

Centro Universitário Feevale
Programa de Pós - Graduação em Gestão Tecnológica:
Mestrado em Qualidade Ambiental

Elenluci Fontoura Bastos

**EFEITO NEUROIMUNOMODULADOR DA FLUOXETINA EM MODELO DE
ESTRESSE AMBIENTAL: AVALIAÇÕES IMUNOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS.**

Novo Hamburgo, 2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Centro Universitário Feevale
Programa de Pós-Graduação em Gestão Tecnológica:
Mestrado em Qualidade Ambiental

Elenluci Fontoura Bastos

**EFEITO NEUROIMUNOMODULADOR DA FLUOXETINA EM MODELO DE
ESTRESSE AMBIENTAL: AVALIAÇÕES IMUNOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS.**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Gestão Tecnológica
como requisito para a obtenção do título de mestre em Gestão Tecnológica:
Qualidade Ambiental**

Orientador: Prof.^a Dr.^a Patrícia Grolli Ardenghi

Co-orientador: Prof.^a Dr.^a Edna Sayuri Suyenaga

Novo Hamburgo, 2007

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

Bastos, Elenluci Fontoura

Efeito neuroimunomodulador da fluoxetina em modelo de estresse ambiental: avaliações imunológicas e bioquímicas / Elenluci Fontoura Bastos. – 2007.

61 f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Qualidade Ambiental) – Programa de Pós-Graduação em Gestão Tecnológica: Mestrado em Qualidade Ambiental, Centro Universitário Feevale, Novo Hamburgo.

Inclui bibliografia.

“Orientador: Dr^a Patrícia Grolli Ardenghi ; Co-orientador: Dr^a Edna Sayuri Suyenaga”.

1. Stress (psicologia) 2. Estresse crônico 3. Pleurisia 4. Medicamentos I.
Título

CDU 616.25-002

Bibliotecária responsável: LÍlian Amorim Pinheiro – CRB 10/1574

**Centro Universitário Feevale
Programa de Pós - Graduação em Gestão Tecnológica:
Qualidade Ambiental**

Elenluci Fontoura Bastos

**EFEITO NEUROIMUNOMODULADOR DA FLUOXETINA EM MODELO DE
ESTRESSE AMBIENTAL: AVALIAÇÕES IMUNOLÓGICAS E BIOQUÍMICAS**

Dissertação de mestrado aprovada pela banca examinadora em 30 de março de 2007,
conferindo ao autor o título de mestre em Gestão Tecnológica: Qualidade Ambiental.

Componentes da Banca Examinadora:

Prof^ª Dr^ª Patrícia Grolli Ardenghi
Feevale - Orientadora

Prof^ª Dr^ª Giovana Duzzo Gamaro
Feevale-Examinadora

Prof^ª Dr^ª Adriana Simon Coitinho
Feevale - Examinadora

(dedicatória).....

A Lucelen e o Rodrigo.

A minha mãe pela força espiritual.

Ao César pelo companheirismo.

Ao Tio Gilson pelo apoio.

Aos meus irmãos e sobrinhos pela preocupação

Ao meu pai

Agradecimentos:

A minha orientadora Patrícia Ardenghi pelo carinho e dedicação.

A minha amiga Fairus pelo apoio e incentivo.

As bolsistas Michelle, Joice e Milene pela eficiência.

Ao centro Universitário Feevale pela estrutura proporcionada para a realização desse trabalho.

A equipe técnica do laboratório Exame

A Deus por me levar nos braços nas horas mais difíceis.

“Sofremos em demasia pelo pouco que nos falta e alegamo-nos pouco pelo muito que temos”... (William Shakespeare)

Sumário

RESUMO.....	IX
ABSTRACT.....	X
RELAÇÃO DE FIGURAS.....	XI
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	XII
1 . INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 NEUROIMUNOMODULAÇÃO	3
2.2 EIXO HIPOTALÂMICO - PITUITÁRIO - ADRENAL (HPA).....	4
2.3 COMUNICAÇÃO BIDIRECIONAL ENTRE OS SISTEMAS NEUROENDÓCRINO E IMUNE	5
2.4 CORTISOL E O ESTRESSE:.....	8
2.5 PROTEÍNA C REATIVA COMO MARCADOR INFLAMATÓRIO	9
2.6 FLUOXETINA	10
2.7 ESTRESSE, DANO CELULAR E TECIDUAL	15
3. OBJETIVOS	18
3.1 OBJETIVO PRINCIPAL	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	19
4.2 PROTOCOLO DE ESTRESSE	19
4.3 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO.....	20
4.4 INDUÇÃO DE PLEURISIA E DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS NO EXSUDATO PLEURAL	20
4.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS.....	20
4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	22
5. RESULTADOS.....	23
5.1 Efeito dos diferentes tratamentos sobre a migração leucocitária no exsudato após o processo inflamatório causado pela carragenina	23
5.2 Avaliação da influência do estresse crônico variável nos diferentes tratamentos sobre a atividade enzimática e níveis de PCR	28

6. DISCUSSÃO	37
7. CONCLUSÃO	41
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

RESUMO

O sistema imunológico e o sistema neuroendócrino são essenciais para a manutenção das respostas fisiológicas garantindo a homeostasia do organismo. A comunicação química entre estes sistemas ocorre através de citocinas, neurotransmissores e hormônios peptídeos que atuam simultaneamente em receptores específicos. Os eventos estressantes podem afetar o sistema imune trazendo conseqüências e transtornos a saúde e diversos estudos têm procurado um melhor entendimento das alterações que o estresse pode ocasionar a saúde humana. A fluoxetina (FLX) é um dos fármacos usado nessas pesquisas devido ao seu efeito na modulação dos transtornos do humor e da atividade do sistema imune. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação da FLX sobre a resposta inflamatória de ratos submetidos a estresse crônico variável e posterior indução de pleurisia pela carragenina. Os animais foram divididos em quatro grupos: controle salina, controle FLX, estresse salina e estresse FLX. A FLX foi administrada i.p. na dose de 20 mg/kg. Os tratamentos foram realizados durante 10, 20 e 30 dias, com a finalidade de avaliar diferentes tempos de exposição ao estresse. Foram analisadas as contagens total e diferencial de leucócitos do exsudato pleural após 4h da indução do processo inflamatório, além da atividade de enzimas transaminase oxalacética (AST), transaminase pirúvica (ALT), lactato desidrogenase (LDH), creatina quinase (CK) e de proteína C reativa (PCR) no plasma. Os resultados da pleurisia demonstraram uma redução no total de leucócitos tanto no grupo estresse FLX como no controle FLX comparados ao grupo controle salina em 10 e 30 dias de exposição. Na contagem diferencial foi observada uma diminuição dos fagócitos mononucleares (MN) no período 10 dias de exposição no grupo estresse FLX em relação ao controle salina. Em relação aos fagócitos polimorfonucleares (PMN) foi observado que os grupos estresse FLX e controle FLX diminuíram em relação ao grupo controle salina nos períodos de 10 e 30 dias de exposição. No período de 20 dias de exposição foi observada diminuição dos PMN nos grupos estresse FLX e controle FLX em relação ao grupo estresse. Nas dosagens bioquímicas avaliadas foi verificada a redução de CK nos períodos 10 e 20 dias no grupo estresse FLX em relação ao grupo controle salina. A LDH diminuiu no grupo estresse FLX em relação ao controle salina e ao controle FLX nos períodos de 10 e 30 dias de exposição. A atividade da ALT aos 10 e 30 dias de tratamento diminuiu no grupo estresse FLX em relação ao grupo controle salina e nos 30 dias de exposição diminuiu no grupo estresse FLX em relação ao grupo estresse. No período de 20 dias de exposição não variou em relação aos diferentes tratamentos. Em relação atividade da AST somente houve uma diminuição significativa no período 20 dias do grupo estresse FLX em relação aos grupos controle salina e estresse. Nas dosagens da PCR os animais do grupo estresse FLX apresentaram os seus valores diminuídos em relação ao grupo controle salina (10 dias) e em relação ao grupo estresse (30 dias). No período 10 dias o grupo FLX apresentou valores diminuídos em relação ao controle salina. Os resultados mostraram que o estresse inibiu a resposta inflamatória natural medida através da contagem das células do exsudato após a pleurisia, onde os animais tratados com FLX e estressados mostraram uma menor migração leucocitária no local da inflamação. Os resultados enzimáticos mostraram que a redução do processo inflamatório protegeu a integridade celular.

Palavras - chave: estresse crônico variável, fluoxetina, inflamação, pleurisia.

ABSTRACT

The immune system and the neuroendocrine systems are essential for the maintenance of physiological responses, ensuring homeostasis. The chemical communication among these systems is made by cytokines, neurotransmitters, and peptide hormones, which simultaneously act on specific receptors. Stressful events may affect the immune systems impact health, and several studies have tried to better understand the human health changes caused by stress. Fluoxetine (FLX) is one of the pharmaceutical substances used in these research studies due to its effects on mood disorder modulation and immune system activity. This study aimed at evaluating FLX action on the inflammatory response of rats submitted to variable chronic stress and subsequent induction of pleurisy by carrageenin. Rats were divided into four groups: saline control, FLX control, saline stress, and FLX stress. FLX was administered i.p. at 20 mg/kg for 10, 20, or 30 days, aiming at evaluating different durations of stress exposure. Total and differential leukocyte counts in the pleural exudate were performed 4h after inflammatory process induction, and the activity of the enzymes oxalacetic transaminase (STA), pyruvic transaminase (ALT), lactate dehydrogenase (LDH), creatinine kinase (CK), and C-reactive protein (CRP) was measured in the plasma. Pleurisy results showed that a reduction in total leukocytes both in the FLX stress and FLX control groups as compared to the saline control group at 10 and 30 days of stress exposure. In differential leukocyte counts, there was a reduction in mononuclear phagocytes (MN) at 10 days of exposure in the FLX stress group as compared to saline control group. Polymorphonuclear phagocyte (PMN) counts were lower in FLX stress and FLX control as compared to the saline control group at 10 and 30 days of stress exposure. At 20 days of exposure, PMN counts were lower in FLX stress and FLX control as compared to the stress group. Biochemical dosages revealed a reduction in CK at 10 and 20 days of exposure in the FLX stress group as compared to the saline control. LDH decreased in the FLX stress groups as compared to saline control and to FLX control at 10 and 30 days of exposure. ALT activity at 10 and 30 days was lower in the FLX stress group than in the saline control group and lower in the FLX stress group than in the saline stress group at 30 days of exposure. No ALT differences among treatments were observed at 20 days. As to AST, only a significant increase was observed at 20 days of exposure for the FLX stress group relative to saline control and saline stress groups. CRP levels in the FLX stress group were lower than in the saline control (10 days) and saline stress (30 days) groups. At 10 days of exposure, the FLX stress group presented lower CRP values as compared to the stress control group (30 days). At 10 days of exposure, FLX and FLX stress presented lower CRP values than the saline control group. Results showed that stress inhibited natural inflammatory response, as measured by exudate cell counts after pleurisy induction, with stressed animals treated with FLX presenting lower leukocyte migration to the inflammatory site. Enzyme results showed that this reduction of the inflammatory process protected cell integrity.

Keywords: variable chronic stress, fluoxetine, inflammation, pleurisy.

Relação de figuras

Figura 1	Estrutura da fluoxetina	Pág.10
Figura 2	Efeito do estresse crônico variado 10 dias sobre o exsudato	Pág.24
Figura 3	Efeito do estresse crônico variado 20 dias sobre o exsudato	Pág.25
Figura 4	Efeito do estresse crônico variado 30 dias sobre o exsudato	Pág.25
Figura 5	Tratamento salina sobre o exsudato pleural após indução do processo inflamatório	Pág.26
Figura 6	Tratamento salina e estresse sobre o exsudato pleural após indução do processo inflamatório	Pág.27
Figura 7	Tratamento fluoxetina sobre o exsudato pleural após indução do processo inflamatório	Pág.27
Figura 8	Tratamento fluoxetina e estresse sobre o exsudato pleural após indução do processo inflamatório	Pág.28
Figura 9	CK em relação aos diferentes tratamentos e períodos	Pág.29
Figura 10	LDH nos diferentes tratamentos e períodos	Pág.32
Figura 11	AST nos diferentes tratamentos e períodos	Pág.33
Figura 12	ALT nos diferentes tratamentos e períodos.	Pág.35
Figura 13	PCR nos diferentes tratamentos e períodos	Pág.36

Índice de Abreviaturas

AST	Transaminase oxalacética
ALT	Transaminase pirúvica
CK	Creatinina quinase
CK-MB	Creatinina quinase fração MB
Con A	Concavalina
CRH	Hormônio liberador da corticotropina
CRH-1	Receptor 1 do hormônio liberador da corticotropina
GC	Glicocorticóides
HPA	Eixo Hipotalâmico Pituitário Adrenal
i.p	Intraperitoneal
ISRS	Inibidores seletivos da recaptção da serotonina
IL-1 β	Interleucina 1 Beta
IL-6	Interleucina 6
IL-4	Interleucina 4
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
LDH	Lactato desidrogenase
LDL	Colesterol de baixa densidade
MN	Mononucleares
NK	Células assassinas naturais
NSAIDS	Drogas antiinflamatórias não esteroidais
PCR	Proteína C reativa
PMN	Polimorfonuclear
PKC	Proteína Kinase
SNC	Sistema nervoso Central
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa

1 . INTRODUÇÃO

A preservação da saúde depende de mecanismos que incluem a inter-relação entre vários órgãos. Evidências comprovam que os desvios da homeostasia causados pelo estresse podem ocorrer como consequência da influência de vários tipos de agentes, que podem ser provenientes do ambiente podendo ser classificados em químicos, físicos ou psicológicos. Sabe-se que existem comunicações entre os sistemas nervoso, imune e endócrino (Lawrence e Kim, 2000).

Uma das consequências da exposição do organismo ao estresse está a liberação de glicocorticóides (GC) pela supra-renal, ocasionada pela ativação do eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (HPA). Os GC possuem várias funções e entre elas a de preparar o organismo para desafios fisiológicos ou ambientais sendo importantes para a consolidação da resposta ao estresse. A persistência e a intensidade da exposição ao estresse, bem como a incapacidade do organismo em elaborar uma resposta efetiva sobre ele, podem levar a hiper-reatividade do eixo HPA, com prejuízos potenciais ao organismo (Regiane et al., 2003).

Está postulado que fatores psicológicos como emoções, estresse, experiências de vida, podem produzir alterações na função imune através da mediação do sistema neuroendócrino (Núñez et al., 2005).

Pesquisas com intervenções psicofarmacológicas, têm sido realizadas com a finalidade de estudar os efeitos do estresse sobre o indivíduo. Deste modo, buscando um melhor conhecimento para evitar ou amenizar as consequências negativas causadas pela exposição do indivíduo ao estresse. Nesses experimentos, a fluoxetina é bastante utilizada sendo o fármaco de primeira linha usado no tratamento da depressão. A fluoxetina pertence à classe dos inibidores seletivos da recaptção da serotonina (ISRS), e em alguns modelos experimentais tem demonstrado possuir propriedades modulatórias e analgésicas (Kubera et.al., 2004).

