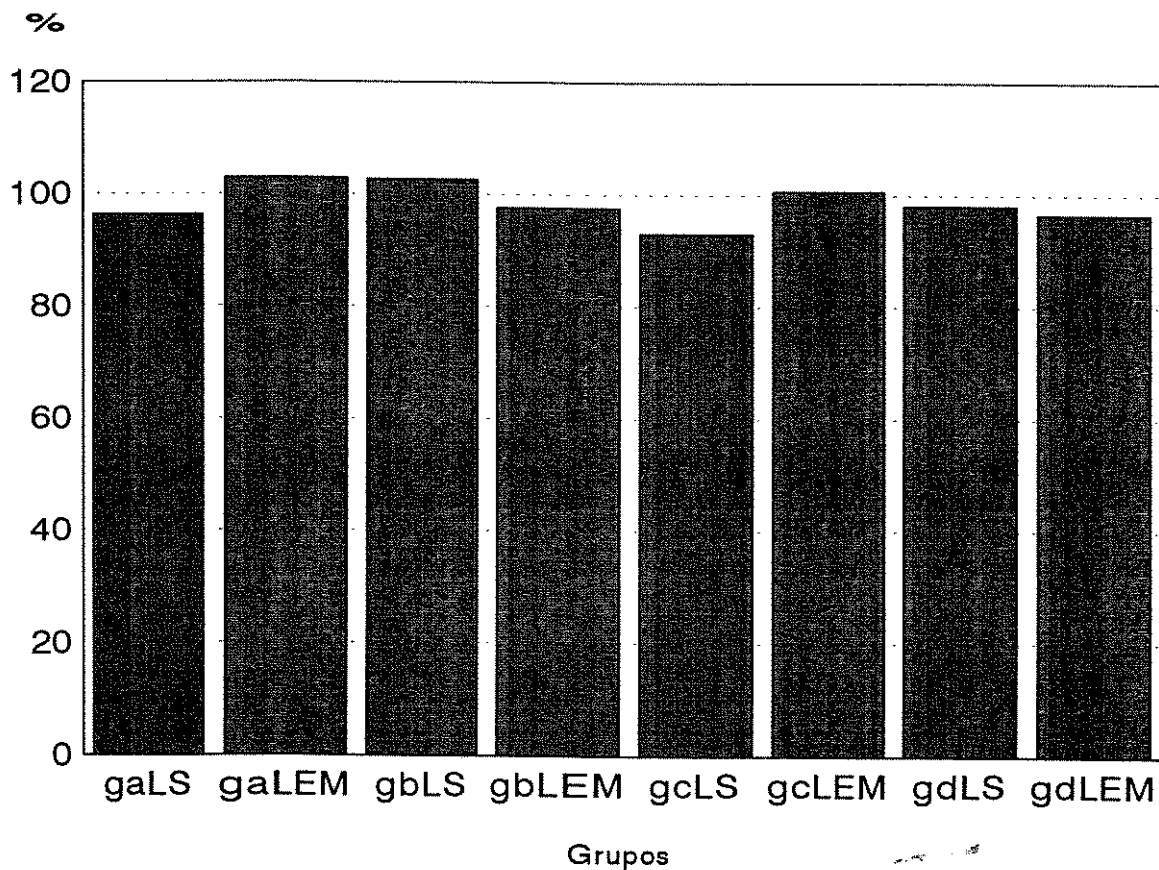


FIGURA 16: Peso das adrenais dos grupos submetidos à lesão cirúrgica simulada e anestesiados com tiopental sódico (gaLS), éter etílico (gbLS), éter etílico + estresse osmótico (gcLS) e com a associação de clorpromazina + meperidina + tiopental sódico (gdLS); e dos grupos submetidos à lesão da EMH e anestesiados com tiopental sódico (gaLEM), éter etílico (gbLEM), éter etílico + estresse osmótico (gcLEM) e com a associação de clorpromazina + meperidina + tiopental sódico (gdLEM), expresso em porcentagem, relativos ao grupo controle (gCo). EMH = eminência média hipotalâmica.

4.4) RESPOSTA IMUNE-HUMORAL

O impacto do estresse anestésico e cirúrgico sobre a resposta imunológica é um fenômeno bem determinado. No presente trabalho utilizou-se diferentes agentes anestésicos associados ao trauma cirúrgico visando determinar as possíveis alterações na resposta imune. Além disso, os animais de um dos grupos experimentais foram submetidos ao estresse osmótico através da ingestão de salina hipertônica durante 12 dias antes dos procedimentos anestésico e cirúrgico, visando verificar o impacto desse tipo de fator estressante sobre a resposta imune.

Com o objetivo de se determinar a resposta imune-humoral dos animais experimentais, os mesmos foram imunizados com hemácias de carneiro (HC). A resposta imune primária foi avaliada pela contagem de células formadoras de placas (IgM-CFP) por milhão de células viáveis de baço no quinto dia pós-imunização. A escolha do quinto dia pós-imunização para a verificação dos valores de IgM-CFP baseou-se em estudos prévios realizados em nosso laboratório, que indicaram um pico da resposta imune nesse dia (FERREIRA, 1990).

Na Figura 17, verifica-se que não há diferença estatisticamente significativa nos valores de IgM-CFP/10⁶ células viáveis do baço entre os grupos de animais submetidos à lesão cirúrgica simulada (gaLS, gbLS, gcLS e gdLS), independentemente do agente anestésico utilizado, em relação ao grupo controle (gCo). Entretanto, os níveis de IgM-CFP são significativamente maiores ($p < 0.05$) no grupo de animais anestesiados com a associação de clorpromazina + meperidina + tiopental sódico (gdLS) em relação aos grupos anestesiados com tiopental sódico (gaLS) e com éter etílico (gbLS).

A Figura 18, mostra que os animais do grupo gbLEM (anestesia com éter etílico) e gcLEM (anestesia com éter etílico + estresse osmótico) apresentaram valores de IgM-CFP/10⁶ células viáveis do baço semelhantes estatisticamente ao grupo controle (gCo). Porém, nos grupos gaLEM (anestesia com tiopental sódico), e gdLEM (anestesia com clorpromazina + meperidina + tiopental sódico) observaram-se níveis de IgM-CFP/10⁶ células viáveis do baço significativamente maiores ($p < 0.05$) ao grupo controle (gCo).

Comparando os níveis de IgM-CFP/10⁶ células viáveis do baço entre os diferentes grupos de animais submetidos à lesão da eminência média hipotalâmica, verificou-se que o grupo gaLEM (anestesia com tiopental sódico) apresentou níveis significativamente superiores ($p < 0.05$) ao grupo gbLEM (anestesia com éter etílico). Já o grupo gdLEM (anestesia com clorpromazina + meperidina + tiopental sódico) apresentou valores

Resposta Imune-Humoral

IgM - CFP / 10^6 Células viáveis do baço

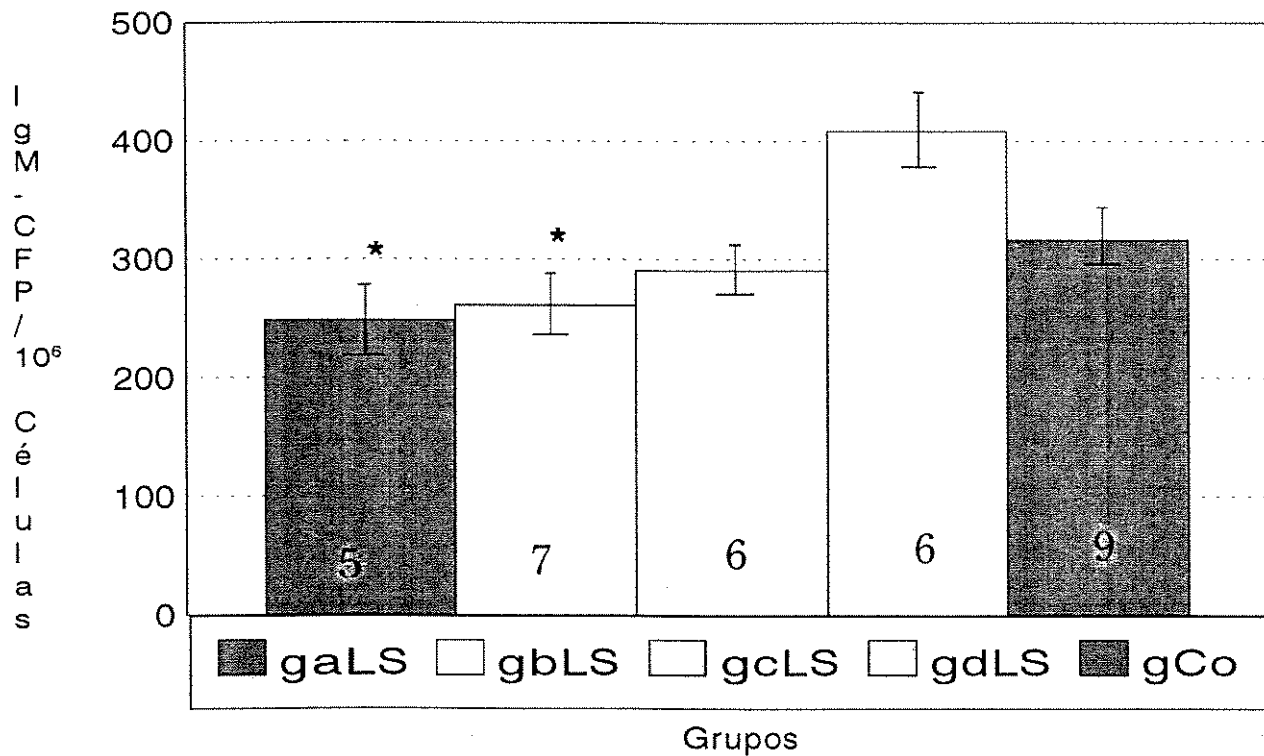


FIGURA 17: Avaliação do número de CFP/ 10^6 células viáveis do baço no grupo controle (gCo) e nos grupos de animais submetidos à lesão cirúrgica simulada e anestesiados com tiopental sódico (gaLS), éter etílico (gbLS), éter etílico + estresse osmótico (gcLS) e com a associação de clorpromazina + meperidina + tiopental sódico (gdLS). Os resultados representam a média $\pm$ EPM dos valores de IgM-CFP/ 10^6 células viáveis do baço do número de ratos mostrados na base da coluna.

* $p < 0,05$ em relação ao grupo gdLS.

de IgM-CFP/10⁶ células viáveis do baço significativamente maiores ($p < 0.05$) que os grupos gbLEM (anestesia com éter etílico) e gcLEM (anestesia com éter etílico + estresse osmótico), Figura 18.

Quando se enfatizou o impacto da lesão da eminência média hipotalâmica na resposta imune-humoral, encontraram-se os seguintes resultados. A Tabela 7, mostra que os valores de IgM-CFP/10⁶ células viáveis do baço são significativamente menores ($p < 0.05$) no grupo de animais anestesiados com tiopental sódico submetidos à lesão simulada (gaLS) em relação aos animais com lesão da eminência média hipotalâmica (gaLEM). Entretanto, quando o agente anestésico utilizado foi o éter etílico, não se evidenciou alteração significativa nos valores de IgM-CFP/10⁶ células viáveis de baço entre os animais submetidos à lesão cirúrgica simulada (gbLS) ou lesão da eminência média hipotalâmica (gbLEM), como ilustrado na Tabela 8.

