MILENA LOBÃO PINHEIRO

Efeitos da separação materna sobre o comportamento, a imunidade inata e o crescimento tumoral

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Comportamento do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de Concentração:
Neurociências e Comportamento

Orientador: Prof. Dr. João Palermo Neto

São Paulo
2008

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catalogação na publicação
Serviço de Biblioteca e Documentação
Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo

Pinheiro, Milena Lobão.

Efeitos da separação materna sobre o comportamento, a imunidade inata e o crescimento tumoral / Milena Lobão Pinheiro; orientador João Palermo Neto. -- São Paulo, 2008.

167 p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Psicologia. Área de Concentração: Neurociências e Comportamento) – Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo.

1. Neuroimunomodulação 2. Stress 3. Citometria de fluxo 4. Imunidade natural 5. Ansiedade de separação 6. Labirintos I. Título.

QP356.47

FOLHA DE APROVAÇÃO

MILENA LOBÃO PINHEIRO

Título: Efeitos da separação materna sobre o comportamento, a imunidade inata e o crescimento tumoral

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Comportamento do Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de mestre em Ciências.

Área de Concentração:
Neurociências e Comportamento

Aprovada em:

Banca examinadora

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____Assinatura:_____

Prof. Dr.:_____

Instituição:_____Assinatura:_____

A minha mãe, Vera. O privilégio que eu sinto por ser sua filha, não se deve apenas ao fato de ter sido criada por uma grande mulher. Mas tive o privilégio de aprender o amor à ciência dentro de casa. Portanto, tudo o que sou, devo a você.

A minha irmã, Mayra, que transforma qualquer momento em uma festa.

Ao meu namorado, Breno, que sempre me apóia em tudo e suportou todo esse período. É muito bom saber que você me ama e que, aconteça o que acontecer, posso me sentir segura sempre.

Ao Prof. Dr. João Palermo Neto, pela confiança, paciência e ensinamentos nesses anos.

AGRADECIMENTOS

Ao Departamento de Patologia e Toxicologia (VPT) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ), local aonde este trabalho foi realizado.

À Profa. Dra. Maria Lucia Zaidan Dagli (VPT-FMVZ-USP), pelo apoio e contribuição neste trabalho.

À Profa. Dra. Maria Martha Bernardi (VPT-FMVZ-USP), que, além de ter contribuído com este trabalho, acreditou em mim e me apresentou ao grupo de Neurimunomodulação.

Ao Prof. Dr. Frederico Azevedo da Costa Pinto pelos ensinamentos e pelo apoio durante a realização desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Jorge Camilo Flório pelo apoio durante os experimentos de neuroquímica.

Aos funcionários do Biotério (VPT-FMVZ-USP): Claudia, Rosiris, Idalina, Herculano e Nelson pela ajuda e dedicação.

Aos funcionários do Laboratório de Farmacologia e Toxicologia (VPT-FMVZ-USP): Priscila, Ricardo e Magali, por sempre colaboraram com os experimentos.

Ao Departamento de Reprodução Animal (VRA) na pessoa do Prof. Dr. Cláudio Alvarenga e, em especial, á Priscila do laboratório de dosagens hormonais (LDH) pelas dosagens de corticosterona.

Aos funcionários do Laboratório de Histopatologia (VPT-FMVZ-USP): Cláudio e Luciano, pela confecção das lãminas histológicas.

Aos meus amigos de pós-graduação: Alison, Mônica e Viviane que sempre me ajudaram e me apoiaram em todos os momentos deste percurso. Essa minha vitória devo muito a vocês. Amo vocês!

Ao amigo de pós-graduação Heidge Fukumasu por me ajudar com o modelo de carcinogênese e leitura das lâminas.

Aos meus colegas de pós-graduação: Aline, Ana Paula, Andréia, Caio, Camila Lima, Camila Moreira, Carol, Daniel, Dario, Denise, Domenica, Dudu, Elaine, Evelise, Felipe, Glaucie, João Paulo, Karin, Luciana Cunha, Luciana Lippi, Luciana Vismari, Marcio, Maria Isabel, Marina, Natô, Patrícia, Portela, Renato, Ricardo, Silvia, Soraya, Thiago e Wanderley pela convivência e aprendizado.

À FAPESP pelo apoio financeiro concedido pela bolsa de estudos (05/56904-9) e pelo projeto temático (04/14128-0) da qual este trabalho faz parte.

RESUMO

PINHEIRO, M. L. Efeitos da separação materna sobre o comportamento, a imunidade inata e o crescimento tumoral. [Maternal separation effects on the behavior, innate immunity and tumor growth.] 2007. 167 f. Dissertação (Mestrado) Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Um modelo de indução de estresse/ansiedade é a separação materna. Sabe-se, a este respeito, que o desenvolvimento do comportamento emocional normal em mamíferos jovens depende da interação entre a mãe e o filhote. Além disso, eventos estressantes na infância e interrupções no cuidado materno podem levar a efeitos deletérios na resposta imune e na resistência a doenças ao longo da vida. Buscamos neste trabalho estudar os efeitos da separação materna sobre o comportamento, imunidade inata e crescimento tumoral de uma prole de camundongos machos adultos. Nossos resultados mostraram que a separação materna, em camundongos A/J, (1) não produziu alterações robustas no comportamento e em parâmetros hematológicos (antes e após o crescimento tumoral), (2) aumentou a atividade de neutrófilos sanguíneos e macrófagos alveolares (antes e após o crescimento tumoral), (3) aumentou os níveis estriatais de serotonina, seu metabólito 5-HIAA e o *turnover* de dopamina, (4) diminuiu os níveis séricos de corticosterona e (5) não influenciou a incidência tumoral. Em camundongos C57BL/6, a separação materna produziu um comportamento ansioso e um aumento na atividade de neutrófilos sanguíneos. Tomados em seu conjunto, parece-nos possível afirmar que a separação materna tenha produzido alterações na atividade neuroimune dos animais, modificando, nos mesmos a atividade do eixo HPA e essas alterações foram influenciadas pelas características individuais das linhagens.

Palavras-chave: Neuroimunomodulação, Estresse, Campo Aberto, Labirinto em Cruz Elevado, Citometria de Fluxo.

ABSTRACT

PINHEIRO, M. L. Maternal separation effects on the behavior, innate immunity and tumor growth. [Efeitos da separação materna sobre o comportamento, a imunidade inata e o crescimento tumoral.] 2007. 167 f. Dissertação (Mestrado) Instituto de Psicologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Maternal separation is one model of stress/anxiety induction. We know about it that the mammals normal emotional behavior development depends on the interaction between mother and younglet. Beside this, early life stressed events can induce deletery effects in immune response and to illness resistance for all life long. In this work we searched for the maternal separation effects on the behavior, innate immunity and tumor growth in an adult male mice offspring. Our results showed that the maternal separation, in A/J mice (1) had no big effects in the behavior and in the hematological parameters (before and after the tumor growth), (2) increased the neutrophil and alveolar macrophages activity (before and after the tumor growth), (3) increased the serotonin striatum levels, the 5-HIAA metabolite and the dopamine turnover (4) decreased the corticosterone serum levels and (5) had no effects on tumor incidence. In the C57BL/6 mice, the maternal separation induced an anxiety behavior and increased the neutrophil activity. These results suggest that the maternal separation could have produced alterations in neuroimmune activity, modifying the HPA axis activity and these alterations could be influenced by individual strains characteristics.

Key words: Neuroimmunomodulation, Stress, Open Field, Plus Maze, Flow Citometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – A) Manta Térmica; B) Caixas plásticas contendo os filhotes do grupo experimental separados das mães..... 44

Figura 2 - Etho Vision® - (Vídeo Tracking Motion & Behavior Recognition System Versão 1.90) - equipamento de rastreamento em vídeo, utilizado no procedimento experimental para análise de movimentos As setas indicam: 1-Labirinto em cruz para camundongo, 2-Câmera filmadora acoplada ao computador, 3-Monitor de vídeo e 4-Imagem digitalizada representada em *pixels*..... 49

Figura 3 – Representação esquemática de seqüências de reagentes utilizados nas técnicas de burst oxidativo e fagocitose: Tubo A – PBS; Tubo B – DCFH; Tubo C – SAPI; Tubo D – DCFH+SAPI, Tubo E – DCFH+PMA. Adaptado de Costa, 2004..... 53

Figura 4 - Placa de 96 poços para determinação indireta de NO. A) Concentrações padrão (5,0, 10,0, 30,0 e 60,0 µmoles/1x10^5 células) e B) amostras..... 50

Figura 5 - Aparato para a imobilização dos animais..... 57

Figura 6 – Efeitos da separação materna sobre a locomoção total de camundongos A/J no labirinto em cruz elevado. * p<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=10 animais/grupo..... 67

Figura 7 – Efeitos da separação materna sobre velocidade média de camundongos A/J na arena do labirinto em cruz elevado. * p<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=10 animais/grupo..... 67

Figura 8 – Efeitos da separação materna sobre o tempo gasto por camundongos A/J em comportamento de *risk assesment* no labirinto em cruz elevado. *<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=10 animais/grupo..... 68

Figura 9 – Efeitos da separação materna sobre o tempo gasto na região central do campo aberto por camundongos A/J que foram submetidos a um desafio por imobilização. * p<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=10 animais/grupo..... 71

Figura 10 – Efeitos da separação materna sobre a locomoção na região periférica do campo aberto de camundongos A/J que foram submetidos a um desafio por imobilização. * p<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=10 animais/grupo..... 71

Figura 11 – Efeitos da separação materna sobre a locomoção total na arena do campo aberto de camundongos A/J que foram submetidos a um desafio por imobilização. # p<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=10 animais/grupo..... 72

Figura 12 – Efeitos da separação materna sobre a freqüência do comportamento de *grooming* no campo aberto de camundongos A/J que foram submetidos a um desafio por imobilização. * p<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=10 animais/grupo..... 72

Figura 13 – Efeitos da separação materna sobre o tempo em comportamento de *grooming* no campo aberto de camundongos A/J que foram submetidos a um desafio por imobilização. * p<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=10 animais/grupo..... 73

Figura 14 – Efeitos da separação materna sobre a porcentagem de entradas nos braços 75

abertos do labirinto em cruz elevado em camundongos A/J submetidos a um estresse por imobilização. * p<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=10 animais/grupo.....