A ativação do eixo HPA tem efeitos supressores sobre a resposta imune/inflamatória, pois o estresse inibe vários componentes da resposta imune como: alterações no tráfego e função dos leucócitos; diminuição da produção de citocinas e mediadores da inflamação (Ainamo, 1976).

No nosso estudo, analisamos a resposta inflamatória celular em animais submetidos ao modelo de estresse crônico variável mediante a indução de um processo inflamatório causado pela carragenina. Da mesma forma, nos mesmos animais foram feitas análises bioquímicas com a finalidade de avaliar os efeitos do estresse e inflamação sobre a integridade celular.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 NEUROIMUNOMODULAÇÃO

O interesse na interação entre os sistemas imune e nervoso, ou mais especificamente, em como os pensamentos e emoções podem afetar o sistema imune tem aumentado nos últimos anos (Black, 1994). Neste contexto, as pesquisas têm procurado buscar um melhor entendimento das alterações imunológicas causadas por eventos estressantes e de que forma essas conseqüências e transtornos podem influenciar a saúde do indivíduo (Glaser e Kiecolt, 2005).

O termo estresse, primeiramente empregado por Hans Selye em 1936, descreve uma ameaça real ou potencial a homeostasia (Regiane et al., 2003), podendo também ser definido como qualquer estímulo físico ou psicológico que perturbe o equilíbrio do organismo (Silverman et al., 2005). As alterações causadas pelo estresse dependem da natureza e da intensidade do agente estressor (MC Ewen e Stellar, 1993).

O estresse é uma experiência comum no nosso dia-a-dia. Imposições e percepções ambientais ou físicas, quando negativas geram uma ameaça e, quando positivas uma recompensa, causando uma série de alterações, que podem ser adaptativas ou estressoras ao organismo exposto (Herman e Culliman, 1997).

O estresse psicológico é reconhecido como inevitável em nossas vidas, sendo uma conseqüência da inter-relação entre o indivíduo e o ambiente. Podem ser citados quatro tipos de eventos estressores: agudos, seqüenciais, crônicos intermitentes e crônicos, que são representados por eventos que persistem continuamente por um longo período (Lazarus e Folkman, 1984). Nas situações estressantes o nosso organismo pode elaborar respostas normais ou levar a estados de depressão, sendo considerados psicopatológicos apenas quando se estendem demasiadamente ou quando são desproporcionais ao evento causador (Nemeroff e Heim, 2001).

Há evidências de que o estresse psicológico possa afetar o sistema imune, diminuindo a eficácia das células assassinas naturais (NK), dos linfócitos T-citotóxicos e dos fagócitos e da resposta dos anticorpos T-dependentes (Núñez et al., 2006).

O comprometimento do sistema imune tem sido associado a eventos em que pessoas tenham passado por situações ameaçadoras, como por exemplo, desastres ambientais (terremotos, entre outros) (Glaser e Kiecol, 2005). Em pacientes deprimidos, já foi observado um estado de imunossupressão relacionado ao aumento na incidência

de câncer após a exposição desses indivíduos a carcinógenos ambientais (Linkins e Comstock, 1990).

O Sistema Nervoso Central (SNC) possui um importante papel modulador da resposta imune. Anormalidades funcionais do SNC podem produzir alterações no sistema imune trazendo como consequência danos significativos à saúde. Da mesma forma, anormalidades no sistema imune podem também gerar patologias no SNC (Plotnikoff et al., 1991; Mc Ewen e Stellar, 1993; Glaser e Kiecolt, 2005).

Nos últimos anos, o uso de novas metodologias tem permitido um melhor esclarecimento das interações entre SNC e o sistema imune. Modelos experimentais têm sido realizados em animais com a finalidade de evidenciar os efeitos do estresse sobre os sistemas imune, endócrino e nervoso (Heninger, 1995).

2.2 EIXO HIPOTALÂMICO - PITUITÁRIO - ADRENAL (HPA)

Está postulado que, fatores psicológicos como emoções, estresse, experiências de vida e mudanças causadas pelo impacto ambiental aos seres vivos, podem produzir anormalidades na função imune através da mediação do sistema neuroendócrino (Ader et al., 2003).

O estresse está associado com a ativação do eixo HPA e, acredita-se, também, que citocinas e mediadores humorais de inflamação são ativadores potentes da resposta central do estresse (Silverman et al., 2005). As citocinas inflamatórias TNF- α , IL1- β e IL-6 (principalmente em estresse crônico) podem ativar o eixo HPA podendo atuar isoladamente ou em sinergismo umas com as outras (Tsigos, 2002). A ativação do eixo HPA começa com a liberação do hormônio liberador da corticotropina (CRH) originado dos núcleos paraventriculares do hipotálamo sendo liberado na circulação do portal da hipófise (Black, 1994; Heninger, 1995; Herman e Culliman, 1997; Silverman, 2005). O CRH retorna, agindo no receptor CRH-R1 (receptor 1 do hormônio liberador da corticotropina) da hipófise estimulando a rápida liberação do hormônio adrenocorticotrópico (ACTH) armazenado nas células. O ACTH é liberado na circulação periférica e estimula a liberação de glicocorticóides (cortisol em humanos e corticosterona em ratos) pelo córtex adrenal (Jasper e Engeland, 1994; Shlomo, 2001).

Várias células nucleadas, no organismo humano, expressam receptores de glicocorticóides, difundindo seus efeitos em praticamente todos os sistemas do corpo como o nervoso, o cardiovascular e o imune (Silverman, 2005).

A resposta ao estresse pelo sistema HPA envolve várias regiões cerebrais que incluem inervações adrenérgicas da medula cerebral, pontos do locus coeruleus, amígdala, córtex cerebral e hipocampo (Szafarczyk, 1985; Jacobson e Sapolsky, 1991).

2.3 COMUNICAÇÃO BIDIRECIONAL ENTRE OS SISTEMAS NEUROENDÓCRINO E IMUNE

Diversos estudos têm demonstrado que o sistema imune pode influenciar no SNC existindo um circuito entre esses dois sistemas (Licino e Wong, 1997).

A resposta imune é composta de várias etapas e, com o propósito de um melhor entendimento da relação entre o agente estressor e o sistema imune, é importante inicialmente distinguir os dois tipos de resposta imune: natural e específica.

A imunidade natural é a resposta inespecífica ao agente patogênico, envolve células capazes de atacar uma grande diversidade de patógenos sendo a sua ação rápida e ativada em minutos ou horas (Segerstrom e Miller, 2004). Essas células incluem os neutrófilos e os macrófagos, células fagocíticas que englobam seu alvo desencadeando uma inflamação caracterizada pela sua concentração no local do ferimento ou da infecção. Os macrófagos também liberam proteínas de comunicação celular, as citocinas, que possuem um amplo efeito no organismo, incluindo febre e aumento da inflamação. As citocinas pró-inflamatórias incluem, principalmente, as interleucinas IL-1, IL-6, IL-1 β e o fator de necrose tumoral (TNF α) (Benjamim et al., 2000).

Outra célula envolvida na imunidade natural é a célula NK, ativada nas infecções virais e tumores, capaz de lisar as células infectadas liberando substâncias tóxicas. As células NK são importantes na primeira fase das infecções, antes da ativação da imunidade específica, atuando no ataque a células invadidas por vírus ou que estejam em processo de malignização (Janeway e Travers, 1997).

As grandes sinalizadoras entre os sistemas nervoso e imune são as citocinas que interagem com o sistema nervoso de várias formas sendo expressas dentro do SNC e possuindo um importante papel na integridade e sobrevivência das células nervosas (Aloisi et al., 1997). Durante a inflamação, citocinas liberadas por células imunes podem estimular uma variedade de processos fisiológicos, neuroendócrinos e respostas comportamentais do SNC, incluindo: febre, sono, ativação do eixo HPA, doenças e outras alterações comportamentais (Sternberg, 1977).

A comunicação bi-direcional entre o sistema imune e neuroendócrino foi mostrada em vários trabalhos. Em um deles foi demonstrada a síntese/expressão de ligantes e receptores comuns ao sistema imune e neuroendócrino como, por exemplo, a ação de neuropeptídeos em células imunes e de citocinas nas glândulas endócrinas (Blalock, 1994).

Anteriormente, em 1850, Thomas Addison descreveu um paciente com insuficiência adrenal apresentando um excesso de linfócitos circulantes, sendo essa uma das primeiras evidências da relação entre os hormônios adrenais e parâmetros imunológicos.

Em 1940, Philip Hench descobriu que, pacientes com desordens autoimunes, como artrite reumatóide, produziam substâncias endógenas em condições de estresse com propriedades antiinflamatórias e imunossupressoras capazes, portanto, de melhorar os sintomas de doenças autoimunes. Com o isolamento, e a caracterização, dessas substâncias endógenas foram descobertos os esteróides adrenais como a cortisona e outros glicocorticóides (GC) usados no tratamento das doenças inflamatórias (Silverman et al., 2005).

Besedovsky e colaboradores associaram o papel fisiológico dos GC na regulação da resposta imune, sendo um dos primeiros grupos de pesquisa a demonstrar que a atividade do sistema imune pode influenciar na liberação de GC. (Besedovsky et al., 1981; Besedovsky et al., 1985).

Os glicocorticóides liberados pelas glândulas adrenais exercem um importante papel modulatório nas funções neuroendócrinas, sendo seus receptores encontrados em várias regiões tendo como efeitos específicos:

- Aumento dos níveis de glicose através da estimulação da gliconeogênese no fígado, inibindo a secreção de insulina e estimulando a lipólise.
- Decréscimo da atividade inflamatória e imune.
- Indução do número de enzimas e proteínas, como por exemplo, a indução do citocromo P-450 hepático, sugerindo a ação dos GC no processo de detoxificação (Munck et al., 1984; Michelson et al., 1995).

A inflamação e a resposta inflamatória são moduladas pela comunicação bidirecional entre os sistemas neuroendócrino e imune. O SNC sinaliza o sistema imune através de caminhos hormonais, incluindo o eixo HPA e hormônios neuroendócrinos liberados na resposta ao estresse, e de vias neuronais, incluindo o sistema nervoso

autônomo. O sistema imune sinaliza o SNC através de mediadores imunes e citocinas que podem atravessar a barreira hematoencefálica, ou sinalizando indiretamente através do nervo vago ou de mensageiros secundários (Glaser e Kiecolt, 2005).

As citocinas secretadas por células imunes ativadas provocam uma resposta do SNC e, da mesma forma, neurotransmissores envolvidos na atividade do SNC podem causar alterações imunológicas (Black, 1994).

Os efeitos fisiológicos e patofisiológicos da sinalização do SNC pelo sistema imune, e da modulação do sistema imune pelo SNC, são muito complexos e estão sendo estudados recentemente. Sabe-se que os órgãos imunes, incluindo baço, timo, medula e linfonodos são densamente inervados por vários componentes dos sistemas nervoso, periférico e autônomo (Brenneman et al., 1995).

Os organismos em que a conexão neuroendócrina-imune está prejudicada apresentam um aumento da susceptibilidade a infecções devido à inibição da resposta imune (Sterberg, 1997).

Existem várias rotas onde as citocinas periféricas podem atravessar direta ou indiretamente a barreira hematoencefálica sinalizando o cérebro (Licino e Wong, 1997).

- Através de tecidos periféricos que são inervados pelo Sistema Nervoso Periférico e Autônomo podendo enviar sinais diretamente para o cérebro via nervos periféricos.
- Pela vascularização cerebral podendo enviar sinais através de mensageiros secundários, como o óxido nítrico.
- Agindo diretamente no nível do parênquima cerebral após atravessar a barreira hematoencefálica.

O SNC, durante o processo inflamatório, é modulado não somente por citocinas originadas de sítios periféricos, mas, também, por citocinas sintetizadas no cérebro. Genes codificadores de uma variedade de citocinas e de seus receptores, inicialmente identificados no sistema imune periférico, são expressos representativamente no cérebro, indicando que várias citocinas podem contribuir para o funcionamento normal do SNC (Licino e Wong, 1994).

A regulação neuroendócrina é essencial para a sobrevivência durante o estresse ou infecções, e para a modulação da resposta imune nas doenças inflamatórias (Eskandari et al., 2003).

2.4 CORTISOL E O ESTRESSE:

Como descrito anteriormente, a exposição do organismo a agentes estressores provoca alterações comportamentais e fisiológicas no indivíduo, como principal consequência, está à liberação de glicocorticóides pela supra-renal (Herman e Culliman, 1997).

Os GC têm a função de preparar o organismo para desafios fisiológicos ou ambientais, e são importantes para a elaboração da resposta ao estresse. Com a exposição persistente e intensa ao estresse, e a incapacidade do organismo em consolidar uma resposta efetiva, pode haver uma hiper-reatividade do eixo HPA, trazendo como consequência prejuízos ao organismo. (Regiane et al., 2003). O principal GC produzido é o cortisol (humanos) ou corticosterona (ratos) que possuem um importante papel regulatório da função imune. Inicialmente, acreditava-se que seu papel era exclusivamente imunossupressivo. Entretanto, estudos mais recentes indicam que eles são classificados mais corretamente como imunomodulatórios (Sternberg, 1997). Os glicocorticóides não suprimem uniformemente a produção de todas as citocinas, mas parecem atuar de forma seletiva inibindo algumas, enquanto estimulam a produção de outras. Em ensaios laboratoriais, utilizando sangue humano, com estimulação de citocinas e supressão de glicocorticóides, várias citocinas mostraram diferentes sensibilidades à supressão por glicocorticóides. Nesta amostra, uma maior sensibilidade foi observada nas IL-12, TNF- α e IL-1, sendo a IL-6 relativamente resistente à supressão por GC (Derijk et al., 2001), em roedores, concentrações fisiológicas de glicocorticóides estimulam IL-4 e IL-10 (Sternberg, 1997).

O estresse parece ser um dos principais fatores ambientais que predispõem o indivíduo à depressão. Nos pacientes com depressão, o controle inibitório sobre a atividade do eixo HPA está comprometido, podendo tais indivíduos apresentar dosagens séricas elevadas de cortisol (Regiane et al., 2003).

Uma das principais regiões cerebrais envolvidas na resposta ao estresse é o hipocampo. Ele possui grande densidade de receptores de GC que, quando ativados, inibem a atividade do eixo HPA (Herman e Culliman 1997). Em pacientes deprimidos, o aumento de cortisol está relacionado à atrofia hipocampal (Lupien et al., 1998). Essa alteração pode ser prevenida com o uso de drogas antidepressivas, que sendo usadas de forma crônica, aumentam a neurogênese (Duman et al., 2001).