Resposta Imune-Humoral

IgM - CFP / 10^6 Células viáveis do baço

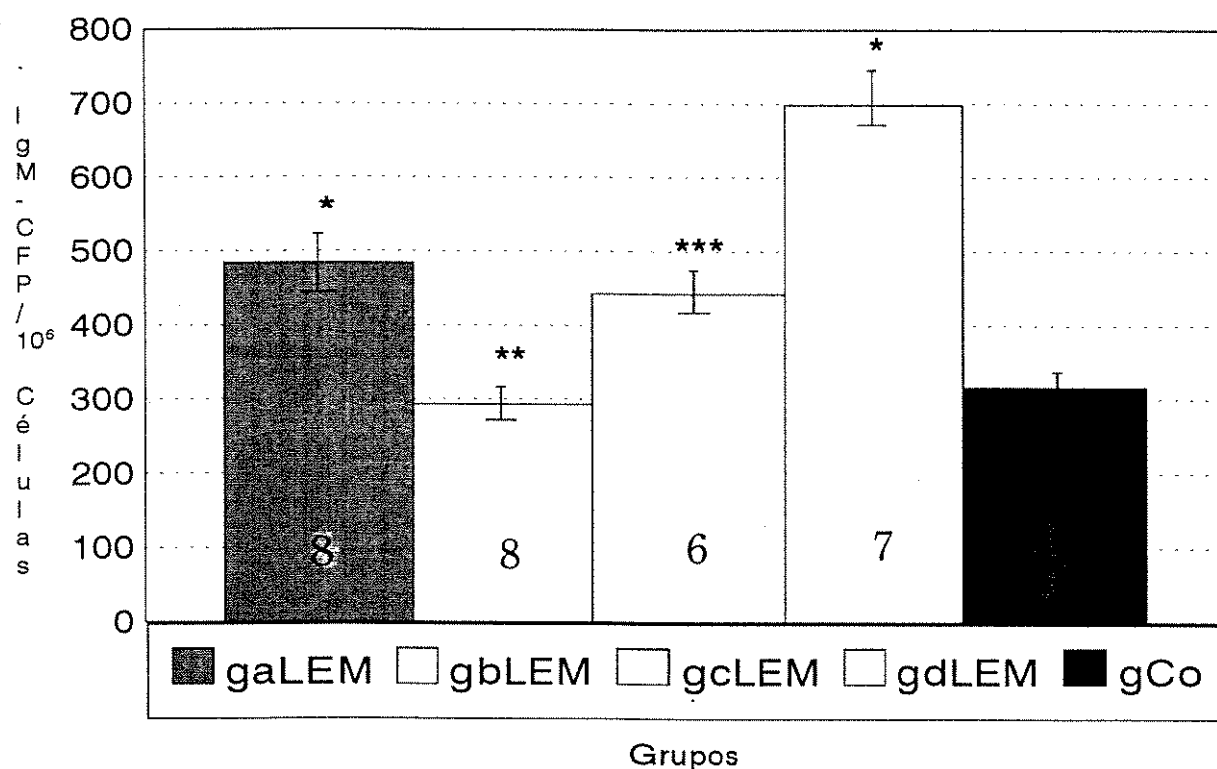


FIGURA 18: Avaliação do número de CFP/ 10^6 células viáveis do baço no grupo controle e nos grupos submetidos à lesão da EMH e anestesiados com tiopental sódico (gaLEM), éter etílico (gbLEM), éter etílico + estresse osmótico (gcLEM) e com a associação de clorpromazina + meperidina + tiopental sódico (gdLEM). EMH = eminência média hipotalâmica. Os resultados representam a média $\pm$ EPM dos valores de IgM-CFP/ 10^6 células viáveis do baço do número de ratos mostrados na base da coluna.

*** $p < 0,05$ em relação ao grupo controle (gCo).**

**** $p < 0,05$ em relação aos grupo gaLEM e gdLEM.**

***** $p < 0,05$ em relação ao grupo gdLEM.**

TABELA 7: Análise do número de CFP/10⁶ de células viáveis do baço nos grupos de animais anestesiados com tiopental sódico e submetidos à lesão cirúrgica simulada (gaLS) ou submetidos à lesão da eminência média hipotalâmica(gaLEM).

		CFP / 10 ⁶
gaLS	(n=5)	248,36 ± 41,81*
gaLEM	(n=8)	484,02 ± 46.03

Os resultados representam a média ± EPM.

(n=número de ratos)

***p<0,05 em relação ao grupo gaLEM.**

TABELA 8: Análise do número de CFP/10⁶ de células viáveis do baço nos grupos de animais anestesiados com éter etílico e submetidos à lesão cirúrgica simulada (gbLS) ou submetidos à lesão da eminência média hipotalâmica (gbLEM).

	CFP / 10 ⁶
gbLS (n=7)	261,20 ± 39,26
gbLEM (n=8)	293,12 ± 26.51

**Os resultados representam a média ± EPM.
(n=número de ratos)**

Na Tabela 9 verifica-se que os animais expostos ao estresse osmótico através da ingestão de salina hipertônica durante 12 dias e anestesiados com éter etílico, quando submetidos à lesão cirúrgica simulada (gcLS) apresentaram valores de IgM-CFP/10⁶ células viáveis do baço significativamente inferiores ($p < 0.05$) aos animais submetidos à lesão da eminência média hipotalâmica (gcLEM).

Nos grupos de animais anestesiados com a associação de clorpromazina + meperidina + tiopental sódico, a lesão da eminência média hipotalâmica (gdLEM) desencadeou aumento significativo ($p < 0,05$) nos níveis de IgM-CFP/10⁶ células viáveis do baço em relação à lesão cirúrgica simulada (gdLS), como demonstrado na tabela 10.

TABELA 9: Análise do número de CFP/10⁶ de células viáveis do baço nos grupos de animais que fizeram a ingestão de salina hipertônica durante doze dias, anestesiados com éter etílico e submetidos à lesão cirúrgica simulada (gcLS) ou submetidos à lesão da eminência média hipotalâmica (gcLEM).

	CFP / 10 ⁶
gcLS (n=6)	290,60 ± 17,82*
gcLEM (n=6)	442,65 ± 45.47

Os resultados representam a média ± EPM.
(n=número de ratos)

*p<0,05 em relação ao grupo gcLEM

TABELA 10: Análise do número de CFP/10⁶ de células viáveis do baço nos grupos de animais anestesiados com a associação de clorpromazina + meperidina + tiopental sódico submetidos à lesão cirúrgica simulada (gdLS) ou submetidos à lesão da eminência média hipotalâmica (gdLEM).

	CFP / 10 ⁶
gdLS (n=6)	408,12 ± 42,44*
gdLEM (n=7)	698,46 ± 59.42

Os resultados representam a média ± EPM.

(n=número de ratos)

***p<0,05 em relação ao grupo gdLEM**

5. DISCUSSÃO

A involução tímica em consequência do estresse em ratos é um fenômeno bem definido (SELYE, 1936b). As células tímicas são facilmente influenciadas pelo estresse, e embora seja aceito que o estímulo estressor induz a atrofia do timo e dos linfonodos, existem algumas dúvidas a respeito de como esse fenômeno ocorre (TESHIMA et al, 1987).

Uma das principais formas de manifestação do estresse é através do sistema endócrino, mais especificamente pelo aumento da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (BATEMAN et al, 1989). Os glicocorticóides liberados durante o estresse, por sua vez, podem acarretar profundas consequências sobre o timo e a resposta imunológica (BLALOCK, 1989). O efeito dos níveis aumentados de corticosterona, induzidos pelo estresse, na atrofia tímica foi relatado por vários autores (OKIMURA & NIGO, 1986; RABIN et al, 1987).

Os resultados do presente trabalho (Figura 8), mostram que todos os grupos de animais submetidos à lesão da eminência média hipotalâmica, por eletrocoagulação, apresentaram significativa redução dos níveis plasmáticos de corticosterona em relação aos animais com lesão cirúrgica simulada e ao grupo controle. Esses dados estão de acordo com aqueles encontrados na literatura, que indicam que lesões hipotalâmicas, particularmente da eminência

média, suprimem a liberação do ACTH hipofisário e dos esteróides adrenocorticais resultantes do estresse (McCANN, 1953).

Como descrito anteriormente, os glicocorticóides têm um papel importante sobre o timo, muitas vezes causando sua involução, particularmente, em situações de estresse. Entretanto, a lesão da eminência média hipotalâmica desconecta anatômica e funcionalmente o hipotálamo da hipófise, impedindo que ocorra aumento dos níveis plasmáticos de corticosterona nas situações de estresse (McCANN, 1953). É importante, portanto, esclarecer o comportamento do timo e da resposta imunológica em animais com lesão da eminência média, frente a estímulos estressantes.

Os dados do presente trabalho demonstram que o estresse anestésico e cirúrgico atua de maneira marcante sobre o timo. Em todos os grupos experimentais, independentemente do agente anestésico utilizado ou do procedimento cirúrgico empregado, tivemos uma redução do peso do timo, em maior ou menor grau, em relação ao peso tímico do grupo controle, como mostrado na Figura 9. De fato o estresse anestésico e cirúrgico influencia a modulação da resposta imune. LEE & PARK (1980), relataram que os agentes anestésicos podem interferir no sistema imune agindo diretamente nos órgãos efetores. Entretanto, essa modulação pode ser, também, indireta através de alterações nas resposta endócrinas e do metabolismo do organismo (SALO, 1992). O estresse cirúrgico, por

sua vez, pode promover a liberação de vários hormônios hipofisários e adrenais, podendo, por conseguinte, modular de forma importante o sistema imune via sistema endócrino (BONEAU et al, 1990). Além disso, involuções do timo após manipulação cirúrgica do sistema nervoso central têm sido relatado com frequência na literatura (YAMADA & GREER, 1959). Nos experimentos de RENOUX et al. (1987), camundongos com lesão do cortex cerebral bilateral apresentaram uma diminuição significativa do peso do timo em relação aos animais com cirurgia simulada.

A análise, individual, de cada grupo demonstra que os animais que utilizaram como agente anestésico o tiopental sódico apresentaram redução importante do peso tímico em relação ao grupo controle (Figura 9), entretanto não houve diferença de peso do timo entre os animais com cirurgia simulada (gaLS) e os animais com lesão da eminência média hipotalâmica (gaLEM), como mostrado na tabela 2. Esses dados indicam que, com níveis baixos de corticosterona circulantes, o tiopental sódico exerce um efeito protetor sobre o timo, diante do estresse cirúrgico. Essa droga anestésica também foi eficaz ao bloquear o efeito estressor da manipulação cirúrgica sobre a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal nos animais com a eminência média hipotalâmica Integra (Tabela 1). O tiopental sódico, como os demais barbitúricos, exerce muitas de suas ações no sistema nervoso central via sistema

GABAérgico, e, em geral, atua de maneira inibitória sobre o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (IXART et al, 1983; JONES et al, 1976; LAKIC et al, 1986; MAKARA & STARK, 1974). Os resultados de GIBBS (1969) demonstraram que a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal estava diminuída em ratos que foram anestesiados com pentobarbital, submetidos ou não ao estresse.