Figura 15 – Efeitos da separação materna sobre a locomoção total na arena do labirinto em cruz elevado em camundongos A/J submetidos a um estresse por imobilização. ** p<0,001 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=10 animais/grupo..... 75

Figura 16 – Efeitos da separação materna sobre o tempo em comportamento de *freezing* no labirinto em cruz elevado em camundongos A/J submetidos a um estresse por imobilização. * p<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=10 animais/grupo..... 76

Figura 17 – Efeitos da separação materna sobre a freqüência do comportamento de *grooming* no labirinto em cruz elevado em camundongos A/J submetidos a um estresse por imobilização. ** p<0,001 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=10 animais/grupo..... 76

Figura 18 – Efeitos da separação materna sobre o tempo em comportamento de *grooming* no labirinto em cruz elevado em camundongos A/J submetidos a um estresse por imobilização. ** p<0,001 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=10 animais/grupo..... 77

Figura 19 - Efeitos da separação materna sobre a atividade de neutrófilos sangüíneos de camundongos A/J. A – *burst* oxidativo basal, B – *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com SAPI, C – *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com PMA. * p<0,05 e **p<0,001 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=10 animais/grupo..... 80

Figura 20 - Efeitos da separação materna sobre a atividade de neutrófilos sangüíneos de camundongos A/J. A – intensidade de fagocitose, B – porcentagem de fagocitose. p<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=10 animais/grupo..... 81

Figura 21 - Efeitos da separação materna e um novo desafio estressor, sobre a atividade de neutrófilos sangüíneos de camundongos A/J. A – *burst* oxidativo basal, B – *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com SAPI, C – *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com PMA. * p<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=10 animais/grupo..... 84

Figura 22 - Efeitos da separação materna e um novo desafio estressor, sobre a atividade de neutrófilos sangüíneos de camundongos A/J. A – intensidade de fagocitose, B – porcentagem de fagocitose. p<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=10 animais/grupo..... 85

Figura 23 - Efeitos da separação materna sobre a atividade de macrófagos alveolares de camundongos A/J. A – *burst* oxidativo basal, B – *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com SAPI, C – *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com PMA. * p<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Stundent. n=10 animais/grupo..... 87

Figura 24 - Efeitos da separação materna sobre a atividade macrófagos alveolares de camundongos A/J. A – intensidade de fagocitose, B – porcentagem de fagocitose. p<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=10 animais/grupo..... 88

Figura 25 - Efeitos da separação materna em camundongos A/J sobre os níveis de *turnover* estriatais de dopamina (A); HVA/dopamina e (B) DOPAC+HVA/dopamina. *p<0,05 em relação ao grupo controle; teste "t" de Student.n=10 animais/grupo..... 92

Figura 26 - Efeitos da separação materna em camundongos A/J sobre os níveis estriatas de serotonina e seu metabólito 5-HIAA. (A) serotonina e (B) 5-HIAA. *p<0,05 em relação ao grupo controle; teste "t" de Student.n=10 animais/grupo..... 92

Figura 27 - Efeitos da separação materna em camundongos A/J sobre os níveis do 93

metabólito doparminégico DOPAC no córtex pré-frontal. *p<0,05 em relação ao grupo controle; teste "t" de Student.n=10 animais/grupo.....

Figura 28 – Efeitos da separação materna sobre os níveis plasmáticos de corticosterona de camundongos A/J. ** p<0,001 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=10 animais/grupo..... 95

Figura 29 – Efeitos da separação materna sobre locomoção na região periférica do campo aberto por camundongos A/J que foram submetidos a carcinogênese pulmonar. [a] p<0,05 em relação ao grupo Cont.+NNK e [b] p<0,05 em relação ao grupo S.M.+NNK, análise de variância de duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações Student-Newman-Keuls, n=10 animais/grupo..... 98

Figura 30 – Efeitos da separação materna sobre locomoção na região central do campo aberto por camundongos A/J que foram submetidos a carcinogênese pulmonar. [a] p<0,05 em relação ao grupo Cont.+NNK, análise de variância de duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações Student-Newman-Keuls, n=10 animais/grupo..... 98

Figura 31 – Efeitos da separação materna sobre locomoção total na arena do campo aberto por camundongos A/J submetidos a carcinogênese pulmonar. [a] p<0,05 em relação ao grupo Cont.+NNK, análise de variância de duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações Student-Newman-Keuls, n=10 animais/grupo..... 99

Figura 32 – Efeitos da separação materna sobre o tempo na zona tigmotaxica do campo aberto por camundongos A/J submetidos a carcinogênese pulmonar. análise de variância de duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações Student-Newman-Keuls, n=10 animais/grupo..... 99

Figura 33 – Efeitos da separação materna sobre o tempo na zona externa do campo aberto por camundongos A/J submetidos a carcinogênese pulmonar. [a] p<0,05 em relação ao grupo Cont.+NNK, [#] p<0,05 em relação aos grupos S.M.+NNK e S.M.+NaCl, análise de variância de duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações Student-Newman-Keuls, n=10 animais/grupo..... 100

Figura 34 – Efeitos da separação materna sobre o tempo na zona tigmotaxica do campo aberto por camundongos A/J submetidos a carcinogênese pulmonar, análise de variância de duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações Student-Newman-Keuls, n=10 animais/grupo..... 100

Figura 35 – Efeitos da separação materna sobre a locomoção total na arena do labirinto em cruz elevado por camundongos A/J submetidos a carcinogênese pulmonar. [a] p<0,05 em relação ao grupo Cont.+NaCl, análise de variância de duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações Student-Newman-Keuls, n=10 animais/grupo..... 102

Figura 36 – Efeitos da separação materna sobre o tempo em movimento na arena do labirinto em cruz elevado por camundongos A/J submetidos a carcinogênese pulmonar. [a] p<0,05 em relação ao grupo Cont.+NaCl, análise de variância de duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações Student-Newman-Keuls, n=10 animais/grupo..... 102

Figura 37 - Efeitos da separação materna sobre a atividade de neutrófilos sangüíneos de camundongos A/J avaliada após a carcinogênese pulmonar. A – *burst* oxidativo basal, B – *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com SAPI, C – *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com PMA. * p<0,05 em relação aos grupos SM+NNK e Cont+NNK; [a] p<0,05 em relação ao grupo SM+NNK e [b] p<0,05 em relação ao grupo SM+NaCl, análise de variância de duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações Student-Newman-Keuls. n=10 animais/grupo..... 105

Figura 38 - Efeitos da separação materna sobre a atividade de neutrófilos sangüíneos de camundongos A/J avaliada após a carcinogênese pulmonar. A – intensidade de fagocitose, B – porcentagem de fagocitose. [a] p<0,05 em relação ao grupo SM+NNK e [b] p,0,05 em relação ao grupo SM+NaCl, análise de variância de duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações Student-Newman-Keuls. n=10 animais/grupo..... 106

Figura 39 - Efeitos da separação materna sobre a atividade de macrófagos alveolares de camundongos A/J avaliada após a carcinogênese pulmonar. A – *burst* oxidativo basal, B – *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com SAPI, C – *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com PMA. [a] p<0,05 em relação aos grupos Cont+NaCl e SM+NNK; [b] p<0,05 em relação ao grupo Cont+NNK e [c] p<0,05 em relação ao grupo SM+NNK, análise de variância de duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações Student-Newman-Keuls. n=10 animais/grupo..... 109

Figura 40 - Efeitos da separação materna sobre a atividade de macrófagos alveolares de camundongos A/J avaliada após a carcinogênese pulmonar. A – intensidade de fagocitose, B – porcentagem de fagocitose. [a] p<0,05 em relação ao grupo Cont+NNK, análise de variância de duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações Student-Newman-Keuls. n=10 animais/grupo..... 110

Figura 41 - Efeitos da separação materna sobre a produção de NO por macrófagos alveolares de camundongos A/J avaliada após a carcinogênese pulmonar, análise de variância de duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações Student-Newman-Keuls. n=10 animais/grupo..... 112

Figura 42 - Efeitos da separação materna sobre os parâmetros hematológicos de camundongos A/J avaliada após a carcinogênese pulmonar. [a] p<0,05 em relação ao grupo SM+NNK, análise de variância de duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações Student-Newman-Keuls. n=10 animais/grupo..... 114

Figura 43 - Efeitos da separação materna sobre a incidência de nódulos tumorais de camundongos A/J avaliada após a carcinogênese pulmonar. [a] em relação aos grupos que receberam salina p<0,001; [b] em relação ao grupo SM+NaCl p<0,001, [c] em relação ao grupo Cont+NaCl p<0,05, análise pelo teste exato de Fisher , n=10 animais/grupo..... 117

Figura 44 - Efeitos da separação materna sobre o número de lesões por pulmão de camundongos A/J avaliado após a carcinogênese pulmonar. [a] em relação ao grupo SM+NNK; [b] em relação ao grupo Cont+NNK p<0,05, análise de variância de duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações Student-Newman-Keuls, n=10 animais/grupo..... 118