2.5 PROTEÍNA C REATIVA COMO MARCADOR INFLAMATÓRIO

A proteína C reativa (PCR) é uma proteína plasmática de fase aguda de inflamação sintetizada pelo fígado que induz diversos processos do sistema imune, entre eles o complemento e a fagocitose. As suas concentrações podem mudar rapidamente em resposta a eventos anormais que provoquem distúrbios da homeostasia, como: infecção, dano tecidual e trauma. O aumento das concentrações das proteínas de fase aguda é ocasionado pela maior liberação das citocinas pró-inflamatórias da resposta inata (IL-1, IL-6, e TNF- α) causando febre, leucocitose, mudanças na permeabilidade vascular e aumento na resposta metabólica. A elaboração adequada da resposta imune inata previne futuro dano tecidual, isolando e destruindo patógenos e ativando o processo de reparo (Hsin et al., 2003). A maioria dos processos que danificam os tecidos, como as infecções, doenças inflamatórias e as neoplasias malignas, está associada a um aumento nos níveis de proteína C reativa circulantes (Pepys, 1983). Esse aumento antecede, com frequência, aos sintomas clínicos e, em indivíduos saudáveis, é uma proteína de fase aguda vestigial, aparecendo precocemente em processos inflamatórios como, por exemplo, danos ateroscleróticos. Na resposta à fase aguda de inflamação, a concentração de PCR aumenta rapidamente sendo detectáveis alterações no prazo de até 8 horas após o início do evento inflamatório, e o seu valor máximo é atingido no prazo de 24 a 48 horas. As alterações de sua concentração proporcionam informações úteis para o diagnóstico e avaliação da gravidade da doença. A persistência de uma concentração sérica elevada de PCR é, normalmente, um sinal de prognóstico grave que, geralmente, indica a presença de infecção não controlada (Bowman, 1993).

Vários estudos têm mostrado uma associação entre a depressão e o aumento de PCR, podendo essa evidência representar uma ligação entre o processo fisiológico e o psicológico. Esses trabalhos demonstraram que a depressão induz a uma inflamação sistemática, aumentando os níveis de citocinas inflamatórias, como a IL-6 e proteínas de fase aguda, como a PCR (Danner et al., 2003; Dressler et al. 2006).

Um trabalho realizado por Dressler e cols. (2006), estudou a associação dos sintomas da depressão aos níveis plasmáticos de PCR. Foram avaliados 271 indivíduos, incluindo homens e mulheres, sendo observada uma relação significativa entre os sintomas da depressão e o aumento da PCR nos homens, enquanto que nas mulheres esta relação foi inversa. Essa associação, positiva para os homens, foi independente do

índice de massa corporal e dos valores de colesterol LDL, podendo estar relacionada à variação dos hormônios sexuais como resposta ao estresse e a resposta imune. Outro fator que pode ter contribuído para esta diferença é de que, nas mulheres devido a fatores culturais e ambientais, a demonstração do sentimento na depressão é mais freqüente, podendo diminuir o impacto da ativação do eixo HPA resultando, nestes casos, em melhor funcionamento do sistema imune e diminuição da inflamação crônica.

A associação entre episódios de depressão maior e a presença do aumento dos níveis de PCR foi avaliada em uma amostra de 6149 adultos jovens nos Estados Unidos, incluindo africanos e mexicanos. O resultado desse trabalho também demonstrou que além da depressão estar associada ao aumento da PCR, esses indivíduos possuem um forte fator de risco de desenvolvimento de doenças ateroscleróticas (Danner et al., 2003).

2.6 FLUOXETINA

A fluoxetina é atualmente o fármaco mais usado no tratamento de desordens psiquiátricas (depressão, esquizofrenia, síndrome do pânico, agorafobia) e metabólicas (bulimia nervosa, tensão pré-menstrual). Além disso, esse fármaco também pode ser utilizado na dor crônica e neuropática (Fatima et al., 2005).

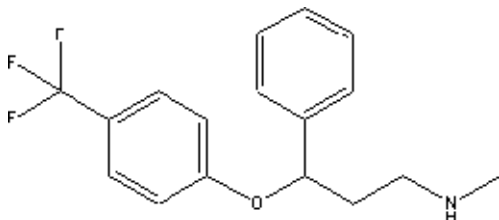


Figura 1: Estrutura da fluoxetina

A fluoxetina é um inibidor seletivo da recaptção da serotonina e tem sido o fármaco de primeira linha na escolha do tratamento da depressão devido à sua boa tolerabilidade e poucos efeitos colaterais comparados aos antidepressivos tricíclicos e inibidores da monoaminoxidase (MAO) (Pellegrino e Bayer, 1993).

Em estudos com animais, essa classe de antidepressivos demonstrou possuir propriedades analgésicas, nociceptivas e antiinflamatórias, demonstrando a propriedade de modular a resposta imune. Nesses experimentos, a sua administração tem sido feita através de rotas sistemáticas, tais como: intraperitoneal, subcutânea, intravenosa e oral.

Os resultados têm sido variáveis devido a diferentes fatores como: agente específico usado, dose, via de administração, dosagem de escolha e duração do tratamento (agudo ou crônico) (Sawynok et al., 2001). O mecanismo pelo qual a fluoxetina age como antiinflamatório não está bem esclarecido. Vários trabalhos têm sido realizados com a finalidade de obter um melhor entendimento da ação da droga (Abdel-Salam et al., 2003; Núñez et al. 2006).

2.6.1 A fluoxetina e a sua influência nos sistemas imune, nervoso e endócrino.

Sabe-se que fatores psicológicos, como as emoções, estresse, experiências de vida podem produzir alterações na função imune mediadas pelo sistema neuroendócrino. Modelos experimentais em animais, através de intervenções psicofarmacológicas, têm sido utilizados para um melhor entendimento dos efeitos do estresse sobre o sistema imune, mas ainda existem aspectos conflitantes sobre os efeitos da fluoxetina sobre o sistema imunológico (Freire et al., 1993).

Núñez e cols. (2006) estudaram os efeitos da fluoxetina em camundongos expostos a um modelo de privação do sono com a finalidade de perturbar o sono dos animais. Nesse estudo, foi observada a redução na atividade das células NK após 20 dias de exposição ao estresse. Com a administração diária de fluoxetina nos animais estressados, houve reversão dos efeitos causados pelo estresse de uma forma dose-dependente. Efeito similar também foi observado na capacidade das células T de gerar linfócitos T citotóxicos em culturas de linfócitos. Nesse estudo, foi observado que o impacto causado na interrupção do sono influencia a imunidade celular alterando a produção de células NK e alterando a secreção noturna de citocinas pró-inflamatórias como a IL-6.

Pellegrino e Bayer (1998) observaram um decréscimo da indução mitótica na proliferação linfóide durante a administração aguda de fluoxetina. Segundo eles, isso ocorreu devido ao aumento da concentração extracelular de serotonina devido à inibição de sua recaptação. Receptores e transportadores de 5-HT são encontrados nas células imunes podendo atingir o espaço extracelular durante a resposta imune em situações fisiológicas e patológicas como inflamação, trombose e isquemia. Nessas condições, as funções da serotonina aumentam, ocorrendo uma ativação das células T e NK e uma diminuição da liberação de fatores quimiotáticos e da imunidade natural elaborada pelos macrófagos.

O efeito imunomodulatório da fluoxetina sobre a indução mitótica ... proliferação linfocitária em ratos foi observada por Besedovsky e cols. (1991). Sabe-se que a ativação da proteína kinase C (PKC) é uma sinalização para a proliferação das células T. Os efeitos da fluoxetina na indução de PKC pela concavalina A (Con A) foram analisados em células incubadas na presença e ausência de fluoxetina. A atividade de PKC foi determinada em ambas as frações citosólica e de membrana. Conforme a concentração do mitógeno Con A resposta foi diferente: em doses menores (1µg/ml), a resposta foi estimulatória, e em doses maiores (2µg/ml) foi observado um efeito inibitório sobre a proliferação celular de linfócitos. O aumento da concentração intracelular de cálcio e a ativação da proteína PKC podem ter contribuído para esses efeitos. De acordo com esses resultados, a fluoxetina parece modular o influxo de cálcio, ao qual, em troca pode influenciar a translocação de PKC modulando a resposta imune.

Pellegrino e cols. (1998) testaram os efeitos da administração aguda e crônica da fluoxetina sobre a proliferação mitótica induzida e a atividade citolítica das células NK em ratos. Na administração crônica (10mg/kg) não houve supressão desses dois parâmetros imunológicos estudados sugerindo o desenvolvimento de certa tolerância por essas partículas mediadoras da resposta imune. Esse trabalho ainda testou a administração direta de fluoxetina no ventrículo lateral dos animais, onde efeitos supressivos foram observados sobre as células NK e proliferação mitótica sugerindo que mecanismos imunomodulatórios podem ser exercidos por neurotransmissores serotoninérgicos centrais.

Abdel-Salam e cols. (2003a) estudaram a atividade antiinflamatória da fluoxetina na indução de edema de pata induzido pela carragenina. Em um primeiro momento, a fluoxetina foi administrada nas dosagens de 10 ou 60 mg/kg 30 minutos antes da carragenina, onde a redução do edema observado foi de 38,6 a 77,7% em até 2h após a administração da carragenina. A eficácia do fármaco foi também testada com a administração diária de 20mg/kg de fluoxetina mostrando um decréscimo significativo no edema subplantar causado pela carragenina, quando a resposta antiinflamatória foi medida no quinto e décimo quarto dia de tratamento com a droga. Nesse estudo, além da fluoxetina, também foi testado o seu efeito modulatório anti-edema concomitante com outros fármacos NSAIDS (drogas antiinflamatórias não esteroidais) como: indometacina, celecoxibe e rofecoxibe. A co-terapia da fluoxetina com a indometacina ou da fluoxetina com o celecoxibe resultaram na diminuição da resposta inflamatória

quando comparada na administração individual desses medicamentos. Entretanto, o mesmo fenômeno, não foi observado na co-administração da fluoxetina com rofecoxibe. Os resultados deste estudo também indicaram que os efeitos antiinflamatórios da fluoxetina foram reduzidos pela co-administração do antagonista opióide naloxone, sugerindo que o mecanismo sensitivo opióide possa estar envolvido nos efeitos antiinflamatórios da fluoxetina. A fluoxetina usada conjuntamente com melatonina ou imipramina potencializou os efeitos desses fármacos indicando que possam ser usadas conjuntamente em doenças inflamatórias ou em condições neuropáticas.

Abdel-Salam e cols. (2003b) compararam os efeitos antiinflamatórios e nociceptivos de diferentes classes de antidepressivos em ensaios com ratos através da estimulação elétrica da cauda e indução de edema de pata pela carragenina. Nesse estudo, foram utilizados antidepressivos tricíclicos (amitriptilina, imipramina e clomipramina), antidepressivos heterocíclicos (trazodone) e inibidores seletivos da recaptação da serotonina (fluoxetina e sertralina). A fluoxetina causou um efeito dose-dependente, diminuindo a formação do edema, com o máximo de efeito inibitório de 15,8 e 24,2% respectivamente com 5 e 10mg/Kg de fluoxetina após 4h de indução do processo inflamatório pela carragenina. Após 24 h da indução do processo inflamatório, a fluoxetina suprimiu a inflamação nas dosagens de 2, 5 e 10mg/kg de forma dose-dependente. Todos os antidepressivos utilizados nesse estudo mostraram propriedade nociceptivas na estimulação elétrica na cauda sendo mais efetivas a amitriptilina e trazodone. A fluoxetina e a sertralina, em administração aguda, mostraram um aumento extracelular de 5-HT na projeção terminal em áreas como córtex, estriado ou diencéfalo, concluindo que a dosagem empregada de forma aguda aumentou os níveis de recaptação de 5-HT.

Urbina e cols. (1999) determinaram a densidade de sítios de recaptação da serotonina, utilizando a [³H] paroxetina como marcador de 5-HT em preparações de membrana de linfócitos de sangue periférico em pacientes controles, e em pacientes com depressão maior, antes e após o tratamento de seis semanas com fluoxetina. Houve uma redução no número de sítios de recaptação nos pacientes em relação aos controles, com uma recuperação após o tratamento com fluoxetina. Os transportadores de linfócitos serotoninérgicos diminuíram nos pacientes com depressão maior, sendo modulados após a administração do medicamento. Esse estudo do sistema serotoninérgico, em linfócitos, pode ter contribuído para o entendimento da inter-relação bi-direcional entre o sistema nervoso e imune.

A associação entre depressão e alterações imunológicas em pacientes com depressão maior e distímia foi estudada relacionando alterações neurovegetativas, como distúrbios do sono e mudanças de hábitos alimentares, com alterações da função imune, usando a estimulação mitógena da proliferação de linfócitos. Os pacientes que participaram do estudo usaram antidepressivos como: fluoxetina, sertralina, paroxetina, venlafaxina ou placebo. A proliferação dos linfócitos foi acompanhada antes e após a farmacoterapia com o objetivo de observar se a diminuição dos sintomas é acompanhada pela normalização da função imune. Foi verificado que a proliferação linfóide foi menor nos pacientes com distímia do que nos pacientes com depressão maior, em que a cronicidade da doença pode ter sido um fator pertinente na promoção de distúrbios imunes (Zaharia et al., 2000).

Ayelli e cols. (2002) investigaram a proliferação linfocitária em animais submetidos ao modelo de estresse crônico moderado (períodos de privação de água e comida, alteração de luminosidade, inclinação da caixa) por 12 semanas. Nesse estudo, a proliferação linfóide por indução mitótica foi alterada nos animais submetidos ao estresse com um decréscimo da resposta das células T e aumento das células B, enquanto que nos animais tratados com fluoxetina (5mg/kg por dia i.p. durante 4 semanas) o fármaco reverteu os efeitos imunossupressores causados pelo estresse. Esse estudo sugeriu um possível mecanismo de alteração imune presente na depressão que pode ser influenciado com a administração do fármaco.

Várias evidências indicam que a atividade terapêutica dos antidepressivos está relacionada a efeitos modulatórios da resposta inflamatória e das células mediadoras da resposta imune. Kubera e cols. (2004) avaliaram os efeitos de fármacos antidepressivos como exemplo, a fluoxetina, na produção de citocinas pró-inflamatória (TNF- α e interleucina-6) em pacientes resistentes ao tratamento da depressão (média de idade=50,6 anos), controles saudáveis (idade >45 anos) e jovens voluntários saudáveis (<45anos). A fluoxetina, quando administrada isoladamente, diminuiu a produção de TNF- α , sendo a produção de IL-6 significativamente maior em pacientes deprimidos, quando comparados aos voluntários (controles) mais velhos. Neste estudo, a fluoxetina suprimiu a síntese de TNF- α , podendo ser um indicativo da supressão do processo inflamatório, podendo esse resultado contribuir para um aumento da utilidade terapêutica da droga.

Maes e cols. (1993) investigaram os níveis plasmáticos de IL-6, sIL-6R (receptor solúvel de interleucina-6), sIL-2R (receptor solúvel de interleucina-2) e TIR

(receptor de transferrina) em pacientes com depressão maior durante a fase aguda doença e durante a remissão clínica, comparando com controles normais. Uma das principais observações desse estudo foi que a depressão maior é caracterizada pelo aumento dos níveis plasmáticos de IL-6, sIL6R, sIL-2R e TIR, sugerindo que esses podem ser marcadores indiretos da depressão maior.