Por outro lado, nenhum dos outros métodos anestésicos utilizados no presente trabalho apresentaram resultados semelhantes aos do tiopental sódico em relação ao peso do timo, ou seja, a lesão da eminência média hipotalâmica acentuou ainda mais a redução do peso do órgão nesses grupos (gbLEM, gcLEM e gdLEM) em relação ao grupo controle (Figura 9). Além disso, a lesão da eminência média, não só acentuou as alterações parenquimatosas do timo nos animais anestesiados com a associação de clorpromazina + meperidina + tiopental sódico, como promoveu alterações significativas na proporção do parênquima e do estroma tímico nos grupos gbLEM (anestesiados com éter etílico) e gcLEM (anestesiados com éter etílico + estresse osmótico), como mostrado na Tabela 6. O maior grau de fibrose, portanto, maior atrofia do órgão, ocorreu nos animais do grupo gdLEM (anestesiados com a associação de clorpromazina + meperidina + tiopental sódico), indicando uma potenciação dessa atrofia tímica exercida pelo agente anestésico associado à lesão da eminência média

hipotalâmica nesses animais (Tabela 6 e Figuras 13, 14 e 15). Como nos animais lesados, os níveis de corticosterona circulantes são menores em relação aos animais com lesão simulada em todos os grupos (Figura 8), essas alterações tímicas evidenciadas nos animais com lesão da eminência média hipotalâmica devem estar relacionadas com outros fatores, que não os glicocorticóides, agindo em nível tímico.

O sistema neurovegetativo pode estar diretamente ligado a essas alterações, pois o timo, bem como outros órgãos linfóides, recebem importante suprimento de inervação a partir dessa divisão do sistema nervoso. O sistema neurovegetativo desempenha, assim, uma importante função moduladora sobre a atividade imunológica desses órgãos (FELTEN et al, 1985). Além disso, as catecolaminas são importantes mediadoras do efeito supressivo constantemente observado após o estresse, principalmente da atrofia tímica (KOFF & DUNEGAN, 1988; SIBINGA & GOLDSTEIN, 1988). Outros hormônios, como o GH e a prolactina, também exercem impacto imunomodulatório e, agem de forma importante em nível do timo (KELLEY et al, 1987).

Outro aspecto importante no presente trabalho foi observar o impacto das diferentes drogas anestésicas utilizadas, na atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Nos experimentos descritos, verificou-se que os animais anestesiados com éter etílico e

submetidos à lesão cirúrgica simulada (gbLS) apresentaram aumento significativo dos níveis plasmáticos de corticosterona em relação ao grupo controle (Tabela 1). Os relatos da literatura evidenciam que o estresse desencadeado pelo éter exerce um efeito estimulatório na atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (LOPEZ-JIMENEZ et al, 1989). ZIMMERMANN & CRITCHLOW (1967), mostraram que o estresse pelo éter produz um aumento importante na corticosterona plasmática em ratos, sendo esse aumento indistinguível entre os períodos da manhã e da tarde. YASUDA et al. (1976) evidenciaram que o estresse pelo éter aumenta de forma significativa os níveis plasmáticos de ACTH em ratos, sendo esse aumento mais importante no período matinal, quando a corticosterona plasmática está baixa. Existem claras evidências que o efeito do éter na ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal está relacionado às vias neurais direcionadas ao hipotálamo ântero-lateral (KARTESZI et al, 1980). Entretanto, como os efeitos máximos do estresse pelo éter sobre a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal iniciam logo após a sua inalação, têm um pico de ação em alguns minutos e desaparecem gradativamente em algumas horas (LOPEZ-JIMENEZ et al, 1989), provavelmente a atividade aumentada do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, verificada no grupo gbLS, esteja relacionada ao efeito do estresse pela manipulação cirúrgica.

A associação de drogas visando interferir o mínimo possível com a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal é usada há bastante tempo. Os relatos de ARIMURA et al. (1967), indicavam que a associação de clorpromazina + morfina + nembutal oferece vantagens sobre outras drogas para estudos do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal em ratos. Na análise dessas três drogas, verifica-se que o uso isolado de opióides aumenta marcadamente a concentração de ACTH plasmática e na adenohipófise, bem como o CRH hipotalâmico (BUCKINGHAN, 1981), ao passo que, o opióide usado em ratos previamente tratados com barbitúrico tem seus efeitos sobre o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal substancialmente reduzidos (BRIGGS & MUNSON, 1955; BUCKINGHAN, 1981).

A clorpromazina, no entanto, inibe a liberação de ACTH pela hipófise anterior induzida por vários estímulos estressores (ARIMURA et al, 1967), embora esse efeito seja relativamente fraco.

No presente trabalho, entretanto, a associação de clorpromazina + meperidina + tiopental sódico não foi eficaz em bloquear a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal. Evidenciam-se esses dados comparando o grupo gdLS (anestesia com clorpromazina + meperidina + tiopental sódico e cirurgia simulada) com o grupo controle (gCo), mostrados na Tabela 1. No entanto, os animais do grupo gcLS, anestesiados com éter-etílico e submetidos à lesão cirúrgica simulada, mas antes expostos ao

estresse osmótico pela ingestão de salina hipertônica durante 12 dias, apresentaram níveis plasmáticos de corticosterona estatisticamente similares ao grupo controle (gCo), indicando que apesar do estresse provocado pela manipulação cirúrgica associado ao estresse anestésico, a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal não aumentou nesses animais (Tabela 1). A explicação para esse dado está relacionada ao efeito inibitório exercido pelo estímulo osmótico crônico (estresse osmótico) sobre a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, tanto em condições basais como em situações de estresse (JESSOP et al, 1990; CHOWDREY et al, 1991) Contudo, quando se compara o grupo gcLS (anestesiado com éter etílico + estresse osmótico) com o grupo gbLS (anestesiado com éter etílico), ambos submetidos à cirurgia simulada, se evidencia o importante efeito inibitório do estímulo osmótico (hiperosmolaridade plasmática) sobre a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (Tabela 1). Esses dados estão de acordo com os relatos de CHOWDREY et al. (1991), os quais demonstram que o tratamento com salina 2%, durante 12 dias, ativa um mecanismo inibitório sobre a liberação de ACTH. Além disso, a ingestão crônica de salina hipertônica, além de diminuir os níveis circulantes de ACTH, atenua a elevação desse hormônio induzida pela adrenalectomia (JESSOP et al, 1990). A secreção de ACTH e corticosterona e, também, atenuada pelo estresse osmótico

(CHOWDREY et al, 1991). O mecanismo pelo qual esse efeito inibitório do estresse osmótico sobre o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal ocorre ainda não está claro, no entanto, os relatos de que a estimulação osmótica crônica promove redução dos níveis de RNAm-CRH nos neurônios parvocelulares do núcleo paraventricular hipotalâmico (YOUNG, 1986; LIGHTMAN & YOUNG, 1987), associados aos dados de que o conteúdo de CRH na eminência média está diminuído após o tratamento com salina hipertônica, sugerem que essa ação ocorra em nível hipotalâmico (JESSOP et al, 1990).

Comparando, entre si, os modelos anestésicos propostos nos experimentos, verifica-se que não há diferença entre o uso da associação de clorpromazina + meperidina + tiopental sódico e o uso do tiopental sódico isolado em relação à atividade do sistema hipotálamo-hipófise-adrenal (Tabela 1). A partir desses dados, pode-se concluir que apesar de não ser potencialmente eficaz em bloquear a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal nos animais submetidos a manipulação cirúrgica, o tiopental sódico é o agente anestésico mais indicado para estudos que visem a manipulação do mesmo. Esses dados estão de acordo com os relatos de SHEWARD & FINK (1990), que através da avaliação do ritmo circadiano do ACTH e da corticosterona concluíram que a anestesia com barbitúricos é a mais apropriada do que a anestesia com outras drogas para estudos do sistema hipotálamo-hipófise-adrenal.

Em resumo, pode-se concluir que o estresse anestésico e cirúrgico atua de forma importante sobre o timo, promovendo atrofia desse órgão. A lesão da eminência média hipotalâmica, por sua vez, determina que o impacto do estresse anestésico e cirúrgico sobre o timo seja mais contundente, acentuando a atrofia do órgão em todos os grupos, com exceção dos animais anestesiados com tiopental sódico. Com os resultados do presente trabalho, é possível deduzir que a lesão da eminência média do hipotálamo induz à atrofia tímica, sendo que o tiopental sódico exerce um efeito protetor sobre o timo nos animais com lesão dessa estrutura. Contudo, a intensificação da atrofia tímica provocada pela lesão da eminência média hipotalâmica não está relacionada com os níveis elevados de glicocorticóides circulantes, uma vez que, nos animais com destruição desta estrutura hipotalâmica, por eletrocoagulação, os níveis plasmáticos de corticosterona são baixos. O presente trabalho falha em determinar os mecanismos precisos desse efeito, entretanto, pode-se postular que o sistema neurovegetativo, os opióides endógenos e outros hormônios possam estar envolvidos (FELTEN et al, 1985; KELLEY et al, 1987).

Entre as drogas anestésicas utilizadas no presente trabalho, a associação de clorpromazina + meperidina + tiopental sódico foi a que causou maior grau de atrofia do timo, sendo essa em decorrência da redução do parênquima do órgão, como determinado pela análise morfométrica (Tabela 6).

A resposta do timo e a resposta imune-humoral ao estresse, nem sempre estão correlacionadas, principalmente em situações agudas. É aceito, em geral, que o estresse provoca alterações no sistema imune, sendo estas dependentes do modelo e metodologia empregados (GRIFFIN, 1989). Vários fatores determinam os efeitos do estresse no sistema imune, tais como, o tempo de exposição (MOJAN & COLLECTOR, 1977), a intensidade do estressor (KELLER et al, 1981) e a tolerância individual ao estímulo (LANDESLAGER et al, 1983).

No presente trabalho, a lesão da eminência média hipotalâmica promoveu um aumento significativo da resposta imune-humoral em IgM-CFP / 10^6 célula viáveis do baço em todos os grupos analisados, com exceção do grupo de animais anestesiados com éter etílico (Figura 18). Comprovadamente, procedimentos cirúrgicos no sistema nervoso central promovem alterações em órgãos linfóides, porém, geralmente com impacto imunossupressivo (YAMADA & GREER, 1969). Mais recentemente, ROSZMAN et al, (1985) realizaram estudos com lesão em diversas áreas do sistema nervoso central, verificando seu impacto sobre a resposta imune. Eles concluíram que lesões no hipotálamo anterior são imunossupressivas, enquanto lesões do hipocampo, da amígdala e corpos mamilares acentuam a resposta imune. A remoção da hipófise bloqueia muitos dos efeitos inibitórios sobre a resposta

imune induzidos pelas lesões do hipotálamo anterior e todos os efeitos facilitatórios sobre a resposta imune promovidos pela lesão do hipocampo e amígdala (ROSZMAN et al, 1985).