Figura 45 - Tumor do tipo sólido sendo: (A) aumento de 4x; (B) aumento de 40x. Podemos observar uma massa não circunscrita, comprimindo levemente o parênquima pulmonar adjacente. Encontramos também células neoplásicas sem arcabouço citoplasmático delimitado demonstrando aspecto sólido, com citoplasma eosinofílico e pouco granular. Os núcleos apresentam baixo grau de atipia, sendo basofílicos, grandes e esféricos, apresentando nucléolos por vezes evidentes e em número variável (1 à 5)..... 121

Figura 46 - Tumor do tipo misto sendo: (A) aumento de 4x; (B) aumento de 40x. Podemos observar uma massa levemente circunscrita, comprimindo o parênquima pulmonar adjacente. Poucas células apresentam bordos celulares delimitados, sendo que estas se apresentam de duas formas, sólida, ou formando pequenos cordões, onde muitas vezes estes se formam com uma ou duas células adjacentes. O citoplasma é eosinofílico pouco granular e por vezes apresentando vacúolos. Já os núcleos apresentam grau moderado de atipia, variando de esféricos e grandes, a ovais e um pouco menores, sempre basofílicos. Ocorre ainda a presença de nucléolos que são pouco evidentes..... 121

Figura 47 – Efeitos da separação materna sobre o tempo de permanência na região central do campo aberto de camundongos C57BL/6. ** p<0,001 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=5 animais/grupo..... 124

Figura 48 – Efeitos da separação materna sobre o tempo de permanência na região periférica do campo aberto de camundongos C57BL/6. ** p<0,001 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=5 animais/grupo..... 124

Figura 49 – Efeitos da separação materna sobre a locomoção na região periférica do campo aberto de camundongos C57BL/6. * p<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=5 animais/grupo..... 125

Figura 50 – Efeitos da separação materna sobre a locomoção total na arena do campo aberto de camundongos C57BL/6. * p<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student.N=5 animais/grupo..... 125

Figura 51 – Efeitos da separação materna sobre tempo em movimento na arena do campo aberto de camundongos C57BL/6. * p<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student.N=5 animais/grupo..... 126

Figura 52 – Efeitos da separação materna sobre a velocidade média na arena do campo aberto de camundongos C57BL/6. * p<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student.N=5 animais/grupo..... 126

Figura 53 – Efeitos da separação materna sobre a locomoção total na arena de camundongos C57BL/6, observados no labirinto em cruz elevado. * p<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=5 animais/grupo..... 128

Figura 54 – Efeitos da separação materna sobre o tempo em comportamento de *grooming* de camundongos C57BL/6, observados no labirinto em cruz elevado. *p<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=5 animais/grupo..... 129

Figura 55 – Efeitos da separação materna sobre a porcentagem de tempo nos braços abertos de camundongos C57BL/6, observados no labirinto em cruz elevado. *p<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=5 animais/grupo..... 129

Figura 56 – Efeitos da separação materna sobre a porcentagem de entradas nos braços fechados de camundongos C57BL/6, observados no labirinto em cruz elevado. *p<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=5 animais/grupo..... 130

Figura 57 - Efeitos da separação materna sobre a atividade de neutrófilos sangüíneos de camundongos C57BL/6. A – *burst* oxidativo basal, B – *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com SAPI, C – *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com PMA. *p<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=5 animais/grupo..... 132

Figura 58 - Efeitos da separação materna sobre a atividade de neutrófilos sangüíneos de camundongos C57BL/6. A – intensidade de fagocitose, B – porcentagem de fagocitose. * p<0,05 e ** p<0,001 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=5 animais/grupo..... 133

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros reprodutivos das ninhadas de camundongos A/J. Os dados representam a média ± desvio padrão..... 62

Tabela 2 – Parâmetros reprodutivos das ninhadas de camundongos C57BL/6. Os dados representam a média ± desvio padrão..... 63

Tabela 3 - Comportamento, no campo aberto, de camundongos que passaram, ou não, pela separação materna e observados aos 45 dias de vida. Os dados representam a média ± desvio padrão..... 65

Tabela 4 - Comportamento, no labirinto em cruz elevado, de camundongos A/J que passaram, ou não, pela separação materna, e observados aos 45 dias de vida. Os dados representam a média ± desvio padrão..... 66

Tabela 5 - Comportamento, de camundongos que passaram, ou não, pela separação materna observados no campo aberto aos 45 dias de vida após terem sido submetidos a um estresse por imobilização. Os dados representam a média ± desvio padrão..... 70

Tabela 6 - Comportamento, de camundongos que passaram, ou não, pela separação materna e que aos 45 dias de vida foram submetidos a um estresse por imobilização e avaliados no labirinto em cruz elevado. Os dados representam a média ± desvio padrão..... 74

Tabela 7 - Atividade de netrófilos sangüíneos de camundongos A/J que passaram ou não, pela separação materna e observados para esse parâmetro aos 45 dias de vida. Os dados representam a média ± desvio padrão..... 79

Tabela 8 - Atividade de neutrófilos sangüíneos de camundongos A/J que passaram ou não, pela separação materna e que aos 45 dias de vida foram submetidos a um novo desafio estressor por imobilização. Os dados representam a média ± desvio padrão..... 83

Tabela 9 - Atividade de macrófagos alveolares de camundongos A/J que passaram ou não, pela separação materna e avaliados aos 45 dias de vida. Os dados representam a média ± desvio padrão..... 86

Tabela 10 – Efeitos da separação materna em camundongos A/J, sobre parâmetros hematológicos avaliados aos 45 dias de vida. Os dados representam a média ± desvio padrão..... 89

Tabela 11 – Efeitos da separação materna sobre os níveis e *turnover* hipotalâmicos de noradrenaliana, dopamina e serotonina. Os dados representam a média ± desvio padrão..... 90

Tabela 12 – Efeitos da separação materna sobre os níveis e *turnover* estriatais de noradrenaliana, dopamina e serotonina. Os dados representam a média ± desvio padrão..... 91

Tabela 13 – Efeitos da separação materna sobre os níveis e *turnover* no córtex pré-frontal de noradrenaliana, dopamina e serotonina. Os dados representam a média ± desvio padrão..... 93

Tabela 14 - Efeitos da separação materna sobre os níveis séricos de corticosterona de camundongos A/J aos 45 dias de vida. Os dados representam a média ± desvio padrão..... 94

Tabela 15 - Comportamento, no campo aberto, de camundongos que passaram, ou não, pela separação materna e observados 5 meses após a indução da carcinogênese pulmonar. Os dados representam a média ± desvio padrão..... 97

Tabela 16 - Comportamento, no labirinto em cruz elevado, de camundongos A/J que passaram, ou não, pela separação materna e observados 5 meses após a indução da carcinogênese pulmonar. Os dados representam a média ± desvio padrão..... 101

Tabela 17 – Atividade de neutrófilos sanguíneos, avaliada por citometria de fluxo, de camundongos que passaram, ou não, pela separação materna e observados após a indução da carcinogênese pulmonar. Os dados representam a média ± desvio padrão..... 104

Tabela 18 – Atividade de macrófagos alveolares, avaliada por citometria de fluxo, de camundongos que passaram, ou não, pela separação materna e observados após a indução da carcinogênese pulmonar. Os dados representam a média ± desvio padrão..... 108

Tabela 19 – Produção de NO por macrófagos alveolares, avaliada por ELISA, de camundongos que passaram, ou não, pela separação materna e observados 5 meses após a indução da carcinogênese pulmonar. Os dados representam a média ± desvio padrão..... 111

Tabela 20 – Efeitos da separação materna em camundongos A/J, sobre parâmetros hematológicos observados após a indução da carcinogênese pulmonar. Os dados representam a média ± desvio padrão..... 113

Tabela 21 – Efeitos da separação materna em camundongos A/J, sobre a contagem diferencial de células do sangue periférico observados após a indução da carcinogênese pulmonar. Os dados representam a média ± desvio padrão..... 115

Tabela 22 – Efeitos da separação materna em camundongos A/J, sobre a incidência de nódulos tumorais observados após a indução da carcinogênese pulmonar..... 116

Tabela 23 – Efeitos da separação materna em camundongos A/J, sobre o número de lesões tumorais por grupo observados após a indução da carcinogênese pulmonar. Os dados representam a média ± desvio padrão..... 118

Tabela 24 -– Efeitos da separação materna em camundongos A/J, sobre a porcentagem de área de lesão, o número de lesões por área pulmonar e a área de lesão por número de lesões. Os dados representam a média ± desvio padrão..... 120

Tabela 25 – Efeitos da separação materna em camundongos A/J, sobre a porcentagem de tumores de padrão histológico sólido ou misto..... 120

Tabela 26 – Comportamento de camundongos da linhagem C57BL/6 que passaram, ou não, pela separação materna, avaliados no campo aberto aos 45 dias de vida..... 123

Tabela 27 – Comportamento de camundongos da linhagem C57BL/6 que passaram, ou não, pela separação materna, avaliados aos 45 dias de vida no labirinto em cruz elevado..... 128

Tabela 28 - Atividade de netrófilos sangüíneos de camundongos C57BL/6 que passaram ou não, pela separação materna, observados aos 45 dias de vida..... 131