Gamaro e cols. (2002) estudaram os efeitos do estresse crônico variável no comportamento alimentar (ingesta de doce e ração padrão) e nos níveis de monoaminas (serotonina, dopamina e seus metabólitos) em diferentes regiões cerebrais relacionadas com a ingesta alimentar e a resposta ao estresse. Foi observado um decréscimo do apetite para alimentos doces em resposta ao estresse crônico variável, sem alteração na ingesta da ração habitual e da água. Ambos os grupos experimentais aumentaram de peso sendo que no grupo controle foi maior que no estressado, mas somente no grupo estressado essa diferença foi significativa. Foi observada hipertrofia adrenal podendo ser considerada como um índice de eficácia do modelo de estresse e aumento da atividade serotoninérgica no hipocampo nos animais estressados cronicamente. Sendo o hipocampo a região cerebral com maior densidade de receptores de glicocorticóides, esse aumento da atividade serotoninérgica pode ser resultante da ação dos GC nessa estrutura. Os resultados sugerem que o estresse crônico variável causa decréscimo na ingesta de açúcar e decréscimo de neurotransmissores dopaminérgicos no hipotálamo. O aumento nos níveis de metabólitos da dopamina no córtex e hipocampo foi observado pelo aumento no metabolismo dos neurônios dopaminérgicos e de suas estruturas. Esses resultados coincidem com outros onde a exposição ao estresse moderado aumenta a atividade dopaminérgica em várias regiões cerebrais (Thierry et al., 1976; Roth et al., 1998).

2.7 ESTRESSE, DANO CELULAR E TECIDUAL E LIBERAÇÃO ENZIMÁTICA.

Poucos trabalhos foram realizados relacionando os efeitos do estresse agudo e o dano tecidual em ratos. Sánchez e cols. (2002) avaliaram os efeitos do estresse emocional (imobilização com ou sem exposição ao calor) e social (confrontação de machos) em relação a liberação de enzimas citosólicas no sangue. O dano tecidual foi avaliado pela dosagem da atividade enzimática no plasma de: lactato desidrogenase (LDH), creatinina quinase (CK), transaminase oxalacética (AST), e transaminase

pirúvica (ALT). A imobilização causou um aumento da atividade plasmática de todas as enzimas estudadas. Na análise eletroforética da enzima CK foi observada a presença da isoenzima CK-MB indicando que nos animais imobilizados ocorreu certo dano cardíaco. O modelo de estresse por confrontação também afetou a integridade celular de vários tecidos, além do cardíaco, indicada pela liberação de LDH. Entretanto neste tipo de estresse o coração pareceu estar protegido, pois não houve aumento plasmático de CK, embora AST e ALT estivessem aumentadas. O estresse por restrição de habitação (1 hora por dia em 4 dias) mostrou que os animais resistiram ao dano tecidual havendo uma diminuição nos níveis de LDH, CK, AST ou ALT.

As enzimas citadas nesse estudo (AST, ALT, CK e LDH) podem fazer parte tanto da membrana celular, como de organelas ou do conteúdo citosólico. Constantemente, essas enzimas estão sendo liberadas na corrente sangüínea e, da mesma forma, são retiradas do sangue existindo um equilíbrio entre a velocidade de liberação dos tecidos e sua eliminação ou catabolismo em condições normais (Gella, 1994). O aumento da liberação destas enzimas na corrente sangüínea pode ocorrer por morte celular, aumento de permeabilidade da membrana ou pela proliferação celular. A eliminação das enzimas presentes na corrente sangüínea ocorre por excreção renal e pelo catabolismo mediado por células fagocíticas do sangue e do retículo endotelial (Garcia et al., 2000).

A enzima LDH está presente em vários tecidos, em particular no músculo esquelético, músculo cardíaco, fígado e eritrócitos, mas também nos rins, ossos e pulmões. Um estudo realizado por Blalock (2001) com cavalos de salto demonstrou que a LDH aumentou imediatamente após o exercício mantendo-se elevada após 24 horas, demonstrando ser um bom marcador de lesão muscular.

A ALT é uma enzima presente em tecidos com metabolismo ativo de aminoácidos como fígado, rins e músculo esquelético e cardíaco (Gella, 1994). Um trabalho realizado por Jeschke e cols. (2001) relacionou a liberação de ALT com a morte celular programada (apoptose) nas células hepáticas em ratos submetidos a queimaduras.

Encontrada principalmente no fígado, eritrócitos e nos músculos esquelético e cardíaco a AST é utilizada para avaliar lesão celular em conjunto com a CK e LDH (Gella, 1994). A AST está distribuída no citosol (20% atividade) e mitocôndrias (80% atividade), necessitando de uma lesão maior para ser liberada na corrente sangüínea (Giannini et al., 2005). A utilização dessa enzima em conjunto com a CK pode oferecer

informações mais precisas sobre o período de desenvolvimento da lesão (Tadich et al., 2000). Por outro lado, CK e LDH estão presentes somente no citosol e por terem tamanho menor conseguem ultrapassar a membrana celular mesmo que não exista um dano tecidual intenso. Um simples aumento da permeabilidade de membrana é suficiente para que ocorra o extravasamento dessas enzimas (Perez et al., 2000).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Investigar a atividade imunomodulatória da fluoxetina sobre o estresse crônico variável em ratos, relacionando seus efeitos sobre o processo inflamatório agudo de pleurisia induzido pela carragenina.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito do estresse crônico variável (10 dias, 20 dias e 30 dias) sobre o processo inflamatório agudo de pleurisia;
- Avaliar o efeito do tratamento com fluoxetina (10 dias, 20 dias e 30 dias) sobre o processo inflamatório agudo de pleurisia;
- Avaliar a interação entre o estresse crônico variável e o concomitante tratamento com fluoxetina (10 dias, 20 dias e 30 dias) sobre o processo inflamatório agudo de pleurisia;
- Avaliar o efeito do estresse crônico variável (10 dias, 20 dias e 30 dias) sobre a atividade das enzimas (CK, LDH, AST e ALT) e Proteína – C ultrasensível (PCRus).
- Avaliar a interação entre o estresse crônico variável e o concomitante tratamento com fluoxetina (10 dias, 20 dias, e 30 dias) sobre a atividade enzimática e o dano tecidual.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados ratos Wistar adultos, machos (com idade entre 60 a 90 dias, pesando 140 a 230 g), do Biotério do Instituto de Ciências da Saúde do Centro Universitário Feevale. Os animais foram mantidos em caixas-moradia, confeccionadas em “plexiglass”, medindo 65 x 25 x 15 cm, com o assoalho recoberto de serragem. Os animais foram submetidos a um ciclo normal claro/escuro (luzes acesas das 7 às 19 h), com ração padronizada e água “ad libitum”

Os testes foram realizados de acordo com as recomendações da Sociedade Brasileira de Neurociências e Comportamento. Os animais estudados participaram unicamente deste estudo.

4.2 PROTOCOLO DE ESTRESSE

O modelo de estresse escolhido para o experimento foi o de estresse crônico variável e os animais foram expostos diariamente entre 9h – 12h a três períodos de exposição (10, 20 e 30 dias).

Em cada período fizeram parte do estudo os animais estressados (tratados e não tratados com fluoxetina) e seus respectivos controles (salina e fluoxetina). Em cada período do experimento foram utilizados 32 animais (8 por grupo) finalizando um total de 96 animais que receberam diariamente uma injeção intraperitoneal (i.p.) de salina ou fluoxetina (20 mg/kg).

Os agentes estressores consistiam em: natação forçada durante 15 minutos, imobilização durante 1 hora, inclinação da caixa em 45° durante 4 a 6 horas, retirada da água durante 24 horas, retirada da comida durante 24 horas e barulho durante 15 minutos. A cada dia de estresse o animal era exposto a um destes agentes, de forma variada, buscando evitar um padrão de adaptação.

Os animais controles (salina e fluoxetina) não foram submetidos às sessões de estresse e permaneceram na caixa moradia recebendo água e alimentação “ad libitum”.

4.3 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO

Os animais tratados foram pesados diariamente e receberam fluoxetina 20 mg/Kg (i.p.) 1 hora antes das sessões de estresse. Nos animais controles foi administrada uma solução salina a 10% de tween.

Os subgrupos foram os seguintes:

1. Controle salina: animais não estressados tratados com salina;
2. Controle fluoxetina: animais não estressados tratados com fluoxetina;
3. Estressados salina: animais estressados tratados com salina;
4. Estressados fluoxetina: animais estressados tratados com fluoxetina.

4.4 INDUÇÃO DE PLEURISIA E DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS NO EXSUDATO PLEURAL.

O ensaio de indução de pleurisia permite avaliar a migração leucocitária para a cavidade pleural, uma vez que a injeção de carragenina induz a uma resposta inflamatória aguda local com o acúmulo de leucócitos polimorfonucleares no exsudato. Isso ocorre devido a facilidade que essas células da série branca têm de se justaporem ao endotélio (Zigmond, 1981; Sannomya, 1985). O modelo de pleurisia foi realizado segundo a técnica descrita por Spector (1956).

No último dia de tratamento, os animais foram submetidos ao ensaio de pleurisia, em que, após anestesia foi feita uma pequena incisão junto ao rebordo intercostal esquerdo para a administração intrapleural de 0,1ml de suspensão 1mg/ml de carragenina em solução salina. Após a sutura, os animais retornavam para as caixas onde permaneciam por 4 horas para o desenvolvimento do processo inflamatório agudo. Após este período, os ratos eram reanestesiados e a cavidade pleural era lavada com tampão salina fosfato (PBS) e coletado o exsudato e sangue periférico para as análises bioquímicas. Foi realizada a contagem total de leucócitos em câmaras de Neubauer e a diferencial em esfregaços corados por MayGrunwald Giemsa.

4.5 ANÁLISES BIOQUÍMICAS

O sangue total foi colhido com liquemine® através de punção venosa realizada após 4h da indução do processo inflamatório induzido pela carragenina. Foi

realizada a centrifugação do material e os plasmas foram separados e congelados (-20°C) por 7 dias até a determinação enzimática.

Todas as análises bioquímicas foram realizadas no equipamento COBAS ÍNTEGRA 400 ROCHE® utilizando kits, calibradores e controles do mesmo fabricante. O controle de qualidade foi realizado em paralelo com as análises em dois níveis, patológico e normal, e as calibrações realizadas quando necessário.

A metodologia de cada análise é transcrita a seguir.

4.5.1 PROTEÍNA C-REATIVA (PCR)

O método da PCR escolhido para as análises foi o ultrasensível por ser mais sensível e detecta níveis de PCR inferiores a 5mg/dl.

Princípio do ensaio: Ensaio turbidimétrico com intensificação da reação por partículas de látex revestidas com anticorpos monoclonais anti-PCR. O precipitado foi determinado pelo método turbidimétrico a 552nm. O coeficiente de variação do kit é de 2,6% e a sensibilidade analítica é de 0,071mg/dl.

4.5.2 TRANSAMINASE OXALACÉTICA (AST)

Método: Enzimático UV

Princípio do teste: A AST catalisa a transferência de um grupo amino entre L-aspartato e 2-oxoglutarato, formando oxaloacetato e L-glutamato. O oxaloacetato reage então com NADH, na presença de malato desidrogenase (MDH) formando NAD⁺. A taxa de oxidação de NADH é diretamente proporcional á atividade catalítica de AST.

4.5.3 TRANSAMINASE PIRÚVICA (ALT)

Método: Enzimático UV.

Princípio do teste: A ALT catalisa a reação entre L-alanina e 2-oxoglutarato. O piruvato formado é reduzido por NADH numa reação catalisada por lactato desidrogenase (LDH), formando L-lactato e NAD⁺. A taxa de oxidação de NADH⁺ é diretamente proporcional á atividade catalítica de ALT.

4.5.4 LACTATO DESIDROGENASE (LDH)

Método: Enzimático UV

Princípio do teste: Nas condições do ensaio, a LDH catalisa a conversão do piruvato para lactato, enquanto o NADH é oxidado para NAD^+ . A atividade catalítica é determinada a partir da velocidade de desaparecimento do NADH, medido em 340 nm.

Determina-se o decréscimo da absorvância em 340 nm, que é proporcional à atividade de LDH na amostra analisada.

4.5.5 CREATININA QUINASE (CK)

Método: Enzimático UV

Princípio do teste: A creatino quinase (CK) catalisa a reação entre creatina fosfato e adenosina difosfato (ADP) formando creatina e adenosina trifosfato (ATP).

Em seqüência, a glicose é fosforilada pelo ATP sob a ação da hexoquinase (HK) formando glicose-6-fosfato, que é oxidada a 6-fosfogluconato (6-PG) pela glicose-6-fosfato-desidrogenase (G-6-PDH) na presença de NADP^+ . Uma quantidade equimolar de NADP^+ é reduzida a NADPH, havendo um aumento da absorvância em 340 nm proporcional à atividade da CK.

A taxa de formação de NADPH é diretamente proporcional á atividade catalítica de CK.

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todas as análises estatísticas utilizaram o programa SPSS 12,0.

Os dados referentes ao ensaio da pleurisia foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) utilizando o teste ANOVA/Tukey, com diferenças consideradas significativas quando a probabilidade foi de $p < 0,05$.

Os dados referentes às dosagens bioquímicas são expressos como mediana (intervalo interquartil) e comparados pela análise de variância Kruskal-Wallis, seguida pelo teste Mann-Whitney, quando indicado. Foram considerados valores estatisticamente significativos quando o valor da probabilidade foi de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Efeito dos diferentes tratamentos sobre a migração leucocitária no exsudato após o processo inflamatório causado pela carragenina

5.1.1 Tempo de exposição ao estresse x total e diferencial de leucócitos no exsudato em relação ao tipo de tratamento.

Foram comparadas as contagens total e diferencial (MN e PMN) de leucócitos presentes no exsudato 4 horas após a indução do processo inflamatório pela carragenina em relação aos diferentes tempos de exposição ao estresse (10, 20 e 30 dias) e tratamento utilizado (controle salina, controle fluoxetina, estressados salina e estressados fluoxetina).

Nas figuras 2, 3 e 4 foram comparados os diferentes tempos de exposição ao estresse (10, 20 e 30 dias) em relação a contagem de leucócitos presentes no exsudato. Na figura 2, estão representados os resultados do grupo 10 dias de experimento em relação ao uso da fluoxetina e exposição ao estresse. Foi observada uma diminuição significativa na contagem dos fagócitos mononucleares (MN) do exsudato no tratamento estresse em relação ao controle salina onde foi obtido ($p < 0,01$). Em relação ao grupo controle fluoxetina e estressados foi demonstrada uma diminuição dos fagócitos polimorfonucleares (PMN) ($p < 0,01$) e MN ($p < 0,01$) no grupo controle fluoxetina, e uma diminuição significativa ($p < 0,01$) nos MN do grupo estresse em relação ao grupo controle salina. No grupo estressado os resultados obtidos demonstram que somente os MN apresentaram resultados estatisticamente significativos ($p < 0,05$), ocorrendo uma diminuição dos seus valores em relação ao grupo controle salina. Considerando o total de leucócitos do exsudato os grupos controle fluoxetina e estressado fluoxetina apresentaram diferença significativa ($p < 0,01$) em relação ao grupo controle salina, sendo que nos dois grupos os valores se encontraram estatisticamente diminuídos.