No entanto, tratando-se especificamente da lesão da eminência média hipotalâmica, além de estar lesando uma estrutura do sistema nervoso central, se está desconectando o hipotálamo da hipófise (McCANN, 1953). Por conseguinte, bloqueia-se a expressão endócrina ao estresse, uma vez que se impede a ação dos fatores hipotalâmicos na hipófise. Além disso, nos animais que foram submetidos à lesão da eminência média verificou-se que ocorreu uma importante redução dos níveis circulantes de corticosterona (Figura 8). Como os glicocorticóides são imunossupressivos (BLALOCK et al, 1985), esse pode ser um dos fatores importantes envolvidos na resposta imune aumentada ocorrida nos animais com lesão da eminência média hipotalâmica. PERICIC et al. (1987) demonstraram que com níveis elevados de corticosterona ocorre diminuição da resposta imune-humoral em IgM-CFP, em ratos. Em altas concentrações, os glicocorticóides rotineiramente exercem efeitos supressivos sobre a resposta imune, por outro lado, em baixas concentrações, esses hormônios apresentam efeitos estimulatórios sobre a resposta imunológica (ADER et al, 1990). No presente trabalho, os animais com lesão da eminência média hipotalâmica apresentaram concentrações plasmáticas de

corticosterona muito inferiores em relação aos animais com cirurgia simulada e ao grupo controle (Figura 8). Em contrapartida, nos estudos de ROSZMAN et al. (1985), a imunossupressão verificada nas lesões do hipotálamo anterior não foi devida aos níveis aumentados de corticosteróides, mas em decorrência da supressão dos macrófagos.

É importante salientar que a lesão da eminência média hipotalâmica interfere com a dinâmica de várias outras substâncias que exercem efeitos sobre o sistema imune, entre elas o hormônio adrenocorticotrófico (JOHNSON et al, 1982). Outros hormônios, frequentemente liberados no estresse, como a vasopressina, oxitocina, GH, prolactina e TSH (HIESTAND et al, 1986; WIDEMAN & MURPHI, 1985), e que atuam em células imunocompetentes, têm sua dinâmica alterada pela lesão da eminência média hipotalâmica (BLALOCK et al, 1985; JOHNSON & TORRES, 1985; KELLEY, 1989). Outras substância que podem estar envolvidas com o aumento da resposta imune são as beta-endorfinas e encefalinas, neuropeptídeos, que ao contrário da corticosterona, são descritos como estimuladores da resposta imune (BROWN & VAN EPPS, 1986; GILMANN et al, 1982; MANDLER et al, 1986; PLOTNIKOFF et al, 1985).

O éter etílico é um potente agente estressor e, também, um importante estimulador da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-

adrenal (LOPEZ-JIMENEZ et al, 1989). Porém, nos animais que usaram o éter etílico como agente anestésico e se submeteram à lesão da eminência média hipotalâmica (gbLEM), mesmo tendo níveis plasmáticos de corticosterona baixos, a resposta imune não se alterou em relação aos animais com cirurgia simulada (gbLS), como mostrado na Tabela 8. Além disso, os animais que usaram essa droga como agente anestésico, ao contrário dos demais grupos analisados, a lesão da eminência média hipotalâmica não promoveu alterações na resposta imune-humoral em IgM-CFP, como mostrado na Figura 18. Como nesses animais com lesão da eminência média (gbLEM) os níveis de corticosterona são significativamente menores do que nos animais com cirurgia simulada (gbLS) e do que nos animais do grupo controle (gCo), pode-se postular que o éter etílico exerce efeitos sobre o sistema imunológico por outras vias, que não o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, uma vez que, com a destruição da eminência média, mesmo tendo níveis séricos de corticosterona baixos, a resposta imune não se alterou (Tabela 8). A ativação do sistema neurovegetativo pode ser essa via, pois a modulação do sistema imune pelo sistema nervoso central pode envolver tanto o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal como o sistema neurovegetativo (BROWN et al, 1991). O éter, também, pode interferir no sistema imunológico agindo diretamente (BRUCE & WINGARD, 1971).

A análise dos dados dos animais anestesiados com tiopental

sódico, demonstram que a lesão da eminência média hipotalâmica promoveu um aumento significativo da resposta imune-humoral em IgM-CFP / 10^6 célula viáveis do baço (Tabela 7). Efeito semelhante foi observado nos grupos de animais anestesiados com a associação de clorpromazina + meperidina + tiopental sódico, onde os animais submetidos à lesão simulada apresentaram valores de IgM-CFP/ 10^6 célula viáveis do baço significativamente menores em relação ao grupo com lesão da eminência média hipotalâmica (Tabela 10).

O impacto dos diversos tipos de agentes anestésicos utilizados no presente trabalho, aferido nos grupos de animais submetidos à lesão cirúrgica simulada, demonstrou que não houve diferença entre os grupos comparados individualmente com o grupo controle (figura 17). A influência de drogas, que têm seu principal local de ação ao nível do sistema nervoso central, na imunomodulação tem sido bastante estudada ultimamente. A habilidade de drogas ansiolíticas, em altas doses, deprimirem o sistema imune foi mostrado em camundongos (DESCOTES et al, 1982). PERICIC et al. (1987) verificaram que animais não estressados, tratados com diazepam, apresentaram diminuição do número de CFP/ 10^6 células viáveis do baço, e essa supressão da resposta imune estava diretamente relacionada com o aumento da corticosterona plasmática. Outra droga que afeta primariamente o sistema GABAérgico, o

pentobarbital, foi capaz de deprimir o título de anticorpos induzidos pelo antígeno tifóide *H*, em ratos (DADHICH et al, 1980). A clorpromazina, por sua vez, mostrou-se capaz de inibir a síntese de anticorpos contra o antígeno tifóide *H*, no homem (DADHICH et al, 1980). No presente trabalho, nenhum dos agentes anestésicos utilizados interferiu de maneira significativa na resposta imune humoral em IgM-CFP (Figura 17).

O estímulo osmótico crônico (estresse osmótico), apesar de exercer efeito inibitório sobre a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal nos animais submetidos ao estresse anestésico e cirúrgico, como demonstrado no presente trabalho (Tabela 1), não interfere de maneira significativa na resposta imune-humoral em IgM-CFP (Figura 17). Entretanto, a hiperosmolaridade plasmática (estresse osmótico) não impede o aumento dos níveis de IgM-CFP / 10^6 células viáveis do baço, provocado pela lesão da eminência média hipotalâmica (Tabela 9).

Em resumo, o estresse anestésico e cirúrgico não alterou a resposta imune-humoral em IgM-CFP / 10^6 células viáveis do baço, entretanto, a lesão da eminência média hipotalâmica promoveu uma estimulação da resposta imune (Figuras 17 e 18). A diminuição do nível plasmático dos glicocorticóides nos animais com lesão da eminência média pode ser um dos fatores envolvidos na intensificação da resposta imune observada, porém, outros

fenômenos devem estar envolvidos. Trabalhos complementares se fazem necessários para conclusões mais definidas nesse aspecto.

Os dados do presente trabalho mostram que a lesão da eminência média hipotalâmica promove uma importante atrofia tímica, com redução do parênquima do órgão. Por outro lado, a lesão dessa estrutura estimula a resposta imune-humoral em IgM-CFP, em experimento agudo. Portanto, a integridade da eminência média hipotalâmica é fundamental para os mecanismos de retroalimentação mediados pelos sistemas nervoso, endócrino e imunológico, envolvidos na modulação da resposta imune. Além disso, esses dados sugerem que não há relação entre as alterações tímicas (órgão linfóide central) com a resposta imune-humoral mediada pelo baço (órgão linfóide periférico), em experimento agudo.

6. CONCLUSÕES

- A lesão da eminência média hipotalâmica, por eletrocoagulação, promoveu uma redução significativa dos níveis plasmáticos de corticosterona.

- O estresse anestésico e cirúrgico desencadeou uma importante atrofia tímica. A lesão da eminência média hipotalâmica acentuou ainda mais essa alteração. Essa atrofia tímica evidenciada nos animais com lesão da eminência média do hipotálamo não foi decorrente da corticosterona plasmática elevada, uma vez que nesses animais os níveis circulantes desse hormônio estão baixos. Estudos complementares fazem-se necessários para o esclarecimento desse efeito.

- A associação de clorpromazina + meperidina + tiopental sódico promoveu um importante grau de fibrose tímica, sendo que a lesão da eminência média do hipotálamo intensificou esse fenômeno, por mecanismos não definidos no presente trabalho.

- O tiopental sódico foi a droga que apresentou menor grau de interferência na atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, portanto, a mais indicada para estudos experimentais que avaliem esse sistema.
- O estímulo osmótico crônico (estresse osmótico) inibiu a secreção de corticosterona em animais submetidos ao estresse anestésico e cirúrgico, entretanto, não interferiu com a resposta imune-humoral em IgM-CFP.
- A lesão da eminência média hipotalâmica promoveu um aumento na resposta imune-humoral em IgM-CFP/10⁶ células viáveis do baço.
- Não houve relação direta entre as alterações do timo e da resposta imune-humoral em IgM-CFP, induzidas pela lesão da eminência média hipotalâmica.

7. RESUMO

EFEITOS DA LESÃO DA EMINÊNCIA MÉDIA HIPOTALÂMICA NAS ALTERAÇÕES DO TIMO E RESPOSTA IMUNOLÓGICA INDUZIDAS PELO ESTRESSE EM RATOS.

Com o objetivo de se aferir os efeitos da lesão da Eminência Média do Hipotálamo (EMH) e do estresse anestésico e cirúrgico sobre o timo e a resposta imune, foram utilizados ratos machos, Wistar, com idade entre 2 a 3 meses, os quais foram submetidos à estereotaxia para lesão da EMH por eletrocoagulação e imunizados com hemácias de carneiro. No experimento foram usados 4 tipos de agentes anestésicos.

Os parâmetros utilizados para se verificar as alterações sofridas pelo timo foram o peso do órgão e a fração de volume ocupada pelo parênquima tímico em relação ao estroma, avaliada por intermédio de análise morfométrica. Amostras de sangue foram coletadas para determinação dos níveis plasmáticos de corticosterona. A resposta imune foi determinada pelo método de IgM-CFP direto, descrito por Jerne e cols. (1974) e modificado por Dresser (1978).

Os resultados obtidos mostram que o estresse anestésico e cirúrgico promoveu uma importante atrofia tímica, e a lesão da EMH acentuou ainda mais esse fenômeno. Em contrapartida, o estresse anestésico e cirúrgico não interferiu de maneira significativa na resposta imune-humoral em IgM-CFP, enquanto a lesão da EMH aumentou os níveis de CFP/10⁶ células viáveis do baço.

8. SUMMARY

In order to determine the effects of median eminence lesion in the basal Hypothalamus (MEL) and of the surgical and anesthetic stress upon the thymus and the immune response, male, wistar, s.p.f. rats with 2 to 3 month of age, were submitted to stereotaxic lesions and immunized with sheep red blood cels. Four different kinds of anesthetics were used.