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO..... 21
2. REVISÃO DE LITERETURA..... 24
2.1. NEUROIMUNOMODULAÇÃO..... 24
2.2. SEPARAÇÃO MATERNA..... 30
2.3. ESTRESSE E DESENVOLVIMENTO TUMORAL..... 33
2.4. CARCINOGÊNESE PULMONAR..... 35
3. OBJETIVOS..... 38
3.1. OBJETIVO GERAL..... 38
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... 38
4. MATERIAIS E MÉTODOS..... 40
4.1. ANIMAIS..... 40
4.2. CORANTES CELULARES..... 41
4.3. REAGENTES E SOLUÇÕES..... 41
4.4. OBTENÇÃO DAS PROLES..... 42
4.5. AVALIAÇÃO DE PARÂMENTROS REPRODUTIVOS..... 43
4.6. SEPARAÇÃO MATERNA..... 43
4.7. FORMAÇÃO DOS GRUPOS..... 44
4.8. TESTES COMPORTAMENTAIS..... 46
4.8.1. Campo aberto..... 46
4.8.2. Labirinto em cruz elevado (Plus-Maze)..... 47
4.8.3. Sistema de observação computadorizada-ethovision..... 48
4.9. CARCINOGÊNESE PULMONAR..... 50
4.10. EUTANÁSIA DO ANIMAL..... 51
4.11. DETERMINAÇÃO DO HEMOGRAMA..... 51
4.12. AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA..... 51
4.12.1. Obtenção do lavado broncoalveolar (LBA)..... 52
4.12.2. Determinação do número de células presentes no LBA..... 52
4.12.3. Avaliação do *burst* oxidativo e da fagocitose de neutrófilos e de macrófagos por citometria de fluxo..... 53
4.12.4. Medida do óxido nítrico (NO) por meio da produção de nitrito (NO_2^-)..... 56
4.13. ESTRESSE POR IMOBILIZAÇÃO..... 57
4.14. AVALIAÇÃO NEUROQUÍMICA..... 58

4.14.1 Coleta e processamento dos tecidos para dosagem neuroquímica..... 58

4.14.2. Dosagens neuroquímicas..... 59

4.15. DOSAGEM DE CORTICOSTERONA SÉRICA..... 59

4.15.1. Coleta de sangue para obtenção do soro para dosagem de corticosterona..... 59

4.15.2. Dosagem de corticosterona..... 59

4.16. EXAME DOS PULMÕES..... 60

4.17. ANÁLISE ESTATÍSTICA..... 61

5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS..... 62

5.1. EXPERIMENTO 1 – Efeitos da separação materna sobre os parâmetros reprodutivos..... 62

5.2. EXPERIMENTO 2 – Efeitos da separação materna sobre o comportamento avaliado no campo aberto e no labirinto em cruz elevado, de camundongos da linhagem A/J avaliados aos 45 dias de vida..... 63

5.3. EXPERIMENTO 3 – Efeitos da separação materna sobre o comportamento avaliado no campo aberto e no labirinto em cruz elevado, de camundongos da linhagem A/J observados aos 45 dias de vida e que foram submetidos a um estresse por contenção..... 68

5.4. EXPERIMENTO 4 – Efeitos da separação materna sobre atividade de neutrófilos sangüíneos, avaliada por citometria de fluxo, em camundongos da linhagem A/J avaliados para esse parâmetro aos 45 dias de vida..... 77

5.5. EXPERIMENTO 5 – Efeitos da separação materna sobre a atividade de neutrófilos sangüíneos de camundongos da linhagem A/J com 45 dias de vida e que foram submetidos a um estresse adicional por imobilização..... 81

5.6. EXPERIMENTO 6 – Efeitos da separação materna sobre a atividade de macrófagos alveolares, avaliada por citometria de fluxo, em camundongos da linhagem A/J avaliados aos 45 dias de vida..... 85

5.7. EXPERIMENTO 7 – Efeitos da separação materna sobre parâmetros hematológicos, de camundongos da linhagem A/J avaliados aos 45 dias de vida..... 88

5.8. EXPERIMENTO 8 – Efeitos da separação materna sobre parâmetros neuroquímicos de camundongos A/J aos 45 dias de vida..... 89

5.9. EXPERIMENTO 9 – Efeitos da separação materna sobre os níveis séricos de corticosterona de camundongos A/J aos 45 dias de vida..... 94

5.10. EXPERIMENTO 10 – Efeitos da separação materna sobre o comportamento avaliado no campo aberto e no labirinto em cruz elevado, de camundongos da linhagem A/J avaliados após o desenvolvimento tumoral..... 95

5.11. EXPERIMENTO 11 – Efeitos da separação materna sobre a atividade de neutrófilos sanguíneos, de camundongos da linhagem A/J avaliados após o desenvolvimento tumoral..... 103

5.12. EXPERIMENTO 12 – Efeitos da separação materna sobre a atividade de macrófagos alveolares, de camundongos da linhagem A/J avaliados após o desenvolvimento tumoral..... 106

5.13. EXPERIMENTO 13 – Efeitos da separação materna sobre a produção de NO por macrófagos alveolares, de camundongos da linhagem A/J avaliados após o desenvolvimento tumoral..... 110

5.14. EXPERIMENTO 14 – Efeitos da separação materna sobre parâmetros hematológicos, de camundongos da linhagem A/J avaliados após o desenvolvimento tumoral..... 112

5.15. EXPERIMENTO 15 – Efeitos da separação materna sobre a incidência tumoral e sobre o número de lesões tumorais por grupo, de camundongos da linhagem A/J avaliados após o desenvolvimento tumoral..... 115

5.16. EXPERIMENTO 16 – Efeitos da separação materna sobre alguns parâmetros microscópicos de tumores de camundongos da linhagem A/J avaliados após o desenvolvimento tumoral..... 119

5.17. EXPERIMENTO 17 – Efeitos da separação materna sobre o comportamento de camundongos da linhagem C57BL/6 aos 45 dias de vida avaliados no campo aberto e no labirinto em cruz elevado..... 122

5.18. EXPERIMENTO 18 Efeitos da separação materna sobre a atividade de neutrófilos sangüíneos, de camundongos da linhagem C57BL/6, avaliada por citometria de fluxo, aos 45 dias de vida..... 130

6. DISCUSSÃO..... 134

7. CONCLUSÕES..... 154

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 158

1. INTRODUÇÃO[1]

A idéia da existência de interações entre os sistemas nervoso e imune é extremamente antiga e tem sido a base da medicina psicossomática. A neuroimunomodulação foi, inicialmente, conceituada como a área de estudo que avalia as influências do sistema nervoso sobre a resposta imune. Acreditava-se naquela ocasião, que essa interação fosse unidirecional; sabe-se, hoje, que o sistema imune também possui fortes influências sobre a atividade do sistema nervoso.

Neste contexto lesões no córtex cerebral, assim como o estresse e variações psicológicas como, por exemplo, aquelas observadas na ansiedade e na depressão, levam a um déficit pronunciado na imunidade, em especial, no número de células esplênicas, na proliferação de linfócitos B, T, T *helper* e T citotóxico, e na atividade de macrófagos. Estas mesmas condições alteram a resposta imune interferindo com o crescimento neoplásico e com o desenvolvimento de infecções em animais; em particular, mostrou-se que estados depressivos estão associados a alterações da função imune, inclusive a uma diminuição da atividade de células NK. Esse último fato que tem recebido considerável atenção por parte da comunidade científica, por ter sido considerado um fator relevante para o desenvolvimento de neoplasias.

Existem muitos modelos de estudos comportamentais para a análise da influência de condições psicológicas/comportamentais sobre a fisiologia animal. Vários estudos têm demonstrado que um estresse vivenciado no período perinatal altera, de forma significante, diversos estados emocionais e

[1] Todas as citações estão presentes na Revisão Bibliográfica.

fisiológicos ao longo da vida do animal. Sabe-se, a este respeito, que o desenvolvimento do comportamento emocional normal em mamíferos jovens depende da interação entre a mãe e o filhote. Em ratos, a presença da mãe é fundamental para a regulação da homeostase fisiológica sendo que a interrupção, mesmo que temporária, do vínculo mãe-filhote produz alterações fisiológicas e comportamentais. Acredita-se que a separação materna represente um estresse agudo, que apresenta conseqüências comportamentais e imunológicas ao longo da vida do animal.

Neste sentido, os linfócitos T (citotóxicos e auxiliares), os linfócitos B, as células NK e os macrófagos foram definidos como as células efetoras mais relevantes da vigilância imunológica contra tumores. Esses tipos celulares compõem os chamados TALs (leucócitos associados aos tumores), cuja presença representa uma resposta imunológica do hospedeiro frente à presença das células neoplásicas. De fato, relatou-se uma associação entre a diminuição da atividade de células NK e o aumento de metástases em modelos animais.

Neoplasias pulmonares encabeçam as causas de morte por câncer em humanos. Uma célula neoplásica origina-se de uma célula normal que sofreu mutações gênicas que são determinantes para a manifestação de um fenótipo alterado, que pode levar à expressão de proteínas também alteradas e, portanto, estranhas ao organismo. A fumaça do tabaco possui vários componentes que se mostram capazes de desenvolver um processo neoplásico. O NNK (4-(Methilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona) é um dos componentes desta fumaça; ele representa uma das nitrosaminas mais abundantes no ambiente humano, tendo grande potencial carcinogênico,

específico para tecidos pulmonares. Em seu conjunto, os dados de literatura mostram que NNK além de possuir capacidade de produzir adutos no DNA, causa supressão imunológica caracterizada, por exemplo, por diminuição de atividade de macrófagos alveolares e de células NK; propicia, desta forma, a formação de neoplasias pulmonares.