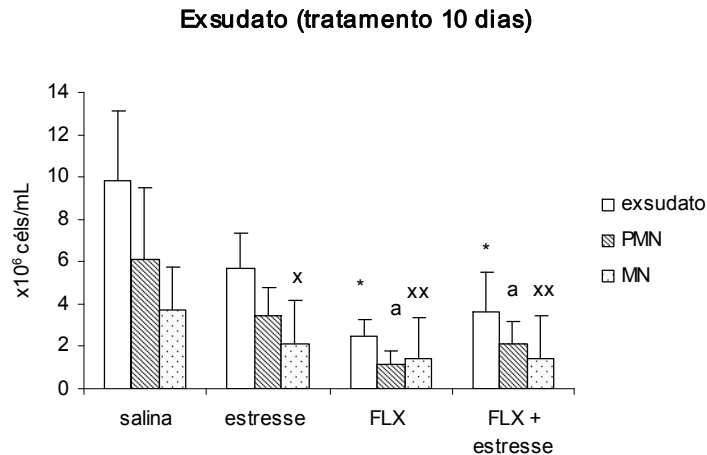


Figura 2

Efeito do estresse crônico variado (10 dias) sobre o exsudato pleural após 4h da injeção de carragenina nos diferentes tratamentos:

*diferença significativa do total de leucócitos do exsudato do grupo controle FLX e estresse FLX em relação ao grupo controle salina (ANOVA, $p < 0,01$)

^a diferença significativa de PMN dos grupos controle FLX e estresse FLX em relação ao grupo controle salina (ANOVA, $p < 0,01$)

^x diferença significativa de MN do grupo estresse em relação ao grupo controle salina (ANOVA, $p < 0,05$)

^{xx} diferença significativa de MN dos grupos controle FLX e estresse FLX em relação ao grupo controle salina (ANOVA, $p < 0,01$).

Na figura 3 estão representados os efeitos do estresse crônico variável no grupo 20 dias de tratamento relacionando o uso da fluoxetina e a exposição ao estresse ao grupo controle salina. O grupo estresse mostrou resultados estatisticamente significativos no total de leucócitos do exsudato em relação ao grupo controle salina ($p < 0,01$), havendo um aumento significativo nos seus valores. Considerando a contagem diferencial no grupo estressado os PMN apresentaram resultados estatisticamente significativos em relação ao grupo controle fluoxetina ($p < 0,01$), em relação ao grupo controle salina. ($p < 0,01$) e em relação ao grupo estresse fluoxetina ($p < 0,05$) com aumento dos seus valores. Também foram obtidos resultados significativos no total de leucócitos no período 20 dias do grupo estresse salina em relação ao grupo controle salina ($p < 0,01$) com aumento em seus valores e uma diminuição dos seus valores no grupo controle fluoxetina em relação ao grupo estresse fluoxetina ($p < 0,01$). Nesse período de tratamento os MN não apresentaram diferença significativa entre os grupos estudados.

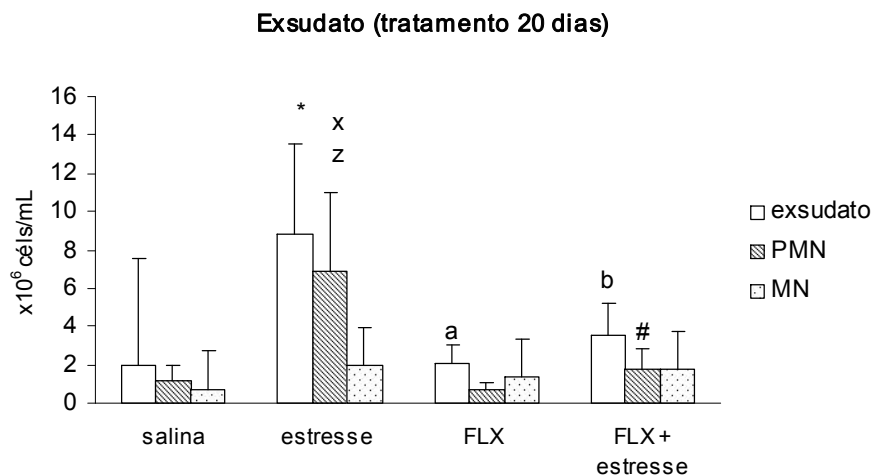


Figura 3

Efeito do estresse crônico variado (20 dias) sobre o exsudato pleural após 4h da injeção de carragenina nos diferentes tratamentos

* diferença significativa do total de leucócitos do exsudato do grupo estresse em relação ao grupo controle salina (ANOVA, $p < 0,01$).

^a diferença significativa do total de leucócitos do exsudato do grupo estresse em relação ao grupo controle FLX (ANOVA, $p < 0,01$).

^b diferença significativa do total de leucócitos do exsudato do grupo estresse em relação ao grupo estresse + FLX (ANOVA, $p < 0,05$).

^x diferença significativa de PMN do grupo estresse em relação ao grupo controle salina (ANOVA, $p < 0,01$)

^z diferença significativa de PMN do grupo estresse em relação ao grupo controle FLX (ANOVA, $p < 0,01$)

[#] diferença significativa de PMN do grupo estresse em relação ao grupo estresse + FLX (ANOVA, $p < 0,05$)

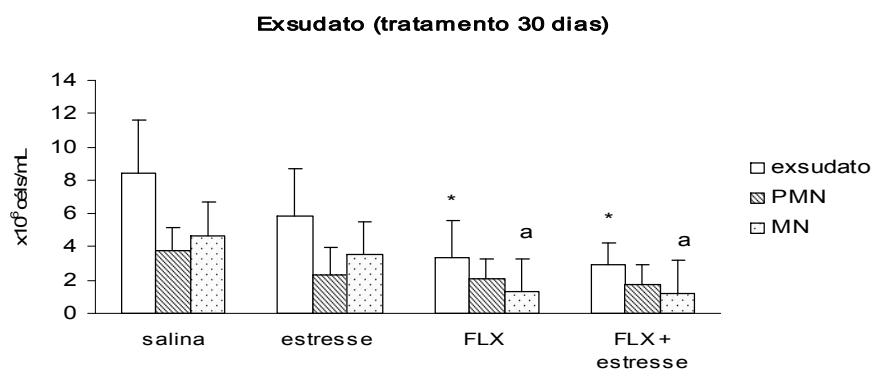


Figura 4

Efeito do estresse crônico variado (30 dias) sobre o exsudato pleural após 4h da injeção de carragenina nos diferentes tratamentos

*diferença significativa do total de leucócitos do exsudato dos grupos controle FLX e estresse + FLX em relação ao grupo controle salina (ANOVA, $p < 0,01$).

^a diferença significativa dos MN dos grupos controle FLX e estresse+FLX em relação ao grupo controle salina ($p < 0,01$).

Na figura 4 está representado o efeito do estresse crônico variável durante 30 dias o exsudato pleural após 4 horas da indução da inflamação pela carragenina. Nesse grupo, foram obtidos valores reduzidos de leucócitos totais no exsudato dos grupos controle fluoxetina e fluoxetina estresse, comparados ao grupo controle salina ($p < 0,01$). Na contagem diferencial do exsudato foi observada uma diminuição dos leucócitos MN nos grupos controle fluoxetina e estresse fluoxetina comparados ao grupo controle salina ($p < 0,01$).

5.1.2 Comparação dos tipos de tratamento em relação aos diferentes períodos de exposição ao estresse.

Em uma segunda análise estatística foram comparados os grupos (controle salina, estresse salina, controle fluoxetina, fluoxetina estresse) nos diferentes tempos de exposição (10, 20 e 30 dias) em relação ao total e diferencial de leucócitos do exsudato após o processo inflamatório.

Na figura 5 está representado o efeito da administração de salina sobre as células do exsudato pleural nos animais controle salina após o processo inflamatório. Pode-se observar uma diferença no número de leucócitos totais, PMN e MN do grupo 20 dias em relação aos grupos 10 e 30 dias ($p < 0,01$), havendo também uma diferença significativa de MN em relação ao grupo 30 dias ($p < 0,01$).

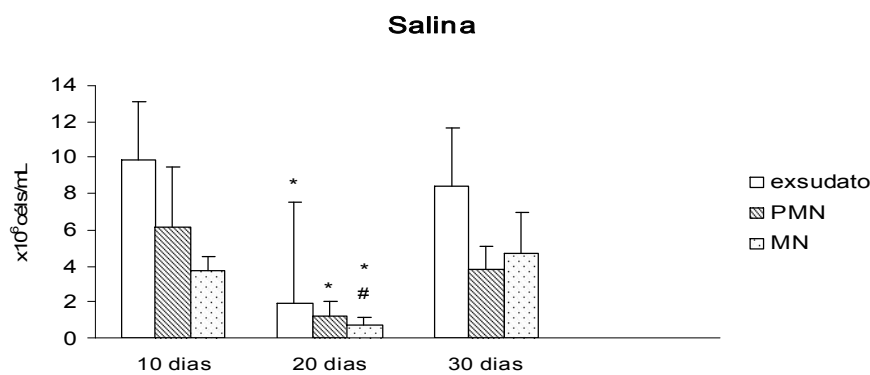


Figura 5

Efeito da administração de salina sobre o exsudato pleural após 4h da injeção de carragenina, em diferentes tempos de tratamento sobre animais não estressados.

*diferença significativa do total de leucócitos do exsudato, PMN e MN do grupo 20 dias em relação aos grupos 10 e 30 dias (ANOVA, $p < 0,01$)

#diferença significativa de MN do grupo 20 dias em relação ao grupo 30 dias (ANOVA, $p < 0,01$)

Na figura 6 estão representados os resultados das contagens celulares do exsudato pleural nos animais tratados com salina e submetidos ao estresse crônico variável. Foram observados valores aumentados na comparação dos PMN do grupo 20 dias em relação aos PMN dos grupos 10 ($p<0,01$) e 30 ($p<0,01$) dias.

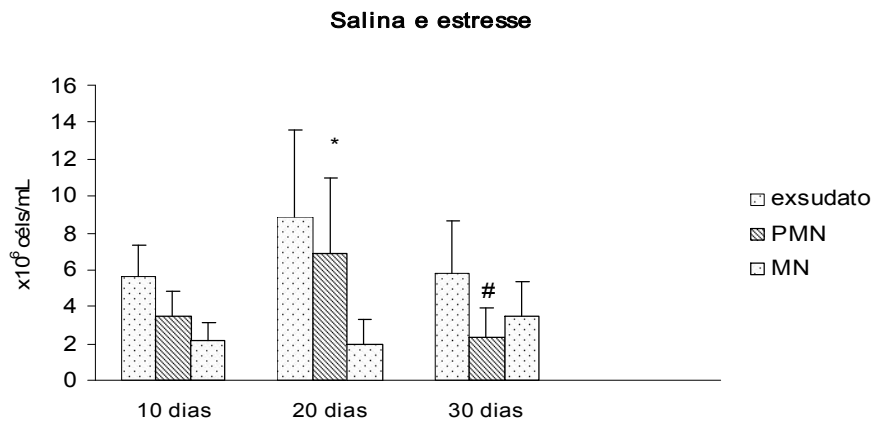


Figura 6

Efeito da administração de salina sobre o exsudato pleural após 4h da injeção de carragenina, em diferentes tempos de tratamento sobre animais submetidos a estresse crônico ariável

*diferença significativa de PMN do grupo 20 dias em relação ao grupo 10 dias (ANOVA, $p<0,01$)

diferença significativa de PMN do grupo 20 dias em relação ao grupo 30 dias (ANOVA, $p<0,01$)

A figura 7 representa o resultado da contagem total e diferencial (PMN e MN) de leucócitos no exsudato pleural dos animais controle fluoxetina. Nesse tratamento somente o grupo 20 dias apresentou valores menores nos PMN e estatisticamente significativos em relação ao grupo 30 dias ($p<0,01$).

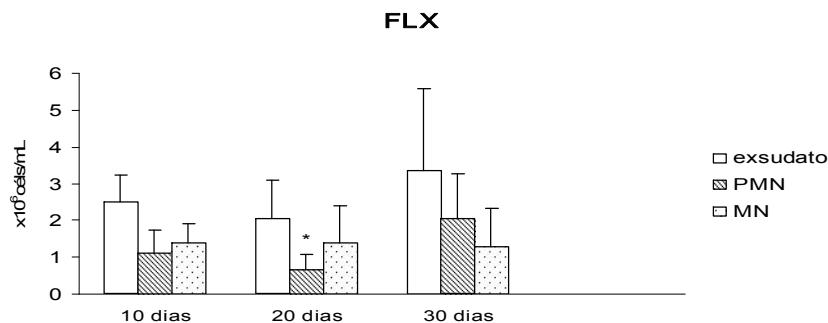


Figura 7

Efeito da administração de FLX sobre o exsudato pleural após 4h da injeção de carragenina, em diferentes tempos de tratamento sobre animais controle FLX.

*diferença significativa de PMN do grupo 20 dias em relação ao grupo 30 dias (ANOVA, $p<0,01$)

A figura 8 representa o grupo de animais tratados com FLX e submetidos ao estresse, onde se verificou que os diferentes tempos de tratamento não influenciaram nas contagens total e diferencial do exsudato pleural.

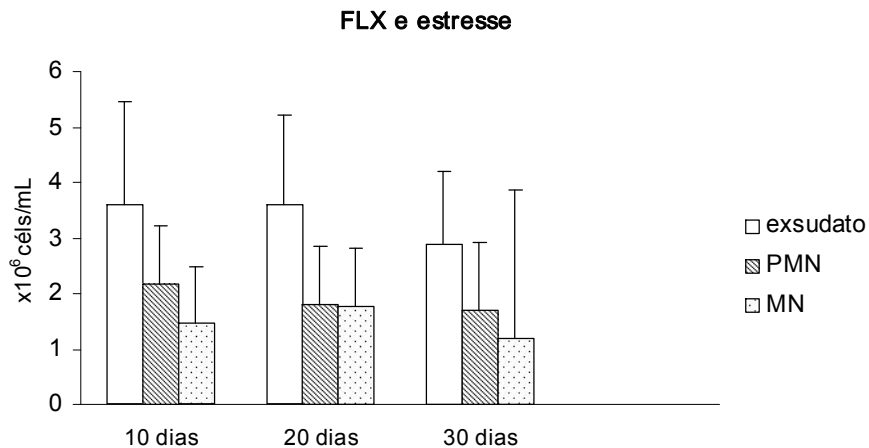


Figura 8

Efeito da administração de FLX sobre o exsudato pleural após 4h da injeção de carragenina, em diferentes tempos de tratamento sobre animais submetidos a estresse crônico variável.