Weight and morfometric analysis were used to evaluate the response of thymus. Blood samples were taken to determine the plasma levels of corticosterone. The immune response in IgM-PFC was determined by the technic of Jerne and cols. (1974) as modified by Dresser (1978)

The results showed that the surgical and anesthetic stress had a significant effect upon the weight of the thymus and promoted a thymic atrophy, intensified by MEL. In relation to the humoral-immune response in IgM-PFC there was no significant effect of surgical and anesthetic stress, instead MEL promoted a significant rise in the levels of IgM-PFC.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADER, R.; FELTEN, D. & COHEN, N. : Interactions between the brain and the immune system. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 30: 561 (1990).
- AHERNE, W. : Quantitative methods in histology. **J. Med. Lab. Techn.** 27: 160 (1970).
- ALDEGUNDE, M.; MIGUES, M.I. & FERNANDEZ, M.P. : GABA administered intraperitoneally alters the release of corticosterone in male rats. **IRCS Med.Sci.** 12: 523 (1984).
- ALVAREZ-MON, A.; KEHRL, J.H. & FAUCCI, A.S. : A potential role for adrenocorticotropin in regulating human B lymphocyte functions. **J. Immunol.** 135: 3823 (1985).
- ANTONI, F.A.; PALKOVITS, M.; MAKARA, G.B.; LINTON, E.A.; LOWRY, P.J. & KISS, J.Z. : Immunoreactive corticotropin-releasing hormone in the hypothalamo - infundibular tract. **Neuroendocrinology**, 36: 415 (1983).
- APPEL, N.M.; KIRITSY-ROY, J.A. & VAN LOON, G.R. : *Mu* receptors at discrete hypothalamic and brainstem sites mediate opioid peptide-induced increases in central sympathetic outflow. **Brain Res.** 378: 8 (1986).
- ARIMURA, A.; SAITO, T. & SCHALLY, A.V. : Assays for corticotropin-releasing factor (CRF) using rats treated with morphine, chlorpromazine, dexamethasone and nembutal. **Endocrinology**, 81: 235 (1967).

- ARYA, S.K.; WONG-STAAAL, F. & GALLO, R.C. : Dexamethasone-mediated inhibition of human T cell growth factor in gamma-interferon messenger RNA. **J. Immunol.** 133: 273 (1984).
- BARBANEL, G.; IXART, G.; SZAFARCZYK, A.; MALAVAL, F. & ASSENMACHER, I. : Intrahypothalamic infusion of interleukin-1beta increases the release of corticotropin-releasing hormone (CRH 41) and adrenocorticotrophic hormone (ACTH) in free-moving rats bearing a push-pull cannula in the median eminence. **Brain Res.** 516: 31 (1990).
- BATEMAN, A.; SINGH, A.; KRAL, T. & SOLOMON, S. : The immune-hypothalamic-pituitary-adrenal axis. **Endocrine Rev.** 10: 92 (1989).
- BAYER, B.M.; DAUSSIN, S.; HERNANDEZ, M. & IRVIN, L. : Morphine inhibition of lymphocyte activity is mediated by an opioid dependent mechanism. **Neuropharmacology**, 29: 369 (1990).
- BERARDINI, R. & SCAPAGININI, U. : Interactions between cytokines and the hypothalamic - pituitary - adrenal axis. **Prog. NeuroEndocrinImmunol.** 1: 13 (1988).
- BERKENBOSCH, F.; VAN OERS, J.; DEL REY, A.; TILDERS, F. & BESEDOWSKY, H. : Corticotropin - releasing factor - producing neurons in the rat activated by interleukin-1. **Science**, 238: 524 (1987).

- BERNTON, E.W.; BEACH, J.E.; HOLADAY, J.W.; SMALLRIDGE, R.C. & FEIN, H.G. : Release of multiple hormones by a direct action of interleukin-1 on pituitary cells. **Science**, 238: 519 (1987).
- BESEDOWSKI, H.O.; SORKIN, E.; KELLER, M. & MÜLLER, J. : Changes in blood hormones levels during the immune responses. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 150: 466 (1975).
- BESEDOWSKI, H.O. & SORKIN, E. : Network of immune neuroendocrine interactions. **J. Clin. Exp. Immunol.** 27: 1 (1977).
- BESEDOWSKI, H.; DEL REY, A.E.; SORKIN, E. & DINARELLO, C.A. : Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. **Science**, 233: 652 (1986).
- BEUTLER, B. & CERAMI, A. : Cachetin (tumor necrosis factor): A macrophage hormone governing cellular metabolism and inflammatory response. **Endocrine Rev.** 9: 57 (1988).
- BLALOCK, J.E. : A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. **Physiol. Rev.** 69: 1 (1989).
- BLALOCK, J.E.; HARBOUR-McMENAMIN, D. & SMITH, E.M. : Peptide hormones shared by the neuroendocrine and immunologic systems. **J. Immunol.** 135: 858 (1985).

- BLALOCK, J.E. & HARP, C. : Interferon and adrenocorticotrophic hormone induction of steroidogenesis, melanogenesis and antiviral activity. **Arch. Viral**, 67: 45 (1981).
- BLALOCK, J.E.; JOHNSON, H.M.; SMITH, E.M. & TORRES, A.A. : Enhancement of the *in vitro* antibody response by thyrotropin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 125: 30 (1985).
- BLALOCK, J.E. SMITH, E.M. & MEYER, W.J. : The pituitary-adrenocortical axis and the immune system, *in* clinics in endocrinology and metabolism. Besser, G.M. and Rees L.H., eds. W.B. Saunders. Philadelphia, 14: 1021 (1985).
- BLALOCK, J.E. & STANTON, J.D. : Common pathways of interferon and hormonal action. **Nature**, 283: 406 (1980).
- BLOOM, F.E.; BATTENBERG, E.L.F.; RIVIER, J. & VALE, W. : Corticotropin releasing factor (CRF): Immunoreactive neurones and fibers in rat hypothalamus. **Regul. Peptides**, 4: 43 (1982).
- BONNEAU, R.H.; KIECOLT-GLASER, J.K. & GLASER, R. : Stress-induced modulation of the immune response. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 594: 253 (1990).
- BOST, K.L.; SMITH, E.M.; WEAR, L.B. & BLALOCK, J.E. : Presence of ACTH and its receptor on a B lymphocytes cell line: a possible autocrine function for a neuroendocrine hormone. **J. Biol. Regul. Homeostatic Agents**, 1: 23 (1987).

- BOWERY, N.G. & DRAY, A. : Reversal of the action of amino acid antagonists by barbiturates and other hypnotic drugs. **Br. J. Pharmacol.** 63: 197 (1978).
- BRIGGS, F.N. & MUNSON, P.L. : Studies on the mechanism of ACTH secretion with the aid of morphine as a blocking agent. **Endocrinology**, 57: 205 (1955).
- BROWN, L.S. & VAN EPPS, D.E. : Opioid peptides modulate production of interferon by human mononuclear cells. **Cell. Immunol** 103: 19 (1986).
- BROWN, R.; LI, Z.; VRIEND, C.Y.; NIRULA, R.; JANZ, L.; FALK, J.; NANCE, D.M.; DYCK, D.G. & GREENBERG, A.H.: Suppression of splenic macrophage interleukin-1 secretion following intracerebroventricular injection of interleukin-1 beta: evidence for pituitary-adrenal and sympathetic control. **Cell. Immunol.** 132: 84 (1991).
- BRUCE, D.L. & WINGARD, D.W. : Anesthesia and the immune response. **Anesthesiology**, 34: 271 (1971).
- BRUHN, T.O.; PLOTSKY, P.M. & VALE, W.W. : Effect of paraventricular lesions on corticotropin - releasing factor (CRF) - like immunoreactivity in the stalk-median eminence: studies on the adrenocorticotropin response to ether stress and exogenous CRF. **Endocrinology**, 114: 57 (1984).

- BUCKINGHAM, J.C. : Hypothalamo-pituitary-adrenocorticotrophic activity in the pentobarbitone and morphine-treated rat. **Br. J. Pharmacol.** 73(1): 246 (1981).
- BUGNON, C.; FELLMAN, D.; GOUGET, A. & CARDOT, J. : Corticoliberin in rat brain: Immunocytochemical identification and localization of a novel neuropeptide system. **Neuroscience**, 30: 25 (1982).
- BUSSIÈRE, J.L.; ADLER, M.W.; ROGERS, T.J. & EISENSTEIN, T.K. : Differential effects of morphine and naltrexone on the antibody response in various mouse strains. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.** 14: 657 (1992).
- CAMBRONERO, J.C.; RIVAS, F.J.; BORRELL, J. & GUAZA, C. : Release of corticotropin-releasing factor from superfused rat hypothalamus induced by interleukin-1 is not dependent on adrenergic mechanism. **Eur. J. Pharmacol.** 219: 75 (1992).
- CANNON, W.B. : Stresses and strains of homeostasis. **Am. J. Med. Sci.** 189: 1 (1935).
- CARR, D.J. : Opioid receptors on cells of the immune system. **Prog. NeuroEndocrinImmunol.** 1: 8 (1988).
- CARR, D.J.J.; GERAKE, L.R. & FRANCE, C.P. : Naltrexone antagonizes the analgesic and immunosuppressive effects of morphine in mice. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 269: 693 (1994).

- CAVALLO, R.; SARTORI, M.L.; GATTI, G. & ANGELI, A. : Cortisol and immune interferon can interact in the modulation of human natural killer cell activity. **Experientia**, 42:177 (1986).
- CHOWDREY, H.S.; JESSOP, D.S.; PATEL, H. & LIGHTMAN, S.L. : Altered adrenocorticotropin, corticosterone and oxytocin responses to stress during chronic salt load. **Neuroendocrinology**, 54: 635 (1991).
- CLAMAN, H.N. : Corticosteroids and the immune response. **Advances Exp. Med. Biol.** 245: 203 (1988).
- COHNEN, G. : Changes in immunoglobulin levels after surgical trauma. **J. Trauma**, 12: 249 (1972).
- COOPER, D.A.; DUCKETT, M.; PETTS, V. & PENNY, P. : Corticosteroid enhancement of immunoglobulin synthesis by pokeweed mitogen stimulated human lymphocytes. **Clin. Exp. Immunol.** 37: 145 (1979).
- COMPTON, M.W. & CIDLOWSKI, J.A. : Rapid *in vivo* effects of glucocorticoids on the integrity of rat lymphocyte genomic deoxyribonucleic acid. **Endocrinology**, 118: 38 (1986).
- CRUSE, P.J.E. & FOORD, R. : A five-year prospective study of 23,649 surgical wounds. **Arch. Surg.** 107: 206 (1973).
- CULPEPPER, J.A. & LEE, F. : Regulation of IL-3 expression by glucocorticoids in cloned murine T lymphocytes. **J. Immunol.** 135: 3191 (1985).

- CUPPS, T.R. & FAUCI, A.S. : Corticosteroid-mediated immunoregulation in man. **Immunol. Rev.** 65: 133 (1982).
- DADHICH, A.P.; SHARMA, V.N. & GODHWANI, J.L. : Effect of restraint stress on immune response and its modification by chlorpromazine, diazepam & pentobarbitone. **Ind. J. Exp. Biol.** 18: 756 (1980).
- DALE, D.C.; FAUCI, A.S.; GUERRY IV, D. & WOLFF, S.M. : Comparison of agents producing a neutrophilic leukocytosis in man. **J. Clin. Invest.** 56: 808 (1975).
- DeFEUDIS, F.V. : GABA and hormonal secretion. **Trends Pharmacol. Sci.** 5: 152 (1984).
- DESCOTES, J.; TEDONE, R. & EVREUX, C.J. : Suppression of humoral and cellular immunity in normal mice by diazepam. **Immunol. Lett.** 5:41 (1982).
- DE SOUZA, E.B. : Corticotropin-releasing factor and interleukin-1 receptors in the brain-endocrine-immune axis - role in stress response and infection. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 697: 9 (1993).
- DRESSER, D.W. : Assays for immunoglobulin secreting cells, in Weir, D.M., ed. Handbook of experimental immunology, Blackwell Scientific Publications, Oxford. (1978).
- DUNN, A.J. : Role of cytokines in infection-induced stress. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 697: 189 (1993).