Sabendo-se que 1) um estresse por separação materna traz prejuízos psicológicos e imunológicos a um animal; 2) o NNK possui grande capacidade carcinogênica e que interfere de forma direta com a imunidade inata do trato respiratório; 3) o estado emocional está relacionado à imunidade do indivíduo e ao desenvolvimento tumoral, será proposta uma análise dos efeitos de um estresse neonatal gerado por separação materna sobre o comportamento, a imunidade e o desenvolvimento tumoral induzido por NNK em camundongos.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Neuroimunomodulação

A idéia da existência de interações entre os sistemas nervoso e imune é extremamente antiga e tem sido a base da medicina psicossomática. Porém, somente nas últimas duas décadas é que se começou a dar maior importância a esse estudo já que, até então, prevalecia uma tendência de setorialização das abordagens experimentais que se faziam nestes sistemas (CONTI, 2000). No entanto, lembra-se que Galeno, em 200 a.C., já descrevia serem mulheres "melancólicas" mais suscetíveis ao desenvolvimento de neoplasias mamárias que mulheres "sanguíneas" (DUNN, 1995). Aristóteles, afirmava que a "psique" e o corpo reagiam complementariamente um com o outro; para ele, uma mudança no estado da psique produzia uma mudança na estrutura do corpo e, inversamente, uma mudança na estrutura do corpo produzia uma mudança na estrutura da psique.

A neuroimunomodulação foi, inicialmente, conceituada como a área de estudo que avalia as influências do sistema nervoso sobre a resposta imune (REICHLIN, 1993). Acreditava-se, naquela ocasião, que essa interação fosse unidirecional; sabe-se, hoje, que o sistema imune também influência a atividade do sistema nervoso. Neste sentido, BLALOCK e SMITH, em 1980, demonstraram que leucócitos produziam, juntamente com o interferon (IFN) um peptídeo, identificado posteriormente como sendo o hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), com características semelhantes ao liberado pela hipófise. O fato de citocinas, hormônios, neurotransmissores e seus respectivos receptores serem comuns a estruturas presentes, tanto no sistema nervoso

central (SNC), como no endócrino e imune e, também, a constatação de que estes sistemas possuem uma linguagem bioquímica comum, reforçam a idéia da bidirecionalidade da neuroimunomodulação (BLALOCK, 1994).

Atualmente sabe-se que diversos estímulos provenientes do SNC, como lesões no córtex cerebral, estresse e variações psicológicas, são capazes de modular uma resposta imune. Desta forma, estados de ansiedade e depressão, levam a um déficit pronunciado na imunidade, em especial, no número de células esplênicas, na proliferação de linfócitos B, T, T *helper* e T citotóxico, na atividade e no número de células *natural killer* (NK) e na atividade de macrófagos (RENOUX; BIZIERE, 1991; PALERMO-NETO et al., 2001; FONSECA; MASSOCO; PALERMO-NETO, 2002; MASSOCO e PALERMO-NETO, 2003; PALERMO-NETO et al., 2003, ALVES et al., 2006). Estas mesmas condições alteram a resposta imune interferindo com o crescimento neoplásico e com o desenvolvimento de infecções em animais (PALERMO-NETO et al., 2001; PALERMO-NETO et al., 2003; SAKAI et al., 2006a, 2006b).

Desta forma, o sistema endócrino, em especial, o eixo Hipotálamo Pituitária Adrenal (HPA), é um dos responsáveis por vários elos de ligação entre estes dois sistemas (DUNN, 1995; COHEN; HERBERT, 1996; CONTI, 2000; ADER, 2007). Sabe-se, também, que as endorfinas, o Sistema Nervoso Autônomo (SNA) (BLALOCK, 1989) e também medicamentos de ação central, como o diazepam (LAZZARINI et al., 2001, 2006; SAKAI et al., 2006a, 2006b) e psicoestimulantes, entre eles a anfetamina (LIGEIRO DE OLIVEIRA et al., 2004) podem interferir tanto positivamente quanto negativamente com a resposta imune.

A ativação do eixo HPA, e a conseqüente produção dos glicocorticóides, durante o estresse são um dos principais mecanismos responsáveis pelas alterações encontradas no decorrer de uma resposta imune. Sabe-se serem os glicocorticóides capazes de inibir a transcrição de genes para inúmeras citocinas, como da interleucina (IL) 1, a IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, IL-13, IL-16, fator de necrose tumoral (TNF), interferon γ (IFN- γ) e fator estimulante de colônia de granulócitos e monócitos (GM-CSF) (ADER, 2007).

Ainda em relação aos glicocorticoides, podemos citar que eles agem em múltiplos níveis da resposta imune, por exemplo, ativa a expressão de proteínas anti-inflamatórias. Os receptores de glicocorticóides podem inibir a resposta imune através de uma inibição da transcrição de fatores pro-inflamatórios, alterar a produção de citocinas e reduzir a expressão de receptores de citocinas. Além disso, pode interferir negativamente com o desenvolvimento e migração de células T através de uma inibição da expressão de moléculas de adesão (SCHONEVELD; CIDLOWSKI, 2007).

Portanto, um aumento na produção de glicocorticóides endógenos, originados de estímulos estressores, pode ter um enorme impacto no sistema imune. Desta forma, Zhou et al. (1993), demonstraram que ratos submetidos a situações estressantes, como, por exemplo, choque nas patas, apresentaram um aumento dos níveis plasmáticos de ACTH, corticosterona e IL-6. Neste sentido, já foi demonstrado que um estresse agudo por frio e contenção provocaram em camundongos um aumento nos níveis séricos de corticosterona, IL-6 e IFN- γ, além de apresentarem um maior número de bactérias (*Listeria monocytogenes*) viáveis em órgãos como o baço e fígado após uma infecção experimental (CAO; LAWRENCE, 2002).

Diversos trabalhos realizados em nossos laboratórios também demonstraram influências do estresse sobre o sistema imune. Fonseca, Massoco e Palermo-Neto (2002) mostraram que um estresse aplicado em fêmeas gestantes, interferia com parâmetros comportamentais relacionados a ansiedade e diminuia a atividade de macrófagos da prole. Outro trabalho bastante interessante realizado em nossos laboratórios por Alves e colaboradores (2006) monstrou que a coabitação de um camundongo com outro, portador de um tumor ascítico de Ehrlich, provocava nesse companheiro "sadio" uma redução na atividade de neutrófilos.

Sabe-se, ainda, que os glicocorticóides podem levar a um desbalanço nas respostas Th1/Th2, isto é, a um direcionamento para Th2. O mecanismo principal através do qual isso ocorre, acredita-se, seja decorrência de uma supressão na produção de citocinas Th1 e um aumento de síntese de citocinas Th2. Este desequilíbrio é de grande relevância, pois uma tendência à resposta imunológica do tipo Th2 já foi relatada como sendo capaz de tornar indivíduos mais susceptíveis a determinados tipos de doenças, como as alergias (BASHIR et al., 2004). Neste sentido, um estudo realizado por Portela e colaboradores (2001), mostrou que ratos previamente sensibilizados por ovalbumina (OVA), submetidos concomitantemente a estresse por choque nas patas e a um conseqüente desafio com OVA, apresentavam um menor tempo de interação social com outro rato no campo aberto e um maior número de leucócitos do lavado broncoalveolar após o desafio, quando comparados a animais não estressados.

Outra forma de interação do SNC com o sistema imune, além do eixo HPA, ocorre através do sistema nervoso simpático (SNS) e parassimpático

(SNP). Besedovsky e Del Rey em 1979 e 1981, foram os primeiros a demonstrar que uma ativação do SNS podia regular a resposta de anticorpos (SANDERS; KAVELARS, 2007).

O SNS está relacionado às respostas de “ataque ou fuga”, que mediam uma imediata regulação cardiovascular, respiratória e funções metabólicas durante esses períodos críticos. Portanto, é de se esperar que o sistema imune esteja sob regulação do SNS via liberação de noradrenalina a partir dos terminais nervosos e de adrenalina pela medula da adrenal. De fato, sabe-se que tanto os órgãos linfóides primários quanto os secundários possuem inervação simpática; consequentemente, as células desses órgãos ser passíveis de uma ação por parte da noradrenalina. Da mesma forma, já foram identificados receptores adrenérgicos, α e β, em células imunes, como por exemplo, em linfócitos (QIU et al., 2005; SANDERS; KAVELARS, 2007).

Por outro lado, alguns trabalhos já monstraram que uma estimulação elétrica do nervo vago reduziu a concentração de TNF-α e de citocinas pró-inflamatórias durante uma endotoxemia sem interferir com a concentração de citocinas anti-inflamatórias (BORIKOVA et al., 2000; PAVLOV et al., 2006).

Nesses sentido, sabe-se que a presença de um processo inflamatório é detectada por aferências do nervo vago (sensoriais) que se destinam primeiramente ao núcleo do trato solitário da medula oblonga. Esse núcleo, por sua vez, liga-se a estruturas como, por exemplo, o hipotálamo, permitindo respostas (*output)* anti-inflamatório, que se faz através de eferencias do próprio nervo vago, ou seja, via sistema colinérgico, esse processo que recebeu o nome de reflexo inflamatório (TRACEY, 2002; PAVLOV; TRACEY, 2005; GALLOWITSCH-PUERTA; PAVLOV, 2007).

Por outro lado, mostrou-se que substâncias liberadas por células do sistema imune são capazes de modular a atividade de áreas específicas do SNC e, dessa forma, o comportamento animal. Nesta mesma linha, Basso e colaboradores (2003) mostraram em nossos laboratórios, que uma reação alérgica intestinal é capaz de alterar tanto o comportamento de animais como a atividade de células do núcleo paraventricular do hipotálamo do núcleo central da amígdala. Mostraram também, que as fibras nervosas do tipo C desempenharam um importante papel nos mecanismos ligados a esta manifestação neuroimune (BASSO et al., 2004). Outro trabalho interessante, realizado por Costa-Pinto e colaboradores (2005), demonstrou em um modelo de asma alérgica por OVA, que durante as crises, há um aumento na atividade do núcleo paraventricular do hipotálamo e do núcleo central da amígdala que são áreas no SNC associadas com respostas emocionais. Alem disso, os camundongos alérgicos, apresentavam aversão ao compartimento escuro de um aparato de esquiva passiva quando esse foi pareado com a nebulização do alérgeno OVA, enquanto que os animais do grupo controle entravam e permaneciam por mais tempo no lado escuro da caixa do teste.