Não houve diferenças entre os grupos

5.2 Avaliação da influência do estresse crônico variável nos diferentes tratamentos sobre a atividade enzimática e níveis de PCR

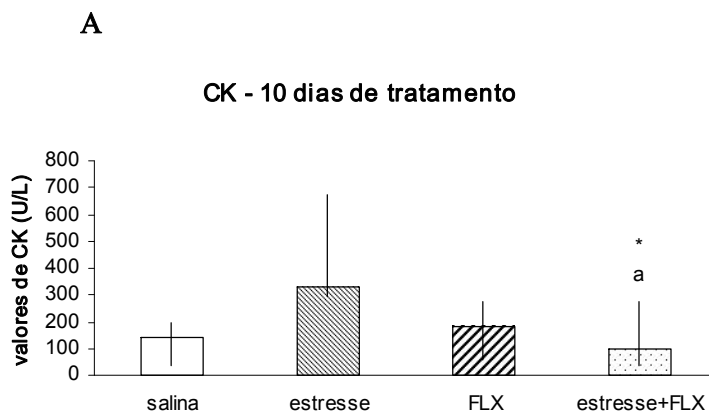
As análises bioquímicas (CK, LDH, PCR, AST e ALT) foram realizadas no plasma dos animais submetidos aos tratamentos (controle salina, estresse salina, controle fluoxetina e estresse fluoxetina nos diferentes períodos de exposição (10, 20 e 30 dias).

Primeiramente foram comparados os tempos de duração do tratamento (10, 20 e 30 dias) e a variação nas dosagens bioquímicas nos diferentes grupos e tratamentos, utilizando o teste de Kruskal-Wallis. Uma segunda análise estatística foi realizada usando o teste de Mann-Whitney onde foram comparadas as variações de cada dosagem bioquímica em separado relacionando o tempo de exposição e a variação das mesmas em relação ao tratamento.

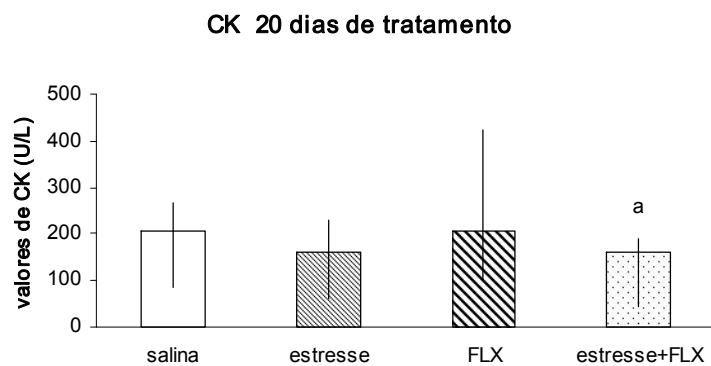
Os resultados mostram que no período de exposição de 10 dias houve variação significativa ($p < 0,05$) dos níveis de CK, LDH e ALT entre os grupos estudados. Aos 20 dias de exposição somente AST apresentou valores estatisticamente significativos em relação aos diferentes grupos. No período de 30 dias de exposição CK, LDH, ALT e PCR variaram de forma significativa em relação aos tratamentos realizados. Os resultados do grupo estresse fluoxetina apresentaram os menores valores em CK, LDH e ALT no período 10 dias e CK, LDH, ALT e PCR em 30 dias de exposição.

Os mesmos parâmetros bioquímicos foram analisados pelo teste Mann-Whitney, onde foram comparados isoladamente em relação ao tempo de exposição e tratamento.

Na figura 9 estão representados os resultados de CK nos tempos: 10 dias (A), 20 dias (B) e 30 dias (C). Os valores de CK referentes aos 10 dias de tratamento variaram de forma significativa quando o grupo controle salina foi comparado com o grupo estresse fluoxetina ($p < 0,05$) havendo diminuição no grupo estresse fluoxetina em ambas as comparações e o grupo controle fluoxetina com estresse fluoxetina com ($p < 0,05$) conforme fig. 9A. Considerando o tempo 20 dias de exposição à CK variou significativamente quando o grupo controle salina foi comparado com estresse fluoxetina ($p < 0,05$) conforme está representado na fig. 9B com os seus valores diminuídos no grupo estresse fluoxetina. No período de exposição 30 dias (fig.9C) não houve variações da CK.



B



C

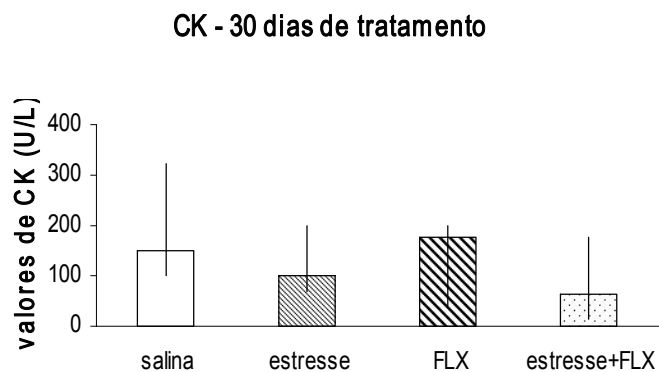


Figura 9

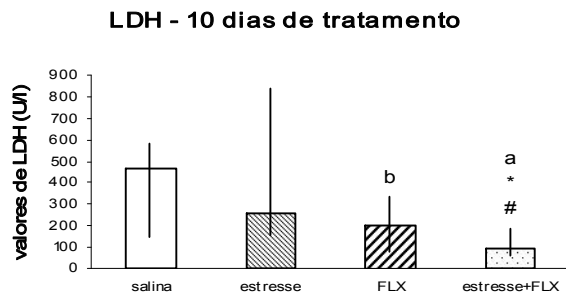
Resultados da atividade enzimática de CK no plasma dos animais submetidos ao estresse crônico variável durante 10 dias (A), 20 dias(B) e 30 dias(C) em relação aos diferentes tratamentos.

^a diferença significativa do grupo controle salina em relação ao grupo estresse FLX (Mann-Whitney $p < 0,05$).

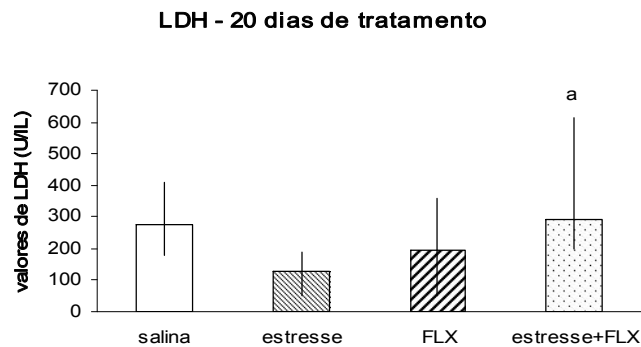
* diferença significativa do grupo estresse+FLX e o grupo FLX (Mann-Whitney $p < 0,05$).

A figura 10 representa as variações de LDH de acordo com os grupos e períodos estudados. A atividade da enzima LDH no período 10 dias (fig.10A) apresentou valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$) nas comparações; grupo controle salina em relação aos grupos controle fluoxetina e estresse fluoxetina. Os grupos estresse e controle fluoxetina também apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) em relação ao grupo estresse fluoxetina. Nos períodos 20 e 30 dias houve variação significativa quando o tratamento salina foi comparado com o estresse fluoxetina ($p < 0,05$) fig. 10B e 10C com uma diminuição em seus valores. No tempo de exposição 30 dias ainda houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) de LDH do tratamento fluoxetina em relação ao estresse fluoxetina sendo que em ambas as comparações os valores de LDH apresentaram-se diminuídos (fig. 9B).

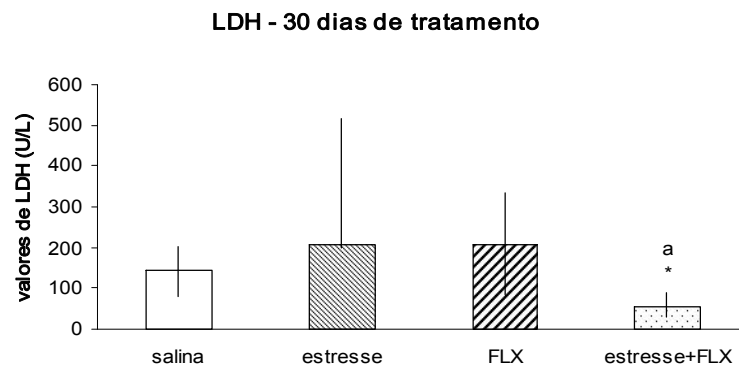
A



B



C

**Figura 10**

Resultados da atividade enzimática de LDH no soro dos animais submetidos ao estresse crônico variável durante 10 dias (A), 20 dias(B) e 30 dias(C) em relação aos diferentes tratamentos.

a diferença significativa do grupo controle salina em relação ao grupo estresse FLX (Mann-Whitney $p < 0,05$).

b diferença significativa do grupo controle salina em relação ao grupo controle FLX (Mann-Whitney $p < 0,05$).

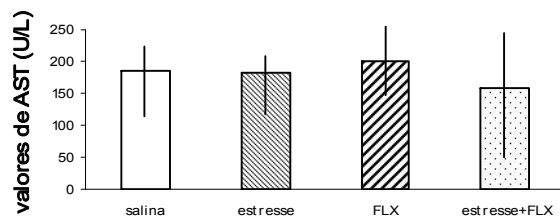
***** diferença significativa do grupo estresse fluoxetina e o grupo controle FLX (Mann-Whitney $p < 0,05$).

diferença significativa entre os grupos estresse e estresse FLX. (Mann-Whitney $p < 0,05$)

Na avaliação da atividade enzimática de AST em relação aos períodos e tratamentos foi observado que nos grupos 10 dias e 30 dias não houve variação estatística significativa dessa enzima em relação aos diferentes tratamentos conforme representação (fig.11A e 11C). No período de exposição 20 dias variaram de forma significativa os valores do grupo estresse fluoxetina com o grupo controle salina ($p < 0,05$) e estresse com estresse fluoxetina ($p < 0,05$) (fig. 11B) ocorrendo uma diminuição em seus valores.

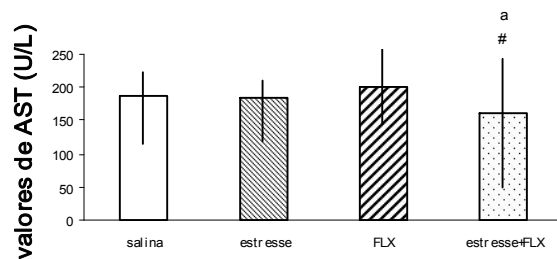
A

AST - 10 dias de tratamento



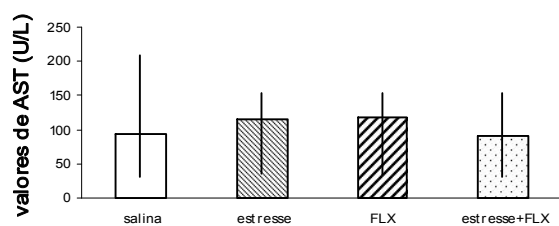
B

AST - 20 dias de tratamento



C

AST- 30 dias de tratamento

**Figura 11**

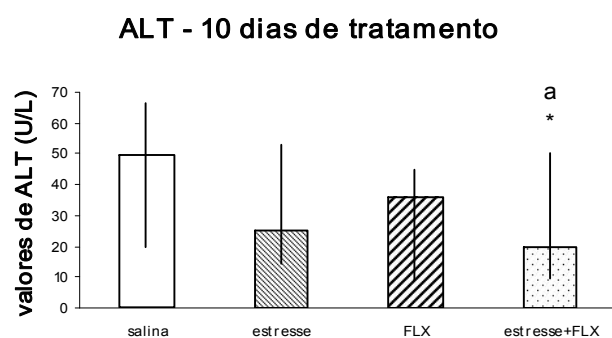
Resultados da atividade enzimática de AST no soro dos animais submetidos ao estresse crônico variável durante 10 dias (A), 20 dias (B) e 30 dias (C) em relação aos diferentes tratamentos.

^a diferença significativa do grupo controle salina em relação ao grupo estresse FLX (Mann-Whitney $p < 0,05$).

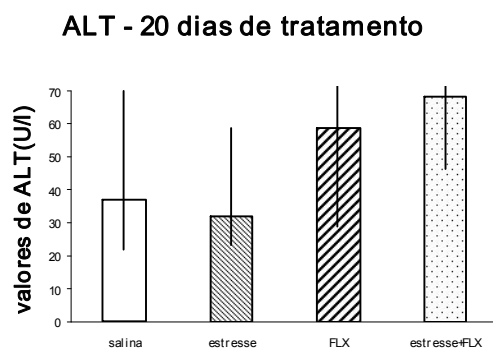
[#] diferença significativa entre os grupos estresse e estresse FLX. (Mann-Whitney $p < 0,05$).

Na avaliação da atividade da enzima ALT tanto no período 10 dias como 30 dias houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) em seus valores na comparação do grupo controle fluoxetina com estresse fluoxetina ($p < 0,05$) e controle salina com estresse fluoxetina ($p < 0,05$) (fig. 12A e 12B). No período 30 dias também houve uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na comparação do grupo estresse com estresse fluoxetina. No grupo exposto 20 dias não houve variação significativa da atividade enzimática de ALT entre os tratamentos (fig. 10 B).

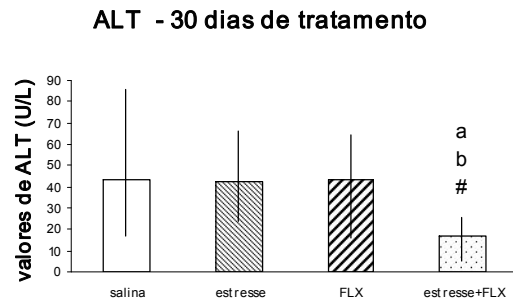
A



B



C

**Figura 12**

Resultados da atividade enzimática de ALT no soro dos animais submetidos ao estresse crônico variável durante 10 dias (A), 20 dias (B) e 30 dias (C) em relação aos diferentes tratamentos.

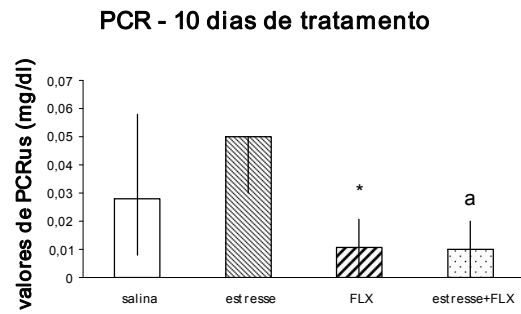
a diferença significativa do grupo controle salina em relação ao grupo estresse FLX (Mann-Whitney $p < 0,05$).

b diferença significativa do grupo estresse fluoxetina e o grupo FLX (Mann-Whitney $p < 0,05$).