- DURANT, S. : *In vivo* effects off catecholamines and glucocorticoids on mouse thymic cAMP content and thymolysis. **Cell Immunol.** 102: 136 (1986).
- ELIAS, A.N.; VALENTA, L.J.; SZEKERES, A.V. & GROSSMAN, M.K. : Regulatory role of gamma-aminobutyric acid in pituitary hormone secretion. **Psychoneuroendocrinology**, 7: 15 (1982).
- ESKOLA, J.; SALO, M.; VILJANEN, M.K. & RUUSKANEN, O. : Impaired B lymphocyte function during open-heart surgery: Effects of anesthesia and surgery. **Br. J. Anaesth.** 56: 333 (1984).
- ESPANOL, T.; TODD, G.B. & SOOTHILL, J.F. : The effect of anaesthesia on the lymphocyte response to phytohaemagglutinin. **Clin. Exp. Immunol.** 18: 73 (1974).
- EWBANK, R. : Behavioural responses to stress in form animals. In: Moberg G.P., ed. *Animal stress*. Am. Physiol. Soc., Waveley Press, Bethesda, MD, (1985).
- FAGARASAN, M.O.; ESKAY, R. & AXELROD, J. : Interleukin-1 potentiates the secretion of beta-endorphin induced by secretagogues in a mouse pituitary cell line (AtT-20). **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 86: 2070 (1989).
- FAUCI, A.S. : Mechanism of corticosteroid action on lymphocyte subpopulations. I.Redistribution of circulating T and B lymphocytes to the bone marrow. **Immunology**, 28: 669 (1975).

- FAUCI, A.S. : Mechanism of corticosteroid action on lymphocyte subpopulations. II. Differential effects of *in vivo* hydrocortisone, prednisone and dexamethasone on *in vitro* expression of lymphocyte function. **Clin. Exp. Immunol.** 24: 54 (1976).
- FAUCI, A.S. & DALE, D.C. : The effects of *in vivo* hydrocortisone on subpopulations of human lymphocytes. **J. Clin. Invest.** 53: 240 (1974).
- FAUCI, A.S.; PRATT, K.R. & WHALEN, G. : Activation of human B lymphocytes. IV. Regulatory effects of corticosteroids on the triggering signal in the plaque forming cell response of human peripheral blood B lymphocytes to polyclonal activation. **J. Immunol.** 119: 598 (1977).
- FELTEN, D.L.; FELTEN, S.Y.; CARLSON, S.L.; OLSCHOWKA, J.A. & LIVNAT, S. : Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue. **J. Immunol.** 135: 755 (1985).
- FERREIRA, H.H.A. : Influência do hipocampo na resposta imune de ratos estressados. Tese de Mestrado. IB - UNICAMP (1990).
- FONTANA, L.; FATTOROSSO, A.; D'AMELIO, R.; MIGLIORATIE, A. & PERRICONE, R. : Modulation of human concanavalin A-induced lymphocyte proliferative response by physiological concentrations of beta-endorphin. **Immunopharmacol.** 13: 111 (1987).

- FRANZMANN, A.W.; FLYNN, A. & ARNESON, P.D. : Serum corticoid levels relative to handling stress in Alaskan moose. **Can. J. Zool.** 53: 1424 (1975).
- FROELICH, C.J. & BANKHURST, A.D. : The effect of beta-endorphin on natural cytotoxicity and antibody dependent cellular cytotoxicity. **Life Sci.** 35: 261 (1984).
- FUKATA, J.; USUI, T.; NAITO, Y.; NAKAI, Y. & IMURA, H. : Effects of recombinant human interleukin-1 alfa, -beta, 2 and 6 on ACTH synthesis and release in the mouse pituitary tumour cell line AtT-20. **J. Endocrinol.** 122: 33 (1989).
- GARCY, A.M. & MAROTTA, S.F. : Plasma cortisol of conscious cats during cerebroventricular perfusion with adrenergic, cholinergic and GABAergic antagonist. **Neuroendocrinology**, 25: 343 (1978).
- GATTI, G.; CAVALLO, R.; SARTORI, M.L.; DEL PONTE, D.; MASERA, R.; SALVADORI, A.; CARIGNOLA, R. & ANGELI, A. : Inhibition by cortisol of human natural killer (NK) cell activity **J. Steroid Biochem.** 26: 49 (1987).
- GEORGE, R. & WAY, E.L. : Studies on the mechanism of pituitary-adrenal activation by morphine. **Br. J. Pharmacol.** 10: 260 (1955).
- GESSANI, S.; McCANDLESS, S. & BAGLIONI, C. : The glucocorticoid dexamethasone inhibits synthesis of interferon by decreasing the level of its mRNA. **J. Biochem.** 263: 7454 (1988).

- GIBBS, F.P. : Central nervous system lesions that block release of ACTH caused by traumatic stress. **Am. J. Physiol.** 217: 78 (1969).
- GILMAN, S.C.; SCHWARTZ, J.M.; MILNER, R.J.; BLOOM, F.E. & FELDMAN, J.D. : Beta - endorphin enhances lymphocytes proliferative responses. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 79: 4226 (1982).
- GOETZL, E.J.; CHERNOV, T.; REYNOLD, F. & PAYAN, D.G. : Neuropeptide regulation of the expression of immediate hipersensitivity. **J. Immunol.** 135: 802 (1985).
- GRABSTEIN, K.; DOWER, S.; GILLIS, S; URDAL, D. & LARSEN, A. : Expression of interleukin-2, interferon gamma and the IL-2 receptor by human peripheral blood lymphocytes. **J. Immunol.** 136: 4503 (1986).
- GREER, M.A. & ALLEN, C.F. : The effect of pentobarbital on basal and ether-stimulated ACTH secretion in intact and adrenalectomized rats. **Neuroendocrinology**, 17: 258 (1975).
- GRIFFIN, J.F. : Stress and immunity: a unifying concept. **Vet. Immunol.** 20: 263 (1989).
- GUILLEMIN, R. & ROSENBERG, B. : Humoral hypothalamic control of anterior pituitary: a study with combined tissue cultures. **Endocrinology**, 57: 599 (1955).

- HADLER, J.W. : Neuroendocrine modulation of the thymus-dependent immune system. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 496: 39 (1987).
- HARBUZ, M.S.; STEPHANOU, A.; SARLIS, N. & LIGHTMAN, S.L. : The effects of recombinant interleukin(IL)-1alfa, IL-1beta or IL-6 on hypothalamo-pituitary-adrenal axis activation. **J.Endocrinol.** 133: 349 (1992)
- HEALY, D.L.; HODGEN, G.D.; SCHULTE, H.M.; CHROUSOS, D.L.; LORIAUX, D.L.; HALL, D.R. & GOLDSTEIN, A.L. (1983) : The thymus-adrenal connection: Thymosin has corticotropin-releasing activates in primates. **Science**, 222: 1353
- HEIJNEN, C.J.; BEVERS, C.; KAVELAARS, A. & BALLIEUX, R.E. : Effect of alfa-endorphin on the antigen-induced primary antibody response of human blood *B* cells *in vitro*. **J.Immunol.** 136: 213 (1986).
- HIESTAND, P.C; MEKLER P; NORDMANN, R; GRIEDER, A. & PERMMONGKOL, C. : Prolactin as a modulator of lymphocyte responsiveness provides a possible mechanism of action for cyclosporin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 83: 2599 (1986).
- HO, I.K., & HARRIS, R.A. : Mechanism of action of barbiturates. **Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 21: 83 (1981).

- HOLBROOK, N.J.; COX, W.I. & HORNER, H.C. : Direct suppression of natural killer cell activity in human peripheral blood leukocyte cultures by glucocorticoids and its modulation by interferon. **Cancer Res.** 43: 4019 (1983).
- HOLE, A. : Depression of monocytes and lymphocytes by stress-related humoral factors and anaesthetic-related drugs. **Acta Anaesthesiol. Scand.** 28: 280 (1984).
- HOLE, A.; UNSGAARD, G. & BREIVIK, H. : Monocyte functions are depressed during and after surgery under general anesthesia but not under epidural anesthesia. **Acta Anaesthesiol. Scand.** 26: 301 (1982).
- IXART, G.; CRYSSOGELOU, H.; SZAFARCZYK, A.; MALAVAL, F. & ASSENMACHER, I. : Acute and delayed effects of picrotoxin on the adrenocorticotrophic system of the rats. **Neurosci. Lett.** 43: 235 (1983).
- JERNE, N.K.; NORDIN, A.A.; FUJI, H.; KOROS, A.M.C. & LEFKOVITS, I. : Plaque forming cells: Methodology and theory. **Transpl. Rev.** 19: 130 (1974).
- JESSOP, D.S.; ECKLAND, D.J.A.; TODD, K. & LIGHTMAN, S.L. : Osmotic regulation of hypothalamo-neurointermediate lobe corticotrophin - releasing factor - 41 in the rat. **Journal of Endocrinology**, 120: 119 (1989).

- JESSOP, D.S.; CHOWDREY, H.S. & LIGHTMAN, S.L. : Inhibition of rat corticotropin-releasing factor and adrenocorticotropin secretion by an osmotic stimulus. **Brain Research**, 523: 1 (1990).
- JOHNSON, H.M.; SMITH, E.M.; TORRES, B.A. & BLALOCK, J.E. : Regulation of the *in vivo* antibody response by neuroendocrine hormones. **Proc. Natl acad. Sci. USA**. 79: 4171 (1982).
- JOHNSON, H.M.; TORRES, B.A.; SMITH, E.M.; DION, L.D. & BLALOCK, J.E. : Regulation of lymphokine (interferon-gamma) production by corticotropin. **J. Immunol.** 132: 246 (1984).
- JOHNSON, H.M. & TORRES, B.A. : Regulation of lymphokine production by arginine vasopressin and oxytocin: modulation of lymphocyte function by neurohypophyseal hormones. **J. Immunol.** 135: 773 (1985).
- JOHNSTON, N.E. & BUCKLAND, R.B. : Response of male holstein calves from seven sires to four management stresses and measured by plasma corticoid levels. **Can. J. Anim. Sci.** 56: 727 (1976).
- JONES, M.T.; HILLHOUSE, E.W. & BURDEN, J. : Effect of various putative neurotransmitters on the secretion of corticotrophin-releasing hormone from the rat hypothalamus *in vitro* - a model of the neurotransmitters involved. **J. Endocr.** 69: 1 (1976).