Neste sentido, a produção e liberação de citocinas provoca uma resposta endócrina desencadeada pela ação direta e/ou indireta destas no SNC. As citocinas, de um modo geral, são mediadores solúveis produzidos por células imunes ativadas que servem de comunicação célula a célula no sistema imune. Porém, essas mesmas proteínas também atuam como mensageiras entre o sistema imune e células do SNC. Durante o curso de uma infecção, a liberação de citocinas na periferia pode ter ações no sistema neuroendócrino e, no comportamento (DANTZER, 2007). Um modelo bem claro da ação de citocinas

no SNC é o desenvolvimento do comportamento doentio. Esse tipo de comportamento pode ser observado após a injeção de IL-1 ou de um lipopolissacarídeo de *E. coli* (LPS) onde se verifica febre, anorexia, redução da atividade exploratória e da interação social (KELLEY et al., 2003; COHN; SÁ-ROCHA, 2006).

2.2. Separação Materna

Existem diversos modelos de estudos comportamentais para a análise da influência de condições comportamentais sobre a fisiologia animal. Um modelo de indução de estresse/ansiedade é a separação materna. HARLOW e HARLOW, em 1965, demonstraram, com macacos *Rhesus*, que experiências de estresse vividas ao nascer provocavam efeitos psicológicos que se mantinham por longo tempo, mesmo na idade adulta.

Sabe-se, a este respeito, que o desenvolvimento do comportamento emocional normal em mamíferos jovens depende da interação entre a mãe e os filhotes. Em ratos, a presença da mãe é fundamental para a regulação da homeostase fisiológica sendo que a interrupção, mesmo que temporária, deste vínculo produz alterações fisiológicas e comportamentais (ZIMMERBERG e SHARTRAND, 1992; STANTON e LEVINE, 1990). Desta forma, estudos têm apontado para o fato de que a separação materna influencia o estágio final de desenvolvimento neural. Neste sentido, já foi demonstrado que a separação materna interfere com a sinaptogênese hipocampal e com a proliferação celular do giro denteado (LIU et al, 2000; YAP et al 2006).

A privação materna vivida nas primeiras 24 horas após o nascimento é suficiente para alterar a atividade do eixo HPA e produzir, na idade adulta, diferentes alterações comportamentais nos animais; assim, por exemplo, essa separação altera respostas a situações que envolvem medo e/ou emocionalidade, bem como o comportamento condicionado em uma situação aversiva (PENKE et al., 2001; GARTSIDE et al., 2003). Ratos adultos que foram submetidos ao estresse induzido por uma breve separação materna, após o nascimento, mostraram uma alteração da atividade exploratória quando avaliados no campo aberto; esses efeitos foram detectados até mesmo na 66ª e na 92ª semanas de vida (KANEKO et al., 1994; MATTHEWS et al., 1996; MUNEOKA et al., 1994).

Estudos realizados com macacos demonstraram distúrbios comportamentais, como aumento de vocalização, medo, tremores e acessos de raiva, após separação materna nas primeiras 2 semanas de vida. Também foi demonstrada a presença de fases depressivas caracterizadas por: andar relaxado, reduzida atividade motora e afastamento do grupo. Nesses períodos, esses animais apresentavam também uma redução na proliferação dos linfócitos (LAUDENSLAGER et al., 1982; LAUDENSLAGER et al., 1990).

A imunocompetência de um recém nascido passa por influencias de vários contextos ambientais, entre eles do cuidado materno. Portanto o desenvolvimento da imunidade também é encarado por certos autores como uma forma de “processo de aprendizado” (COE; LUBACH, 2007). Desta maneira, eventos estressantes na infância e interrupções no cuidado materno carreiam potencial para levar a efeitos deletérios na resposta imune e na resistência a doenças ao longo da vida (COE; LUBACH, 2007).

O sistema imune também passa por alterações quando da privação materna; estas alterações são, provavelmente, conseqüentes a mudanças na função hipotalâmica, no eixo HPA e/ou naquela ligada à maturação do sistema imune. ACKERMAN e colaboradores (1988) demonstraram, em ratos, que foram submetidos a privação materna no 15º dia de vida, uma diminuição na resposta de linfócitos do sangue periférico à fitoemaglutinina, medida no 40º dia de vida e, também, uma linfopenia. Outro trabalho, realizado com macacos *Rhesus,* mostrou que a privação de um cuidado materno, produziu nesses animais uma diminuição na atividade de células CD8 e NK, do dia do nascimento aos 2 anos de idade (LUBACH et al., 1995). Em macacos que sofreram separação materna, mostrou-se, também, uma diminuição da resposta proliferativa de linfócitos B e T a mitógenos (LAUDENSLAGER et al., 1985).

Sabe-se ainda, que existe uma fase chamada de "período hiporesponssivo ao stress", que abrange as duas primeiras semanas de vida dos roedores, sendo este considerado um período crítico para a maturação do eixo HPA (WIGGER & NEUMANN, 1991; ROMAN, et al., 2006; SCHMIDT, et al., 2006; AISA, et al., 2007). Durante este período hiporesponssivo, o cuidado materno é o principal fator regulador da atividade adrenocortical (LEVINE, 2002).

Portanto, a separação materna representa um estresse agudo, que tem conseqüências na fase adulta da prole; em especial, sobre a aprendizagem e a memória, os níveis de ansiedade e a função imunológica.

2.3. Estresse e desenvolvimento tumoral

Uma célula neoplásica origina-se de uma célula normal que sofreu mutações gênicas que são determinantes para a manifestação de um fenótipo alterado, que pode levar à expressão de proteínas também alteradas e, portanto, estranhas ao organismo. Podem, assim, incitar uma resposta do hospedeiro, visto que tais proteínas serviriam como antígenos tumorais, sendo reconhecidos pelo sistema imune.

O organismo animal está constantemente exposto a uma grande variedade de estímulos estressores físicos, químicos e biológicos. Com o objetivo de se adaptar ou resistir ao estresse, as células estão equipadas com múltiplos sistemas de sinalização para o desenvolvimento de uma resposta. Esses sistemas de sinalização estão envolvidos com um processo de eliminação de células que sofreram grande dano induzido pelo estresse, como por exemplo a indução de apoptose. Essas células podem produzir certas respostas aberrantes que têm potencial para levar ao desenvolvimento de várias doenças, como o câncer (MURAKAMI, et al., 2007).

Os linfócitos T (citotóxicos e auxiliares), linfócitos B, NK e os macrófagos foram definidos como células efetoras da vigilância imunológica contra tumores (ABBAS et al., 1994). Esses tipos celulares compõem os chamados TALs (leucócitos associados aos tumores), cuja presença representa uma resposta imunológica do hospedeiro frente à presença das células neoplásicas (O'SULLIVAN e LEWIS, 1994). Porém, neoplasias induzidas por carcinógenos químicos induzem o aparecimento de células tumorais que apresentam uma

grande variedade antigênica dificultando, então, o melhor reconhecimento pelo sistema imunológico (TIZARD, 1996).

A função imune que tem sido mais relacionada com fatores psicológicos e com o desenvolvimento de neoplasias é aquela relacionada à atividade das células NK e dos macrófagos (HERBERT e COHEN, 1993). As células NK são células granulares grandes, não fagocitárias e que são influenciadas por perforinas e citocinas (TIZARD, 1996). Relatou-se uma associação entre a depressão de atividade de células NK e o aumento de metástases em modelos animais (GORELIK e HERBERMAN, 1986). Experimentos com modelos de estresse têm demonstrado supressão da função de células NK, tanto em animais quanto em seres humanos (IRWIN et al., 1990; SHAVIT et al., 1984). Um trabalho bastante interessante conduzido em nossos laboratórios por Sá-Rocha e colaboradores (2006), demonstrou, através de um modelo de estudo de hierarquia social que permitia definir tanto a dominância quanto a submissão, que animais tidos como submissos apresentavam comportamentos relacionados à ansiedade, diminuição na citotoxicidade de células NK no sangue periférico e no baço e aumento no número de metástases pulmonares do melanoma B16F10.

Outra forma de ilustrar a relação entre estresse e carcinogênse seria através de um aumento na expressão de IL-1, IL-6 e TNF-α liberadas pelas células macrofágicas e redução na expressão de IL-2, IFN-γ e moléculas do MHC classe-II e redução na atividade de células NK. Muitos carcinomas estão relacionados com altas concentrações de TNF-α que inibem a atividade da tirosina fosfatase, que diminui a expressão da molécula do MHC classe-I na superfície celular, permitindo então, que células que possuam certa

malignidade escapem da ação do sistema imune. Desta forma, o estresse levaria a uma diminuição na expressão da molécula do MHC classe-I e a uma redução na atividade de células NK (REICH; NUNES; MORIMOTO, 2004).

Estados depressivos também foram associados a alterações da função imune, inclusive com diminuição da atividade de células NK, fato que tem recebido considerável atenção por ter sido considerado um fator contribuinte ao desenvolvimento de neoplasias (COHEN e HERBERT, 1996). MORGULIS e colaboradores (2004), utilizando um modelo de comportamento doentio para a indução de estresse/depressão, demonstraram haver correlações entre alterações comportamentais e desenvolvimento do tumor ascítico de Ehrlich (número de células) em camundongos.