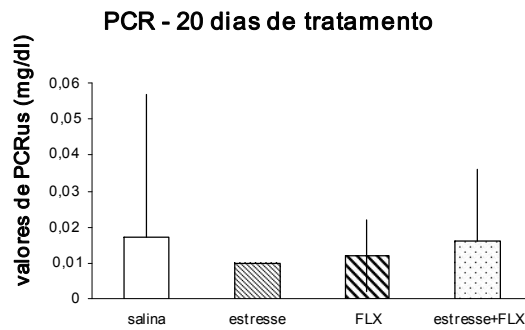
diferença significativa entre os grupos estresse e estresse FLX (Mann-Whitney $p < 0,05$)

Na figura 13 estão representadas as variações dos valores de PCRus em relação aos diferentes tratamentos e tempo de exposição. Nas análises da PCRus no grupo exposto 20 dias não houve variação significativa em relação aos diferentes tratamentos. No grupo 10 dias a comparação do tratamento salina com fluoxetina variou de modo significativo $p < 0,05$; no mesmo período, o grupo tratado com salina foi comparado com estresse fluoxetina apresentando resultado significativo $p < 0,05$ em ambas as comparações os valores de PCRus apresentaram valores diminuídos no grupo estresse fluoxetina. No grupo exposto 30 dias a comparação do tratamento estresse com estresse fluoxetina variaram significativamente $p < 0,05$ com uma diminuição dos seus valores no grupo estresse fluoxetina.

A



B



C

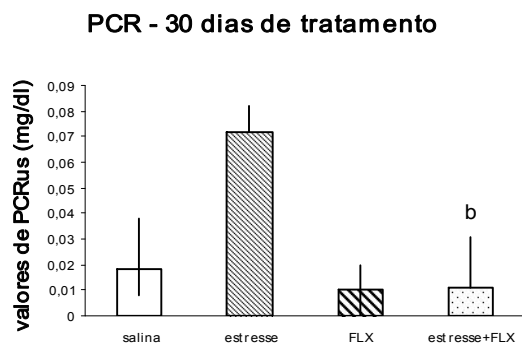


Figura 13

Resultados da PCR no soro dos animais submetidos ao estresse crônico variável durante 10 dias (A), 20 dias (B) e 30 dias (C) em relação aos diferentes tratamentos:

a diferença significativa entre o grupo controle salina em relação ao grupo estresse FLX (Mann-Whitney $p < 0,05$).

*diferença significativa entre o grupo salina em relação ao grupo FLX (Mann-Whitney $p < 0,05$)

b diferença significativa entre o grupo estresse em relação ao grupo estresse+ FLX (Mann-Whitney $p < 0,05$).

6. DISCUSSÃO

Intervenções psicofarmacológicas têm sido realizadas com a finalidade de estudar as conseqüências causadas pelo estresse sobre o sistema imune utilizando modelos clínicos e experimentais. No entanto, ainda existem aspectos conflitantes sobre a ação da fluoxetina sobre os sistemas imune, nervoso e central. A fluoxetina é um fármaco antidepressivo que inibe seletivamente a recaptação da serotonina nos neurônios pré-sinápticos no cérebro (Núñez et al., 2005). Sabe-se que, além do seu efeito antidepressivo, a fluoxetina também possui propriedades antiinflamatórias e analgésicas (Abdel Salam et al., 2003).

Neste trabalho, os resultados sugerem que o estresse inibiu a resposta imune natural avaliada pela contagem de leucócitos no exsudato dos animais sem tratamento com FLX, após o processo inflamatório agudo. Nos animais submetidos ao estresse e tratados com fluoxetina houve a elaboração de uma resposta inflamatória menor em relação ao grupo controle com uma redução da contagem leucocitária do exsudato após a indução do processo inflamatório. Essa resposta foi observada nos três períodos de exposição dos animais tratados com FLX e estressados tratados com FLX. (10, 20 e 30 dias).

Outros trabalhos já foram realizados usando a FLX para avaliar seus possíveis efeitos antiinflamatórios. Segundo Núñez e cols. (2005), descrevem que o fármaco possui ação efetiva para neutralizar os efeitos adversos do estresse sobre a imunidade natural em camundongos. Abdel-Salam e cols. (2003), utilizaram a FLX após a indução do edema de pata pela carragenina, constatando um efeito antiinflamatório do fármaco neste modelo experimental.

Vários estudos têm demonstrado que o estresse pode imunossuprimir o indivíduo, trazendo conseqüências à saúde e a qualidade de vida. Entretanto, a forma e a extensão dos danos causados pelo estresse irão depender da duração e da natureza do agente estressor. Sabe-se que, em diferentes condições de estresse, o organismo pode elaborar uma resposta imune de intensidade diferente: o estresse agudo provoca imunoativação, e o crônico, imunossupressão (Ader et al., 2001; Ayelli et al., 2002).

Conforme Miller e cols. (2002), durante o estresse crônico ocorre uma prolongada secreção de cortisol e os leucócitos elaboram uma resposta para neutralizar a sua ação, desensibilizando seus receptores. Isso reduz a capacidade de resposta a sinais inflamatórios pelas células, ocorrendo uma redução da resposta inflamatória mediada pelas citocinas.

O tratamento crônico com FLX produz uma elevação do número de dos receptores de glicocorticóides no hipocampo, normalizando os efeitos do “feedback” negativo causado pela ativação induzida pelo estresse sobre o eixo HPA (Yirmiya et al., 2001). Um dos importantes efeitos do estresse sobre o hipocampo é a diminuição da neurogênese, mas o tratamento com antidepressivos tem mostrado aumentar a proliferação celular e a neurogênese (Malberg,2004).

Em um estudo realizado por Malberg (2004), a fluoxetina administrada por um curto período (1 a 5 dias) não mostrou efeito sobre a proliferação celular. Entretanto com 14 dias e 28 dias de tratamento esse efeito foi observado, indicando a constância do efeito do fármaco após 14 dias de uso contínuo.

Neste trabalho foi estudada ação da FLX sobre a resposta inflamatória aguda de uma maneira direta através da resposta da imune celular, mas a ação da fluoxetina é complexa e dela participam mediadores endócrinos e nervosos que não foram analisados.

Vários estudos “in vivo” e “in vitro” têm demonstrado os efeitos de 5-HT na função imune, evidenciando que 5-HT é uma molécula comum aos sistemas imune e nervoso (Jackson et al.,1988). Os receptores e transportadores de 5-HT estão presentes em células da resposta imune, mas em condições patológicas (trombose, inflamação e isquemia) podem atingir o espaço extracelular. Nessas condições, as concentrações de 5-HT aumentam, ativando as células NK, os linfócitos T e a resposta imune inata mediada por macrófagos.

Os efeitos indiretos da FLX sobre o estresse envolvem além da influência desse fármaco sobre o sistema imune também a sua ação sobre a regulação neurondócrina. Neste trabalho foi analisado o efeito da FLX sobre o modelo de estresse crônico variável onde ocorre a hiperreatividade do eixo HPA (Gamero et al., 2002.) e conseqüente um aumento dos níveis de glicocorticóides. A FLX administrada nos grupos estressados durante 10, 20 e 30 dias causou uma redução da resposta inflamatória.

Duncan e cols. (1998) observaram que a administração aguda de FLX aumenta a liberação de corticosterona, mas a administração crônica da droga bloqueia aumento da sua secreção. Abdel-Salam e cols. (2003) administraram a FLX associada ao naloxone, um antagonista do receptor opióide que reduziu os efeitos antiinflamatórios da droga. Esse estudo sugere que o mecanismo opióide possa estar envolvido no efeito antiinflamatório da fluoxetina.

Além da avaliação da imunidade celular através da contagem de leucócitos no exsudato, este trabalho também avaliou a concentração da PCR (proteína de fase aguda) nos diferentes tempos de exposição ao estresse e tratamentos com FLX. A PCR é também um importante marcador de lesão celular e tecidual e se apresenta alterada no início do processo inflamatório. Alguns estudos sugerem que a depressão promove uma inflamação sistêmica, existindo associação entre a depressão e os níveis plasmáticos elevados de PCR. Postula-se que o aumento na liberação de IL-6 possa aumentar a produção do hormônio liberador da corticotropina (CRH), resultando na hipercortisolemia que provavelmente contribua para a depressão. Posteriormente, isso pode levar a um ciclo vicioso, que, finalmente, leva a exacerbação da depressão, imunossupressão e alteração da resposta inflamatória (Maes et al., 1993; Sluzewska et al., 1996; Dentino et al., 1999; Danner et al., 2003).

Os resultados aqui demonstrados revelaram que os valores de PCR variaram significativamente no grupo exposto a 30 dias de experimento em relação ao tipo de tratamento. O menor valor médio foi observado nos animais estressados e tratados com fluoxetina e o maior nos animais estressados. Devido ao papel da PCR como marcador inflamatório e de dano celular, os resultados sugerem que o grupo tratado com FLX teve menor lesão tecidual concordando com os resultados que mostram a redução da inflamação neste grupo e submetido ao estresse houve um processo inflamatório menor em relação ao grupo não tratado e exposto ao estresse.

Outro enfoque deste trabalho foi buscar a relação do estresse e da inflamação ao dano tecidual e celular através da quantificação de enzimas citosólicas (CK, LDH, ALT) e citosólica e mitocondrial (AST) nos animais submetidos aos diferentes períodos de estresse e de tratamento com FLX.

As enzimas de interesse no diagnóstico clínico são constituintes celulares de alguns tecidos específicos, podendo estar localizadas na membrana, no citosol ou em organelas celulares. Uma elevação da atividade enzimática tecidual normalmente está associada ao aumento da síntese no tecido de origem e à diminuição do catabolismo ou

da proliferação celular. Em condições normais ocorre um equilíbrio entre a sua liberação dos tecidos e sua eliminação (Gella, 1994).

Vários estudos têm sugerido que o estresse emocional pode causar danos ao coração (Arakawa et al., 1997). Sánchez e cols. (2002) observaram que, além do aumento de CK e de suas isoenzimas, os animais submetidos ao estresse por imobilização, também apresentavam valores aumentados de outras enzimas como LDH, sugerindo que outros tecidos, além do cardíaco podem ser danificados com o estresse.

Comparações entre a exposição ao estresse e o tratamento com FLX e as dosagens enzimáticas foram aqui realizadas demonstrando que nos períodos 10 e 30 dias de exposição os animais tratados e estressados obtiveram uma menor atividade enzimática com exceção do período 20 dias em que somente a AST apresentou uma redução da atividade nos animais estressados e tratados com FLX.

Os resultados apresentados sugerem que nos animais tratados e submetidos ao estresse crônico variável nos períodos de tratamento 10 e 30 dias ocorreu um menor dano celular devido a redução no processo inflamatório em consequência do estresse e do tratamento com a FLX.

7. CONCLUSÃO

Este trabalho demonstrou que o estresse crônico variável e o tratamento crônico com FLX reduziram o processo inflamatório agudo induzido pela carragenina nos diferentes tempos de tratamento. Os resultados indicaram que o estresse e a FLX diminuem a intensidade do processo inflamatório avaliada pela redução da contagem de leucócitos no sítio primário da inflamação aos 10 e 30 dias de tratamento, acompanhada da redução de enzimas marcadoras de lesão tecidual circulantes nestes mesmos grupos. As dosagens plasmáticas de PCR mostraram uma diminuição de seus níveis nestes mesmos animais, comprovando a redução liberação de mediadores inflamatórios nestes tratamentos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-SALAM, M.E.; BAIUOMY, R.A.; ARBID, M.S. Studies on the anti-inflammatory effect of fluoxetine in the rat. **Pharmacological Research**; 49: 119-131, 2003.

ABDEL-SALAM, M.E.; NOFA, S.M; EL-SHENAWY, S.M. Evaluation of anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of different antidepressants in the rat. **Pharmacological Research**, 48:157-165, 2003.

ADER, R.; FELTEN, D.L.; COHENN. (Eds). **Psychoneuroimmunology**, Academic Press, San Diego, 2001.

AINAMO, J. BAY. I. Problems and proposals for recording gingivitis and plaque. **Int Dent. J**, 25:229-235, 1976.

ALOISI, F.; PENNA, G; CERASE, J., MENENDEZ I.B, and L.ADORINI. IL-12 production by central nervous system microglia is inhibited by astrocytes. **J Immunol**.159:1604-1612, 1997.

ARAKAWA, H.; MATSUOKA, N; YAMAGUCHI, I. Stress increase plasma enzyme activities in rats: differential effects of adrenergic and cholinergic blockades. **J. Pharmacol Exp Ther.**, 280:1296-1303, 1997.

AYELLI, E. V.; CREMASCHI, G.A.; STERIN, L.; BORDA, L.S; GENARO, M.A. Altered expression of autonomic neurotransmitter receptors and proliferative responses in lymphocytes from a chronic mild stress model of depression :effects of fluoxetine. **Brain, Behavior, and Immunity**,16:333-350,2002.

BENJAMINI, E.; COICO, R.; SUNSHINE, G .Immunology: A short course, (4th Ed.) New York: Wiley-Liss, 2000.

BESEDOVSKY, H.O; DELREYA; SORBIN, E.A. Lymphokine-containing supernatants from con A-stimulated cells increase corticosterone blood levels. **J. Immunol**. 126:385-387, 1991.

BESEDOVSKY,H.O; DEL REY; SORBIN, A. Lymphoid cells produce an immunoregulatory glucocorticoid increasing factor (GIF) acting through the pituitary gland. **Clin. Exp.Immunol**; 59:622-628, 1985

BLACK, P. H. Central nervous system-Immune system interactions: psychoneuroendocrinology of stress and its immune consequences. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**; 15:1-6, jan.1994.

BLALOCK, J.E. Molecular mechanisms of bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. **Int.J.Neurosci**, 51:363-364, 1990.

BLALOCK, J.E. Shared ligands and receptors as a molecular mechanism for communication between the immune and neuroendocrine system. **Ann NY Acad. Sci.**; 741:292-298, 1994.

BOWMAN, B.H. Hepatic plasma proteins. **San Diego: Academic Press**, 141-212, 1993.

BRENNEMAN, D.E; HILL, J.M.; GLAZNER, G.; GOZES, I.; PHILLIPS, T.M. Interleukin-1 alpha and vasoactive peptide: enigmatic regulation of neuronal survival. **Int. J. Dev. Neurosc.**, 13:187-200, 1995.

DANNER, M.; KASL, S.V.; ABRAMSON, J.L.; VACCARINO, V. Association between depression and elevated C-Reactive protein **Psychosomatic Medicine**, 65:347-356, 2006.

DENTINO, A.N.; PIEPER, C.F.; RAO, M.K.; CURRIE, M.S.; HARRIS, T.; BLAZER, D.G.; COHEN, H.J. Association of interleukin-6 and other biological variables with depression in older people living in the community. **J.Am. Geriatr. Soc.**, 47:6-11, 1999.