- KAMP, C.W. & MORGAN, W.W. : Some barbiturates enhance the effect of muscimol on dopamine *turnover* in the rat retina. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 213: 332 (1980).
- KARTESZI, M.; MAKARA, G.B. & STARK, E.: The rise of plasma ACTH induced by ether is mediated through neural pathways entering the medial basal hypothalamus. **Acta Endocrinologica**, 93: 129 (1980).
- KAY, N.; ALLEN, J. & MORLEY, J.E. : Endorphins stimulate normal human peripheral blood lymphocyte natural killer activity. **Life Sci.** 35: 53 (1984).
- KNUDSEN, P.J.; DINARELLO, C.A. & STROM, T.B. : Glucocorticoids inhibit transcriptional and post-transcriptional expression of interleukin-1 in U937 cells. **J. Immunol.** 139: 4129 (1987).
- KELLER, S.E.; WEISS, J.M.; SCHLEIFER, S.J.; MILLER, N.E. & STEIN, M. : Suppression of immunity by stress: effect of a graded series of stresses on lymphocyte stimulation in rat. **Science**, 213: 1397 (1981).
- KELLEY, K. : Growth hormone, lymphocytes and macrophages. **Biochem. Pharmacol.** 38: 705 (1989).
- KELLEY, K.W.; BRIEF, S.; WESTLY, H.J.; NOVAKOFSKI, J.; BECHTEL, P.J.; SIMON, J. & WALKER, E.W. : Hormonal regulation of the age-associated decline in immune function. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 496: 91 (1987).

- KERN, J.A.; LAMB, R.J.; REED, J.C.; DANIELE, R.P. & NOWELL, P.C.: Dexamethasone inhibition of interleukin-1 beta production by human monocytes: post-transcriptional mechanisms. **J. Clin. Invest.** 81: 237 (1988).
- KOFF, W.C. & DUNEGAN, M.A. : Modulation of macrophage-mediated tumoricidal activity by neuropeptides and neurohormones. **J. Immunol.** 135: 350 (1985).
- KOFF, W.C. & DUNEGAN, M.A. : Neuroendocrine hormones suppress macrophage-mediated lysis of herpes simplex virus-infected cells. **J. Immunol.** 136: 705 (1988).
- KRUGER, T.K. & BLALOCK, J.E. : Cellular requirements for thyrotropin enhancement of *in vitro* antibody production. **J. Immunol.** 137: 197 (1986).
- KURZ, R.; PFEIFFER, K.P. & SAUER, H. : Immunologic status in infants and children following surgery. **Infection**, 11: 104 (1983).
- LAKIC, N.; PERICIC, D. & MANEV, H. : Mechanisms by which picrotoxin and a high dose of diazepam elevate plasma corticosterone level. **Neuroendocrinology**, 43: 331 (1986).
- LANDENSLAGER, M.L.; RYAN, S.M.; DRUNGAN, R.C.; HYSON, E.L. & MAYER, S.F. : Coping and immunosuppression: inescapable but not escapable shock suppress lymphocyte proliferation. **Science**, 221: 568 (1983)

- LASSEN, H.C.A.; HENRIKSEN, E.; NEUKIRCH, F. & KRISTENSEN, H.S. : Treatment of tetanus. Severe bone marrow depression after prolonged nitrous-oxide anaesthesia. **Lancet**, 2: 527 (1956).
- LEACH, T.M. : Physiology of the transport of cattle. *in* Moss B. ed. Transport of animals intended for breeding, production and slaughter. Martinus Nijhoff, The Hague (1982).
- LEE, K.S. & PARK, S.S. : Effect of halothane, enflurane, and nitrous oxide on tracheal ciliary activity *in vitro*. **Anesth. Analg.** 59: 426 (1980).
- LEW, W.; OPPENHEIM, J.J. & MATSUSHIMA, K. : Analysis of the suppression of IL-1-alpha and IL-1-beta production in human peripheral blood mononuclear adherent cells by a glucocorticoid hormone. **J. Immunol.** 140: 1895 (1988).
- LIGHTMAN, S.L.; HARBUZ, M.S.; KNIGHT, R.A. & CHOWDREY, H.S. : CRF mRNA in normal and stress conditions. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 697: 28 (1993).
- LIGHTMAN, S.L. & YOUNG III, W.S. : Vasopressin, oxytocin, dynorphin, enkephalin and corticotrophin-releasing factor mRNA stimulation in the rat. **J. Physiol.** 394: 23 (1987).
- LIGHTMAN, S.L. & YOUNG III, W.S. : Lactation inhibits stress-mediated secretion of corticosterone, oxytocin and hypothalamic accumulation of corticotropin-releasing factor and enkephalin messenger ribonucleic acids. **Endocrinology**, 124: 2358 (1989).

- LOPEZ-JIMENEZ, M.; VALENÇA, M.M.; MOREIRA, A.C. & ANTUNES-RODRIGUES, J. : Ether and immobilization stress effects on pituitary-adrenal function in hemidecorticate rat. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 22: 779 (1989).
- LOTZE, M.T.; FRANA, L.W.; SHARROW, S.O.; ROBB, R.J. & ROSENBERG, S.A. : *In vivo* administration of purified human interleukin-2. I. Half-life and immunologic effects of the Jurkat cell line-derived interleukin 2. **J. Immunol.** 134: 157 (1985).
- MAKARA, G.B. : Mechanisms by which stressful stimuli activate the pituitary-adrenal system. **Fed. Proc.** 44: 149 (1985).
- MAKARA, G.B. & STARK, E. : effect of gamma - aminobutyric acid (GABA) and GABA-antagonist drugs on ACTH release. **Neuroendocrinology**, 16: 178 (1974).
- MANDLER, R.N.; BIDDISON, W.E.; MANDLER, R. & SERRATI, S.A. : Beta-endorphin augments the cytolytic activity and interferon production of natural killer cells. **J. Immunol.** 136: 934 (1986).
- MANN, F.C. : Some bodily changes during anesthesia: an experimental study. **J.A.M.A.** 67: 172 (1916).
- MASON, J.W. : *Over all* hormonal balance as key to endocrine function. **Psychosom.Med.** 30: 791 (1968).

- McGILLIS, J.P.; HALL, N.R.; VAHOUNY, G.V. & GOLDSTEIN, A.L. :
Thymosin fraction 5 causes increased serum corticosterone in rodents
in vivo. **J. Immunol.** 134: 3952 (1985).
- McCANN, S.M. : Effect of Hypothalamic lesions on the adrenal cortical
response to stress en the rat. **Am. J. Physiol.** 175: 13 (1953).
- MEALY, K.; O'FARRELLY, C.; STEPHENS, R. & FEIGHERY, C. :
Impaired neutrophil function during anesthesia and surgery is due to
serum factors. **J. Surg. Res.** 43: 393 (1987).
- MEANEY, M.J., BHATNAGAR, S.; LAROCQUE, S.; McCORMICK, C.;
SHANKS, N.; SHARMA, S.; SMYTHE, J.; VIAU, V. & PLOTSKY,
P.M. : Individual differences in the hypothalamic-pituitary-adrenal
stress response and the hypothalamic CRF system. **Ann. N. Y. Acad.
Sci.** 697: 70 (1993).
- MERCHENTHALER, I.; VIGH, S.; PETRUSZ, P. & SCHALLY, A.V. :
Immunocytochemical localization of corticotropin-releasing factor
(CRF) in the rat Brain. **Am. J. Anat.** 165: 385 (1982).
- METAL'NIKOV, S. & CHORINE, V. : Rôle des réflexes conditionnels
dans L'immunité. **Ann. Inst. Pasteur Paris**, 40: 893 (1926).
- MOJAN, A.A. & COLLECTOR, M.I. : Stress-induced modulation of
immune response. **Science**, 196: 307 (1977).

- MORLEY, J.E.; KAY, N.E.; SOLOMON, G.F. & PLOTNIKOF, N.P. :
Neuropeptides: Conductors of the immune orchestra. **Neuropeptides and Immunity**, 41: 527 (1987).
- MOUDGIL, G.C. : Update on anaesthesia and the immune response. **Can. Anaesth. Soc. J.** 33: 554 (1986).
- NICOLL, R.A. : Pentobarbital: Differential postsynaptic actions on sympathetic ganglion cells. **Science**, 199: 451 (1977).
- NOETHER, G.E. : Introduction to statistics: the nonparametric way. primeira edição. Springer-Verlag, N.Y., USA. (1990).
- OKIMURA, T. & NIGO, Y. : Stress and immune responses. I. Suppression of T cell function in restraint stressed mice. **Jpn. J. Pharmacol.** 40: 505 (1986).
- OLSCHOWKA, J.A.; O'DONOHUE, T.L.; MUELLER, G.P. & JACOBOWITZ, D.M. : Hypothalamic and extrahypothalamic distribution of CRF-like immunoreactive neurons in the rat Brain. **Neuroendocrinology**, 35: 305 (1982).
- OLSEN, R.W.; YANG, J.; KING, R.G.; DILBER, A.; STAUBER, G.B. & RANSOM, R.W. : Barbiturate and benzodiazepine modulation of GABA receptor binding and function. **Life Sci.** 39: 1969 (1986).

- OOKI, T.; KOTSU, T.; KINUTANI, M. & DAIKOKU, S. : Pars intermedia of the hypophysis of rats after early-postnatal lesions of the basal hypothalamus: quantitative and qualitative observations. **Neuroendocrinology**, 11: 22 (1973).
- OSHEROFF, P.L. : The effect of thymosin and glucocorticoid receptors in lymphoid cells. **Cell. Immunol.** 60: 376 (1981).
- OSHIMI, K.; GONDA, N.; SUMIYA, M. & KANO, S. : Effect of corticosteroids on natural killer cell activity in systemic lupus erythematosus. **Clin. Exp. Immunol.** 40: 83 (1980).
- OVADIA, H.; ABRAMSKY, O.; BARAK, V.; CONFORTI, N.; SAPHIER, D. & WIEDENFELD, J. : Effect of interleukin-1 on adrenocortical activity in intact and hypothalamic deafferentated male rats. **Exp. Brain Res.** 76: 246 (1989).
- PAXINOS, G. & WATSON, C. : The rat Brain in stereotaxic coordinates, segunda edição. Academic press, Austrália. (1986).
- PERICIC, D.; MANEV, H.; BORANIC, M.; POLJAK-BLAZI, M. & LAKIC, N. : Effect of diazepam on brain neurotransmitters, plasma corticosterone, and the immune system of stressed rats. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 496: 450 (1987).
- PLOTNIKOFF, N.P.; MURGO, A.J.; MILLER, G.C.; CORDER, C.N. & FAITH, R.E. : Enkephalins: immunomodulators. **Fed. Proc. (FASEB)** 44: 118 (1985).