2.4. Carcinogênese pulmonar

Neoplasias pulmonares encabeçam as causas de morte por câncer em humanos; mais de 85% do total dessas neoplasias estão relacionadas à fumaça do tabaco (WILLIAMS e SANDLER, 2001; WYNDER, 1997). A fumaça do tabaco possui vários componentes capazes de desenvolver um processo neoplásico, sendo que um derivado da nicotina, o 4-(Methilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK) é, neste sentido, um dos mais importantes. Trata-se de uma das nitrosaminas mais abundantes no ambiente humano, com grande potencial carcinogênico, específico para tecidos pulmonares (HECHT, 1998).

Este composto é metabolizado por enzimas do citocromo P450 presentes nos pneumócitos do tipo II. Sua metabolização gera subprodutos ainda mais potentes, com capacidade de formar adutos no DNA, em sítios gênicos

específicos relacionados à carcinogênese, como, por exemplo, os protooncogenes e genes supressores de tumor (HECHT, 1999); torna-se, assim, possível o início de um processo carcinogênico.

Macrófagos alveolares (MAs) estão localizados no trato respiratório dos alvéolos até a laringe e são as células de maior abundância no lúmen aéreo e no espaço alveolar. São, assim, os MAs as principais células ligadas à manutenção da homeostase imunológica do trato respiratório, produzindo diversos mediadores como o fator de necrose tumoral (TNF) e o óxido nítrico (NO). A proteína-1α do macrófago inflamatório (MIP-1α), em geral, está envolvida no recrutamento de leucócitos e na produção de interleucina (IL)-12, conhecida por regular a atividade citotóxica de outros macrófagos, de linfócitos e de células NK (KRAAL et al., 1997; CAVAILLON, 1994). Além disso, MAs podem produzir citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e o fator transformador de crescimento-α (TGF-α), que estão envolvidas na supressão da imunidade anti-tumoral do hospedeiro (CAVAILLON, 1994).

Um estudo realizado por GOUD e KAPLAN (1999), demonstrou que camundongos tratados com doses de 100 ou 250 mg/kg de NNK apresentaram diminuição na atividade de células NK no baço, nos linfonodos e no pulmão. Esses mesmos autores salientaram que a imunossupressão causada pelo NNK não se devia a uma diminuição do número de células NK circulantes, mas sim de sua atividade. THERRIAULT e colaboradores (2003) demonstraram *in vitro* que um tratamento realizado por 20 horas com NNK resultou: a) em uma inibição da produção de TNF pelos MAs; b) em uma inibição de cerca de 35,4% da liberação de IL-12 pelos MAs; c) em uma inibição, dose-dependente, da produção de NO (máximo de inibição igual a 20,1%, após 1000 M de NNK); d)

em uma diminuição da produção de MIP-1; e) em uma estimulação da produção de IL-10 e f) em uma estimulação da liberação de prostaglandina E_2 (PGE_2), que sabe-se estar relacionada tanto à proliferação de células tumorais como à supressão imunológica.

RIOUX e CASTONGUAY (1997) administraram antiinflamatórios não-esteroidais em camundongos fêmea da linhagem A/J, quando estes recebiam NNK cronicamente (7 semanas). Este estudo demonstrou redução de 60% na atividade citotóxica das células NK; mostraram, também, um aumento nos níveis plasmáticos de PGE_2 em 100% dos animais que não receberam o antiinflamatório. Porém, os efeitos imunossupressores do NNK foram quase que totalmente revertidos, quando os animais recebiam ácido acetisalicílico ou um inibidor específico de ciclooxigenase 2, sugerindo estes achados, que os efeitos do NNK estariam, de alguma forma, relacionados a uma modulação por PGE_2. Em seu conjunto, os dados de literatura mostram que NNK além de possuir capacidade de produzir adutos no DNA, causa supressão imunológica e propicia a formação de neoplasias pulmonares.

3. OBJETIVOS

Serão apresentados em dois itens: geral e específicos.

3.1. Objetivo geral:

Estudar os efeitos da separação materna sobre o comportamento, imunidade inata e crescimento tumoral de uma prole de camundongos machos adultos.

3.2. Objetivos específicos:

3.2.1. Verificar os efeitos da separação materna sobre o comportamento da prole de machos A/J medido aos 45 dias de vida;

3.2.2. Verificar os efeitos da separação materna sobre o comportamento da prole de machos A/J, medido na fase adulta, após um desafio estressor;

3.2.3. Avaliar a atividade de neutrófilos sangüíneos e macrófagos alveolares de camundongos A/J que passaram pela separação materna, medido aos 45 dias de vida;

3.2.4. Avaliar a atividade de neutrófilos sangüíneos de camundongos A/J que passaram pela separação materna, medido na fase adulta, após um desafio estressor;

3.2.5. Avaliar as alterações hematológicas provocadas pela separação materna camundongos A/J aos 45 dias de vida;

3.2.6. Avaliar alterações neuroquímicas no sistema nervoso central (SNC) provocadas pela separação materna em camundongos A/J aos 45 dias de vida;

3.2.7. Avaliar alterações nos níveis séricos de corticosterona provocadas pela separação materna em camundongos A/J aos 45 dias de vida;

3.2.8. Verificar os efeitos da separação materna sobre o comportamento da prole de machos A/J medido após o desenvolvimento tumoral;

3.2.9. Avaliação da atividade de neutrófilos e macrófagos alveolares de camundongos A/J que passaram pela separação materna, após o desenvolvimento tumoral;

3.2.10. Verificar a presença de alterações hematológicas provocadas pela separação materna, antes e após o desenvolvimento tumoral em camundongos A/J;

3.2.11. Verificar e quantificar a presença de lesões macroscopicamente visíveis nos pulmões dos animais submetidos ao experimento de carcinogênese pulmonar e que passaram ou não pela separação materna;

3.2.12. Quantificar o número, área e tipo de adenomas em exame histopatológico nos animais submetidos ao experimento de carcinogênese pulmonar e que passaram ou não pela separação materna;

3.2.13. Caracterizar os efeitos da separação materna sobre o comportamento da prole de machos C57BL/6, medido na fase adulta;

3.2.14. Avaliar a atividade de neutrófilos sangüíneos em camundongos C57BL/6 que passaram pela separação materna, medido na fase adulta.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Farmacologia Aplicada e Toxicologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP).

4.1. Animais:

Foram utilizados camundongos machos adultos, das linhagens A/J e C57BL/6, provenientes de proles obtidas no Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ - USP). Os animais foram utilizados seguindo as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais de laboratório do Comitê de Ética da FMVZ – USP (Protocolo de aprovação – nº760/2005).

Antes do início dos experimentos, os animais foram alojados, por um período de 7 dias, em gaiolas de propileno (28 x 17 x 12cm) em número de 5 animais por gaiola para adaptação às condições do biotério experimental. Estas gaiolas foram devidamente acondicionadas em salas cuja temperatura ambiente (24 a 26°C) e umidade (65 a 70%) foram mantidas por meio de aparelhos de ar condicionado central, com ventilação, exaustão e luminosidade controladas, obedecendo-se a um ciclo claro – escuro de 12 horas, com início da fase clara às 7:00 horas. Os animais foram alimentados com ração balanceada para roedores NUTRILABOR GUABI®. A ração e a água foram fornecidas aos animais *ad libitum* durante todos os experimentos. Após um

período de adaptação de, no mínimo 7 dias, foram realizados os experimentos propostos.

4.2. Corantes Celulares:

- Azul de TRIPAN (*Merck*®) a 0,1% - Utilizado para corar as células do lavado bronco alveolar.
- ROSENFELD (*Merck*®) - Utilizado para corar as células coletadas do sangue periférico para contagem diferencial de leucócitos.

4.3. Reagentes e soluções:

- Diacetato 2`7`Diclorofluoresceína (DCFH-DA/ Molecular Probes, Eugene, OR) - empregado na citometria de fluxo. Este reagente foi mantido congelado (-20ºC) e protegido da luz, sendo dissolvido em PBS no momento de uso;
- EDTA (Sigma®) - utilizado na técnica de fagocitose, na concentração de 3mM, com o objetivo de interromper a reação após o período de incubação das amostras;
- Heparina (Liquemine®-Roche) – anticoagulante utilizado nas coletas de amostras de sangue;

- Iodeto de Propídio (PI) (Sigma®) - utilizado na técnica de citometria de fluxo, responsável pela emissão de fluorescência vermelha captada pelo citômetro;
- NaCl 0,2% e 1,6%- Soluções utilizadas com o objetivo de romper as hemácias presentes nas amostras analisadas no citômetro de fluxo;
- NaCl 0,85% e NaCl 0,9% - Soluções utilizadas na técnica de conjugação do *Staphylococcus aureus* - **Cepa ATCC 25923** (DIFCO®) - bactéria marcada com Iodeto de Propídio (Sigma, St Louis, MO) utilizada para avaliar a atividade fagocítica de neutrófilos sangüíneos.
- PBS (Phosfate-buffered saline, pH=7,2-7,4) - Solução utilizada nas técnicas de *burst* oxidativo e fagocitose;
- PBS glicosado - Solução utilizada na técnica de conjugação do *Staphylococcus aureus*;
- PMA - Miristato-acetato de forbol-(Calbiochem®) - utilizado como estímulo para desencadear o *burst* oxidativo de neutrófilos.

4.4. Obtenção das proles:

Em cada caixa, foram colocadas duas fêmeas e um macho para o cruzamento. A presença do tampão vaginal foi considerada indicativa do primeiro dia de gestação (DG1). No dia do nascimento (dia pós-natal 1 – DPN1) foram avaliados os parâmetros reprodutivos (veja 4.5). Os animais foram submetidos ao estresse da separação materna, conforme descrito abaixo no item 4.6. Os filhotes restantes foram utilizados em outros experimentos realizados em nossos laboratórios.