DERIJK, R.; MICHELSON, D; KARP, D.; PETRIDES, J.; GALLIVEN, E.; PACIOTTI, G.; GOLD, P.W.; STERBERG, E.M. Exercise and circadian rhythm-induced variations in plasma cortisol differentially regulate interleukin-1 beta(IL-1 beta),IL-6, and tumor necrosis factor-alpha (TNF alpha) production in humans: high sensitivity of TNF alpha and resistance of IL-6. **J. Clin. Endocrino. Metab.**82:2182-2191, 2001.

DRESSLER ,W.W.; BALIEIRO , M.C.; RIBEIRO ,R.P. SANTOS ,J.E. Depressive Symptoms and C-reactive protein in a Brazilian urban community.Brazilian. **Journal of Medical and Biological Research**,39:1013-1019,2006.

DUMAN, R.S.; NAKAWA, S.; MAYBER, J. Regulation of adult neurogenesis by antidepressant treatment. **Neuropsychopharmacol.** 25: 836-44, 2001.

DUNCAN, G.E.; KNAPP, D.J.; CARSON, S.W.; BRES, G.R. Differential effects of chronic antidepressant treatment on swim stress-and fluoxetine-induced secretion of corticosterone and progesterone. **J.Pharmacol**, 285:579-587, 1998.

ESKANDARI, F.; WEBSTER, J.I.; STERBERG, E. Neural Immune pathways and their connection to inflammatory diseases. **Arthritis Res. Ther.** 5(6):251-265, 2003.

FATIMA, A.; LAPIS, A.A.M.; PILLI, R.A. A concise total synthesis of fluoxetine, a potent and selective serotonin reuptake inhibitor. **J. Bras. Chem .Soc.** vol. 16, (3A):495-499, 2005.

FELTEN, D.L.; COHEN ,N.; ADER ,R.; CARLSON , S.L.; ROSZMAN, T.L. Central neural circuits involves in neural immune interactions.**Psychoneuroimmunology.2nd** ed: Academic Press.Inc.;3-25,1991.

FREIRE, M.; NÚÑEZ, M.J.; BALBOA, J.C; RIAL, L.G; VALLEJO, J.C.; REY-MÉNDEZ., M. Effects of alprazolam on cellular immune response to surgical stress in mice. **Cancer Lett**; 73:155-160, 1993.

GAMARO, G.D.; MANOLI, L.P.; TORRES, I.L.S.; SILVEIRA, R.; DALMAZ,C. Effects of chronic variate estress on feeding behavior and on monoamine levels in different rat brain structures.**Neurochemistry International** 42:107-114,2002.

GARCIA, M. Evaluacion del entrenamiento tradicional del caballo criollo chileno do rodeo mediante el análisis de variables fisiológicas y bioquímicas sanguíneas.**Archivos de Medicina Veterinária**,vol.32,(2):171-183,2000.

GELLA, J. Enzimologia Clínica. In: Sastre, F.G. (Ed.) **Bioquímica Clínica**. Barcelona: Bancanova, 113-124, 1994.

GIANNINI, E.G.; TESTA R.; SAVARINO, V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. **CMAJ**, 172(3):10.1503, 2005.

GLASER, G; J. Stress -induced immune dysfunction: implications for health.**Science and society**, vol.5:243-251, 2005.

GLASER, J.K.; ROBLES, T.F.; GLASER, R. Psychoneuroimmunology: Pyscological influences on immune function and health. **J. Consult Clin. Psychol.**, 70(3):537-547, 2002.

GLASER, R.; KIECOL, J.K. Stress-induced immune dysfunction: implications for health. **Nature Reviews**, 5:243-251, 2005.

GROTA, L.J.; BRENNEN, T.; FELTEN D.L .Corticosterone responses of adult Lewis and Fischer rats. **J.Neuroimmunol.**74:95-101, 1995.

HARBUZ, M.S; LIGHTMAN, S.L. Stress and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis: acute, chronic and immunological activation **Journal of Endocrinology**, 134:327-339, 1992.

HENINGER, G.R. Neuroimmunology of stress-neurobiological and clinical consequences of stress: from normal adaptation to PTSD, edited by M.J Friedmann-Philadelphia, 1995.

HERMAN, J. P.; Culliman, W.E. Neurocircuitry of stress central control of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis-trends. **Neurosc.** 20:78-84, 1997.

HSIN, H.; JYH-HUNG, C.; LIN-LIN, F.; YANG, W.; LEE, C.; YAN- LEE, P.; CHU, R.M. Serum acute phase proteins and swine health status **Can. J .Vet. Res.**, 67(4):283-290, 2003.

IRWIN M. Stress-induced immune suppression role of brain corticotrophin release hormone and autonomic nervous system mechanisms. **Adv. Neuroimmunol.**; 4:29-47,1994.

JACOBSON, L.; SAPAPOLSKY, R. The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. **Endocr. Rev.**; 12:118-34, 1991.

JACKSON, J.C.; WALKER, R.F.; BROOKS, W.H.; ROSZMAN, T.L.; Specific uptake of serotonin by murine macrophages, **Life**; 42:1641-1650, 1998.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P. Immunobiology: The immune system in health and disease. (3 rd Ed.). New York: Garland. 1997

JASPER, MS; ENGELAN, WC. Splanchnic neural activity modulates ultradian and circadian rhythms in adrenocortical secretion in awake rats. **Neuroendocrinology**; 59:97-109, 1994.

JESCHKE, M. Cell proliferation, apoptosis, NF-B expression, enzyme, protein, and weight changes in liver of burned rats. **American Journal Gastrointestinal and Liver Physiology**, 2001.

KEENEY, A.; JESSOP, D.S.; HARBUZ, M.S.; MARSDEN, C.A.; HOGG, S.; BLACKBURN, R.E. Differential Effects of acute and chronic social defeat stress on hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and hippocampal serotonin release in mice. **Journal of Neuroendocrinology**. v.18: p.330-338, 2006.

KUBERA, M.; KENIS, G.; BOSMANS, E.; KAJTA, M.; BASTA-KAIM, A.; SCHARPE, S.; BUDZISZEWSKA, B. ; MAES, M. Stimulatory effect of antidepressants on the production of IL-6, **International Immunopharmacology**, 4:185-192, 2004

LAWRENCE, D.A.; KIM, D. Central/peripheral nervous system and immune responses. **Toxicology**. 142:189-201, 2000.

LAZARUS, R.S.; FOLKMAN, S. Stress, Appraisal and Coping .New York: Springer. **Publishing Company, Inc.** 1984.

LICINO, J.; WONG, M. Pathways and mechanisms for cytokine signaling of the central nervous system. **J. Clin. Invest, Maryland** v.100, (12), p.2941-2947, 1997.

LINKINS, R.W.; COMSTOCK, G.W. Depressed mood and development of cancer. **AM. J: Epidemiologic**. 132:962-972, 1990.

LUPIEN, S.J.; DE LEON, M.; DE SANTI, S.; CONVIT, A.; TARSHISH, C.; NAIR, NPV.; THAKUR, M.; EWEN, M.B; HAUGER, R.; MEANEY, M.J. Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits. **Nature Neurosc**, 1(1):69-72, 1998.

MAES, M.; SCHARPE, S.; MELTZER, H.Y.; BOSMANS, E.; SUY, E.; CALABRESE, J.; COSYNS, P. Relationships between interleukin-6 activity, acute phase proteins, and function of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in severe depression. **Psychiatry Res.** 49:11-27, 1993.

MAES, M.; METZER, H.; BOSMAN, E.; BERGMANS, R.; ERIC VANDOOOLAEGHE, E.; RANJAN, R.; DESNYDER, R. Increase plasma concentrations of interleukin-6, soluble interleukin-6, soluble interleukin-2 and transferrin receptor in major depression. **Journal of Affective Disorders**, 34:301-309, 1995.

MALBERG J.E. Implications of adult hippocampal neurogenesis in antidepressant action. **J. Psychiatry Neurosci**, 29(3):196-205, 2004.

MC EWEN; STELLAR, B.S. Stress and the individual, Mechanisms to disease [Review] **Arch Int. Med**; 153:2093-2110, 1993.

MELTZER, HY. Plasma creatine phosphokinase activity, hypothermia, and stress. **Am. J. Physiol.**; 221:896, 1971.

MICHELSON, D.; LICINO, J.; GOLD, D, P.W. Mediation of stress response by the hypothalamic-pituitary adrenal axis. **Neurobiological and Clinical Consequences**. 13:225-237, 1995.

MUNCK, A.; GUYRE, P.M; HOLBROOK, N.J. Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. **Endocr.Rev.** 5:25-44, 1984.

NEMEROFF, C.; HEIM, C. The role of childhood trauma in the neurobiology of mood and anxiety disorders: Preclinical and clinical studies. **Biol. Psychiatry**, 49:1023-1039, 2001

NÚÑEZ, M.; BALBOA, J.; RODRIGO, H.; BRENLLA, J.; GONZALES-PETEIRO, M.; FREIRE-CANABAL, M. Effects of fluoxetine on cellular immune response in stressed mice. **Neuroscience Letters**, 396:247-251, 2005.

PELLEGRINO, T.C.; BAYER, B.M. Modulation of immune cell function following fluoxetine administration in rats, **Pharmacol .Biochem. Behav.** 59:151-157, 1998.

PEPYS, M.B.; BALTZ, M.C. Acute phase proteins with special reference to C-reactive protein and related proteins (pentaxins) and serum amyloid A protein. **Adv Immunol.** 34:141-212, 1983.

PEREZ, R. Actividad física y cambios cardiovasculares y bioquímicos del caballo chileno a la competencia de rodeo. **Archivos da Medician Veterinária**, 32 (2): 171-183, 2000.

PLOTNIKOFF, N.; MURGO, A.; FAITH, R.; WYBRAN J. Stress and Immunity, **Boca Raton: CRC Press**, 1991.

REGIANE, S.; JOCA L.; PADOVAN, C. M.; GUIMARAES, S.F. Stress, depression and the hippocampus. **Rev.Bras. de Psiquiatria** (supl. II): 46-51, 2003.

ROTH, R.H.; TAM, S.Y.; YANG, J.X.; DEUTCH, A.Y. Stress and mesocorticolimbic dopaminesystems. **Ann. N.YAcad. Sci**; 537:138-147, 1998.

SÁNCHEZ, O.; ARNAU, A.; PAREJA, M.; POCH, E.; RAMIREZ, I.; SOLEY, M. Acute stress-induced tissue injury in mice: differences between emotional and social stress, cell. **Stress Chaperones**. 7(1): 36-46, 2002.

SAWYNOK, J.; ESSER, J.M.; REID, A.R. Antidepressants as analgesics: an overview of central and peripheral mechanisms of action; Psychopharmacology of Pain Symposium. **J.Psychiatry Neurosci.**, 26(1):21-9, 2001.

SANNOMIYA, P.; ANTEGHINI, H.J.; VIANA, E.S.O.; GARCIA-LEME. Involvement of lymphocytes in non-immune inflammation: dual effect of glucocorticoids. **Agents Act.** 16:552-557, 1985.

SEGERSTROM, C.S; MILLER, G.E. Psychological Stress and the human immune system: a meta-analytic study of 30 years of inquiry. **Psychol Bull**; 130(4):601-630, 2004.

SHLOMO, MELMED. Series Introduction: The immuno-neuroendocrine interface. **J.Clin.Invest.** 108(11):1563-1566., 2001.

SIEBEL, G.; AGRANOFF, B.W; ALBERS,W.R.; FISHER, S.K.;UHLER,M.D Serotonin involvement in physiological function and behavior, **American Society for Neurochemistry** vol.2 p.13,1999.

SILVERMAN, N.M.; BRAD, D.P.; BIRON, C.A.; MILLERA. H. Immune modulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis during viral infection. **Viral Immunol.**18 (1):41-78, 2005.

SIMANSKY, K.J. Serotonergic control of the organization of feeding and satiety. **Behav.Brain Res.** 73; 37-42, 1996.

SLUZEWSKA, A.; RYBAKOWSKI, L.; BOSMANS, E., SOBIESKA, M.; BERGHMANS, R.; MAES, M.; WIKTOROWICZ, K. Indicators of immune activation in major depression. **Psychiatry Res.**64:161-167, 1996.

SPECTOR, W.G. The mediation of altered capillary permeability in acute inflammation. **J.Pathol.Bacteriol.** 72:367-380, 1956.

STARK, P.; FULLER, R.W.; WONG, D. The pharmacologic profile of fluoxetine, **J.Clin.Psychiat.** 46:7-13, 1985.

STERBERG, E.M. Neural-immune Interactions in Health and Disease. **J.Clin., Maryland**, Vol.100, Number11:2641-2647, 1997.

SZAFARCZYK, A.; ALONSO, G.; IXART,G.;MALAVAL,F;ASSENMACHER,I.F.; Assenmacher I. diurnal-stimulated and stress- induced ACTH release in rats is mediated by ventral noradrenergic bundle. **Am. J. Physiol.** 249:219-26,1985.

TADICH, N.; GALLO, C.; ALVARADO, M.Efectos de 36 horas de transporte terrestre con y sin descanso sobre algunas variables sanguíneas indicadoras de estrés em bovinos. **Archivos de Medicina Veterinária**.v.32 (2):171-183, 2000.

THIERRY, A.M.; TASSIN, J.P.; BLANC, G.; GLOWINSKI, J. Selective activation of mesocortical dopamine system by stress. **Nature**.263:242-244, 1956.

TSIGOS, C.; CHROUSOS, G.P. Hypothalamic-pituitary-adrenal-axis, neuroendocrine factors and stress. **J. Psychosom Res.**; 53:865-871., 2002.

URBINA, M.; PINEDA, S.; PIÑANGO, L.; CARREIRA, L.; LIMA, L. [³H]Paroxetine binding to human peripheral lymphocyte membranes of patients with major depression before and after treatment with fluoxetine. **Internacional Journal of Immunopharmacology**. 21:631-646, 1999.

YIRMIYA, R.; POLLAK, Y.; BARAK, O. ; AVITSUR, R.; OVADIA, H.; BETTE, M., ; WEIHE, E; WEIDENFELD, J. Effects of Antidepressant Drugs on the Behavioral and Physiological Responses to Lipopolysaccharide (LPS) in Rodents, **Neuropsychology**,:24:531-544,2001.

ZAHARIA, M.D.; RAVINDRAN, A.V.; GRIFFTNS, J.; MERALI, Z.; ANISMAN,H. Lymphocyte proliferation among major depressive and dysthymic patients with typical or atypical feature, **Journal of Affective Disorders** .58:1-10,2000.

ZIGMOND, S.H.: HIRSCH, J.G. Cell polarity: an examination of its behavioral expression and its consequences for polymorphonuclear leukocyte. **Chemotaxis. J.Cell Biol.**; 89:585-592, 1981.

WONG, D.T; REID, L.R.; THRELKELD, P.G. Suppression of food intake in rats by fluoxetine:comparison of enantiomers and effects of serotonin antagonists. **Pharmacol Biochem Behav**, 31:475-479, 1998.

WONG, M.L.; LICINO. Localization of stem cell factor mRNA in adult rat hippocampus. **Neuroimmunomodulation**.1:181-187, 1994.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)