- PRUETT, J.H.; FISHER, W.F. & DeLOACH, J.R. : Effects of dexamethasone on selected parameters of the bovine immune system. **Vet. Res. Commun.** 11: 305 (1987).
- RABIN, B.S.; LYTE, M.; EPSTEIN, L.H.; & CAGGIULA, A.R. : Alteration of immune competency by number of mice housed per cage. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 497: 492 (1987).
- RACAGNI, G.; APUD, J.A.; COCCHI, D.; LOCATELLI, V. & MÜLLER, E.E. : GABAergic control of anterior pituitary hormone secretion. **Life Sci.** 31: 823 (1982).
- REES, L.H.; COOK, D.M.; KENDALL, J.W.; ALLEN, C.F.; KRAMER, R.M.; RATCLIFFE, J.G & KNIGHT, R.A. : A Radioimmunoassay for rat plasma ACTH. **Endocrinology**, 89: 254 (1971).
- RENOUX, G.; BIZIERE, K.; RENOUX, M.; BARDOS, P. & DEGENNE, D. : Consequences of bilateral brain neocortical ablation on imuthiol-induced immunostimulation in mice. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 496: 346 (1987).
- RICHTER, J.A., & HOLTMAN Jr, J.R. : Barbiturates: Their *in vivo* effects and potencial biochemical mechanisms. **Progress in Neurobiology**, 18: 275 (1982).

- RIVEST, S. & RIVIER, C. : Influence of the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the alteration of neuroendocrine functions induced by intermittent footshock or interleukin. **Endocrinology**, 129: 2049 (1991).
- RIVIER, C. : Effect of peripheral and central cytokines on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the rat. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 697: 97 (1993).
- RIVIER, C. & VALE, W.W. : Effects of angiotensin II on ACTH release *in vivo*: Role of corticotropin-releasing factor (CRF). **Regul. Pept.** 7: 253 (1983).
- RIVIER, C. & VALE, W.W. : In the rat, interleukin-1 α acts at the level of the brain and the gonads to interfere with gonadotropin and sex steroid secretion. **Endocrinology**, 124: 2105 (1989).
- RIVIER, C.; VALE, W. & BROWN, M. : In the rat, interleukin-1 α and beta stimulate adenocorticotropin and catecholamine release. **Endocrinology**, 125: 3096 (1989).
- ROESS, D.A.; BELLONE, C.J.; RUH, M.F.; NADEL, E.M. & RUH, T.S. : The effect of glucocorticoids on mitogen stimulated B lymphocytes: thymidine incorporation and antibody secretion. **Endocrinology**, 110: 169 (1982).
- ROOSTH, J.; POLLARD, R.B.; BROWN, S.L. & MEYER, W.J. : III. Cortisol stimulation by recombinant interferon- α 2. **J. Neuroimmunol.** 12: 311 (1986).

- ROSZMAN, T.L.; JACKSON, J.C.; CROSS, R.J.; TITUS, M.J.; MARKESBERY, W.R. & BROOKS, W.H. : Neuroanatomic and neurotransmitter influences on immune function. **J.Immunol.** 135: 769 (1985).
- ROTH, J.A. : Cortisol as a mediator of a stress associated immunosuppression in cattle. *in* Moberg G.P. ed. Animal stress. Am. Physiol. Soc., Waverley Press, Bethesda, MD, (1985).
- SAFFRAN, M. & SCHALLY, A.V. : The release of corticotropin by anterior pituitary tissue *in vitro*. **Can. J. Biochem. Physiol.** 33: 408 (1955).
- SALO, M. : Effects of anaesthesia and surgery on the immune response. **Acta Anaesthesiol. Scand.** 36: 201 (1992).
- SALO, M.; ESKOLA, J. & NIKOSKELAINEN, J. : T- and B-lymphocyte function in anesthetists. **Acta Anaesthesiol. Scand.** 28: 292 (1984).
- SAPOLSKY, R.; RIVIER, C.; YAMAMOTO, G.; PLOTSKY, P. & VALE, W. : Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. **Science**, 238: 522 (1987).
- SCHLOSSER, W. & FRANCO, S. : Modification of GABA-mediated depolarization of the cat ganglion by pentobarbital and two benzodiazepines. **Neuropharmacology**, 18: 377 (1979).

- SCHWEITZER, M. : Redistribution of leucocytes; variation in white cell counts of cats subjected to operative procedures. **Quart. J. Exp. Physiol.** 22: 295 (1932).
- SELYE, H. : A syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature**, 138: 32 (1936a).
- SELYE, H. : Thymus and adrenals in the response of the organism to injuries and intoxications. **Br. J. Exp. Pathol.** 17: 234 (1936b).
- SELYE, H. : The general adaptative syndrome and diseases of adaptation. **J. Clin. Endocrinol.** 6: 117 (1946).
- SELYE, H. : The evolution of the stress concept. **Am. Sci.** 61: 692 (1973).
- SHAVIT, Y.; LEWIS, J.W.; TERMAN, G.W.; GALE, R.P. & LIEBESKIND, J.C. : Opioid peptides mediate suppressive effect of stress on natural killer cell cytotoxicity. **Science**, 223: 188 (1984).
- SHAVIT, Y.; DEPAULIS, A.; MARTIN, F.C.; TERMAN, G.W.; PECHNICK, R.N.; ZANE, C.J.; GALE, R.P. & LIEBESKIND, J.C. : Involvement of brain opiate receptors in the immune-suppressive effect of morphine. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 83: 7144 (1986).
- SHEWARD, W.J. & FINK, G. : Effects of corticosterone on the secretion of corticotrophin-releasing factor, arginine vasopressin and oxytocin into hypophysial portal blood in long-term hypophysectomized rats. **J. Endocrinol.** 129: 91 (1991).

- SIBINGA, N.E.S. & GOLDSTEIN, A. : Opioid peptides and opioid receptors in cells of the immune system. **Ann. Rev. Immunol.** 6: 219 (1988).
- SLADE, M.S.; SIMMONS, R.L.; YUNIS, E. & GREENBERG, L.J. : Immunodepression after major surgery in normal patients. **Surgery**, 78: 363 (1975).
- SMITH, E.M.; HARBOUR-McMENAMIN, D. & BLALOCK, J.E. : Lymphocyte production of endorphins and endorphin-mediated immunomodulatory activity. **J. Immunol.** 135: 779 (1985).
- SMITH, E.M.; MORRILL, A.C.; MEYER III, W.J. & BLALOCK, J.E. : Corticotropin releasing factor induction of leukocyte derived immunoreactive ACTH and endorphins. **Nature**, 321: 881 (1986).
- SMITH, D.C.; OSTER, R.H. & SNYDEL, L. : Immediated effects of ether and nembutal upon some of the blood components in the cat. **Am.J.Physiol**, 152: 6 (1948).
- SPANGELO, B.L.; HALL, N.R.; DUNN, A.J. & GOLDSTEIN, A.L. : Thymosin fraction 5 stimulates the release of prolactin from cultured GH3 cells. **Life Sci.** 40: 283 (1987).
- STEVENSON, G.W.; HALL, S.C.; RUDNICK, S.; SELENY, F.L. & STEVENSON, H.C. : The effect of anesthetic agents on the human immune response. **Anesthesiology**, 72: 542 (1990).

- SWANSON, L.W.: The hypothalamus. *in* Handbook of chemical neuroanatomy. Bjorklund A., Hokfelt P. & Swanson L.W. eds. Elsevier. Amsterdam. (1987).
- SWANSON, L.W.; SAWCHENKO, P.E.; RIVIER, J. & VALE, W.W. : Organization of ovine corticotropin-releasing factor immunoreactive cells and fibers in the rat: an immunohistochemical study. **Neuroendocrinology**, 36: 165 (1983).
- TESHIMA, H.; SOGAWA, H.; KIHARA, H.; NAGATA, S; AGO, Y. & NAKAGAWA, T.: Changes in populations of T-cell subsets due to stress. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 496: 459 (1987).
- THOMPSON, R.C.; SEASHOLTZ, A.F.; DOUGLASS, J.O. & HERBERT, E. : The rat corticotropin-releasing hormone gene. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 512: 1 (1987).
- TONNENSEN, E.; BRINKLOV, M.M.; CHRISTENSEN, N.J.; OLESEN, A.S. & MADSEN, T. : Natural killer cell activity and lymphocyte function during and after coronary artery bypass grafting in relation to the endocrine stress response. **Anesthesiology**, 67: 526 (1987).
- TONNENSEN, E. & WAHLGREEN, C. : Influence of extradural and general anaesthesia on natural killer cell activity and lymphocyte sub-populations in patients undergoing hysterectomy. **Br. J. Anaesth.** 60: 500 (1988).

- TSAGARAKIS, S.; GILLIES, G.; REES, L.H.; BESSER, M. & GROSSMAN, A. : Interleukin-1 directly stimulates the release of corticotrophin releasing factor from rat hypothalamus. **Neuroendocrinology**, 49: 98 (1989).
- TZENG, S. & HO, I.K. : Effects of acute and continuous pentobarbital administration on the gamma-aminobutyric acid system. **Biochem. Pharmacol.** 26: 699 (1977).
- UEHARA, A.; GOTTSCHALL, P.E.; DAHL, R.R. & ARIMURA, A. : Interleukin-1 stimulates ACTH release by an indirect action which requires endogenous corticotropin-releasing factor. **Endocrinology**, 121: 1580 (1987).
- USENIK, E.A. & CRONKITE, L.P. : Effects of barbiturate anesthetics on leucocytes in normal and splenectomised dogs. **Anesth. Analg.** 44: 167 (1965)
- VALE, W.; SPIESS, J; RIVIER, C. & RIVIER, J. : Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates secretion of corticotropin and beta-endorphin. **Science**, 213: 1394 (1981).
- VAN EPPS, D.E. & SALAND, L. : Beta-endorphin and met-enkephalin stimulate human peripheral blood mononuclear cell chemotaxis. **J. Immunol.** 132: 3046 (1984).
- WALTON, B. : Effects of anaesthesia and surgery on immune status. **Br. J. Anaesth.** 51: 37 (1979).

- WEIGENT, D.A. & BLALOCK, J.E. : Interactions between the neuroendocrine and immune systems: Common hormones and receptors. **Immunol. Rev.** 100: 79 (1987).
- WEISSMAN, C. : The metabolic response to stress: an overview and update. **Anesthesiology**, 73: 308 (1990).
- WHELAN, P. & MORRIS, P.J. : Immunological responsiveness after transurethral resection of the prostate: general versus spinal anesthetic. **Clin. Immunol.** 48: 611 (1982).
- WIDEMAN, C.H. & MURPHY, H.M. : Effects of vasopressin deficiency, age and stress on stomach ulcer induction in rats. **Peptides**, 6: 63 (1985).
- WOLOSKI, B.M.R.N.J.; SMITH, E.M.; MEYER III, W.J.; FULLER, G.M. & BLALOCK, J.E. : Corticotropin-releasing activity of monokines. **Science**, 230: 1035 (1985).
- YAMADA, T. & GREER, M.A. : The effect of bilateral ablation of the amygdala on endocrine function in the rat. **Endocrinology**, 9: 565 (1959).
- YASUDA, N.; TAKEBE, K. & GREER, M.A. : Evidence of nycterohemeral periodicity in stress-induced pituitary-adrenal activation. **Neuroendocrinology**, 21: 214 (1976).
- YOUNG III, W.S. : Corticotropin-releasing factor mRNA in the hypothalamus is affected differentially by drinking saline and by dehydration. **FEBS lett.** 208: 158 (1986).
- ZIMMERMANN, E. & CRITCHLOW, V. : Effects of diurnal variation in plasma corticosterone levels on adrenocortical response to stress. **Proc. Soc. exp. Biol. Med.** 125: 658 (1967).