4.5. Avaliação de parâmetros reprodutivos:

As fêmeas foram avaliadas quanto aos seguintes parâmetros reprodutivos: duração da gestação, presença de natimortos, presença de mal-formação nos filhotes e relação macho/fêmea. O peso da ninhada foi determinado somente no DPN30 (ao desmame) para evitar a interferência de estresse por manipulação.

Estes dados reprodutivos foram comparados com o histórico do Biotério. Apenas filhotes de fêmeas com parâmetros reprodutivos "normais" do Biotério foram utilizados.

4.6. Separação materna:

Camundongos recém nascidos foram submetidos a uma separação materna entre o primeiro e o décimo terceiro dia de vida (DN1 ao DPN13). Para tanto, os filhotes foram separados das mães por um período de 1 hora por dia. Durante o período de separação, os animais foram alojados em pequenas caixas plásticas com serragem/tecido. As gaiolas que receberam os filhotes foram mantidas sobre uma manta térmica aquecida à temperatura de 36^{o}C, com umidade de 50% (**figura 1)**. A separação se deu durante a manhã da fase clara do ciclo (das 8 às 12 horas). Ao término do período de separação, os animais retornaram às suas gaiolas e às suas mães (adaptado de KIKUSUI et al, 2005).

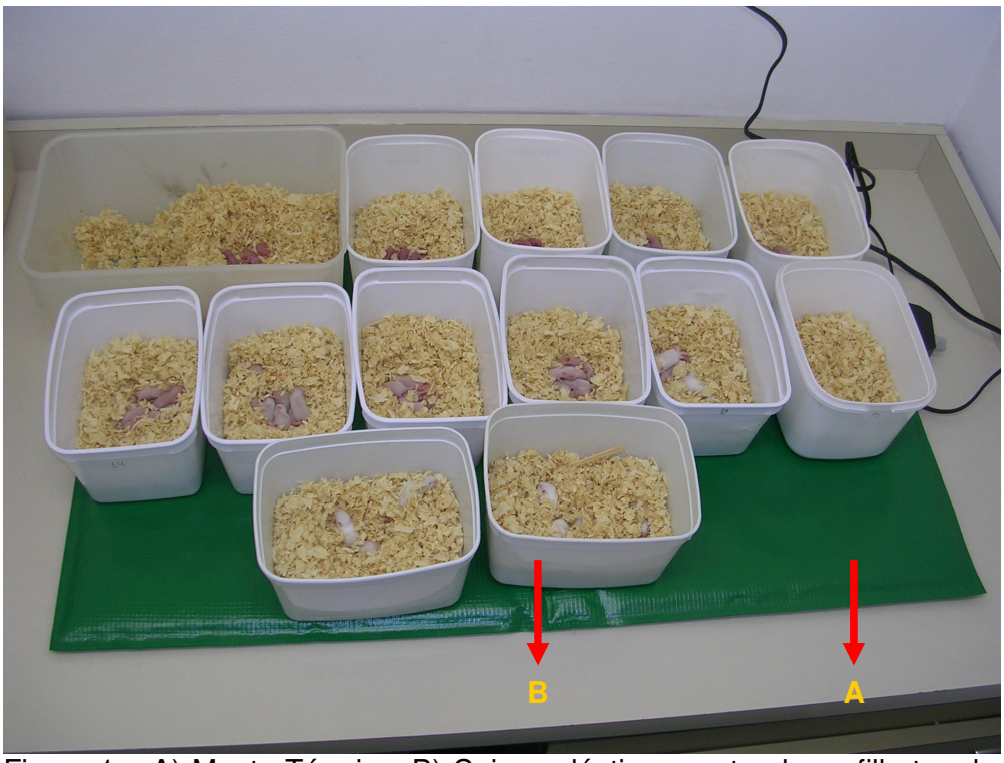


Figura 1 – A) Manta Térmica; B) Caixas plásticas contendo os filhotes do grupo experimental separados das mães.

4.7. Formação dos grupos:

Ao atingirem a idade de desmame, os machos foram separados das fêmeas e, estas, foram utilizadas em outros experimentos realizados em nossos laboratórios.

Após essa separação por sexo, os machos foram divididos em grupos. Na formação desses grupos, evitou-se que os filhotes de uma mesma ninhada fossem distribuídos para um mesmo grupo. Este procedimento pretendeu evitar variáveis eventualmente presentes e ligadas especificamente às mães.

Os grupos formados para os experimentos conduzidos aos 45 dias de vida foram:

• **Controle**: Proles que não foram submetidos ao estresse por separação materna.

• **Separação Materna (SM):** Proles que foram submetidos ao estresse por separação materna.

Os grupos formados para os experimentos de carcinogênese foram:

• **Controle + Salina:** Proles que não foram submetidos a separação materna e que aos 45 dias de vida receberam solução salina a 0,9%.

• **Controle + NNK:** Proles que não foram submetidos a separação materna e que aos 45 dias de vida receberam o carcinógeno pulmonar NNK.

• **Separação Materna + Salina:** Proles que foram submetidos a separação materna e que aos 45 dias de vida receberam solução salina a 0,9%.

• **Separação Materna + NNK:** Proles que foram submetidos ao estresse por separação materna e que aos 45 dias de vida receberam receberam o carcinógeno pulmonar NNK.

4.8. Testes comportamentais:

A fim de se avaliar as alterações comportamentais dos animais submetidos ou não à separação materna, foram realizados testes no campo aberto e no labirinto em cruz elevado utilizando-se o sistema de observação computadorizado Ethovision® para o registro dos parâmetros.

4.8.1. Campo aberto:

O campo aberto que foi utilizado para medir a atividade geral dos animais foi descrito em detalhes por FAGGIN e PALERMO-NETO (1985).

A medida dos parâmetros indicativos da atividade geral foi realizada por intermédio de um sistema indireto, ETHOVISION (VIDEO TRACKING MOTION & BEHAVIOR RECOGNITION SYSTEM® VERSÃO 1.90), descrito abaixo e sempre no mesmo período do dia (entre as 8h00 e 14h00). Para as observações, os animais foram colocados, individualmente, no centro da arena, por 5 minutos, tomando-se o cuidado de intercalar os camundongos dos diferentes grupos para observação, buscando-se, assim, minimizar possíveis efeitos decorrentes de variações circadianas na atividade dos animais. Com a finalidade de evitar influência de odores, a arena era higienizada com uma solução de água:álcool a 5% imediatamente antes da introdução de cada animal.

Os parâmetros considerados indicativos da atividade geral, no campo aberto, foram os seguintes: 1) distância percorrida (cm): corresponde ao ato de o animal entrar com as quatro patas em uma das divisões (zonas) do piso da

arena e se locomover; 2) freqüência de levantar: corresponde ao ato de o animal permanecer apoiado em suas patas posteriores, com o tronco perpendicular ao chão da arena, com sua cabeça voltada para cima, apoiando-se ou não nas paredes do campo aberto; 4) tempo (s) em movimento: quanto tempo o animal se movimentou no interior das zonas do campo aberto; 5) velocidade média (cm/s): corresponde à distância percorrida pelo animal, por unidade de tempo; 6) número de *grooming* (auto-limpeza): ato de limpar qualquer parte da superfície corporal com língua, dentes e/ou patas dianteiras; 7) tempo de *grooming*: tempo gasto pelo animal na realização de *grooming*.

4.8.2. Labirinto em cruz elevado (Plus-Maze):

O estudo dos níveis de ansiedade foi realizado no labirinto em cruz elevado como descrito por PELLOW (1985). Em resumo, a avaliação do comportamento nesse labirinto foi feita colocando-se cada animal, individualmente, no centro do aparelho, com a cabeça voltada para um dos braços fechados. Foi considerada como "entrada" em um dos braços, ou permanência nos braços, o ato de o animal colocar as quatro patas dentro de cada área do aparelho. Cada animal foi observado por 5 minutos, através do sistema indireto ETHOVISION, que será descrito em 3.8.3.

Como indicativo da avaliação do comportamento foram registrados os seguintes parâmetros:

- Número de entradas nos braços abertos (EA): corresponde ao ato de o animal entrar nos braços abertos com as quatro patas;

• Número de entradas nos braços fechados (EF): corresponde ao ato de o animal entrar nos braços fechados com as quatro patas;

• Tempo de permanência nos braços abertos (TA): corresponde ao tempo de permanência neste braço, em segundos;

• Tempo de permanência nos braços fechados (TF): corresponde ao tempo de permanência neste braço, em segundos.

Foram calculados, para cada animal, o número total de cruzamentos (soma do número de entradas nos braços abertos e nos braços fechados) e a porcentagem de entradas e de tempo despendidos por eles, na exploração nos braços abertos, conforme mostrado a seguir:

$$\% \text{ de EA} = \frac{\text{EA} \times 100}{\text{EA} + \text{EF}} \qquad \% \text{ de TA} = \frac{\text{TA} \times 100}{\text{TA} + \text{TF}}$$

As observações foram realizadas sempre no mesmo período do dia (entre as 8:00 e 12:00 hs), intercalando-se os animais dos diferentes grupos. O labirinto foi higienizado como já descrito para o campo aberto.

4.8.3. Sistema de observação computadorizada-Ethovision®:

Para as análises comportamentais, foi utilizado o aparelho Ethovision® (Noldus Infamation Technology®, Wageningen, The Netherlands) que consiste em um sistema de rastreamento em vídeo, análise de movimento e reconhecimento comportamental. O sistema engloba um programa Etho Vision Pro Color 1.9 e itens de *hardware*: câmera filmadora (CCD-Iris Color Sony), monitor de vídeo (Sony), computador (Pentium 133, 16MB de memória RAM, 1,2 gB de disco rígido) com placa de captura de vídeo (TARGA + Truevision,

2D NTSC), monitor SVGA, teclado e mouse, além de cabos e conectores **(figura 2)**.

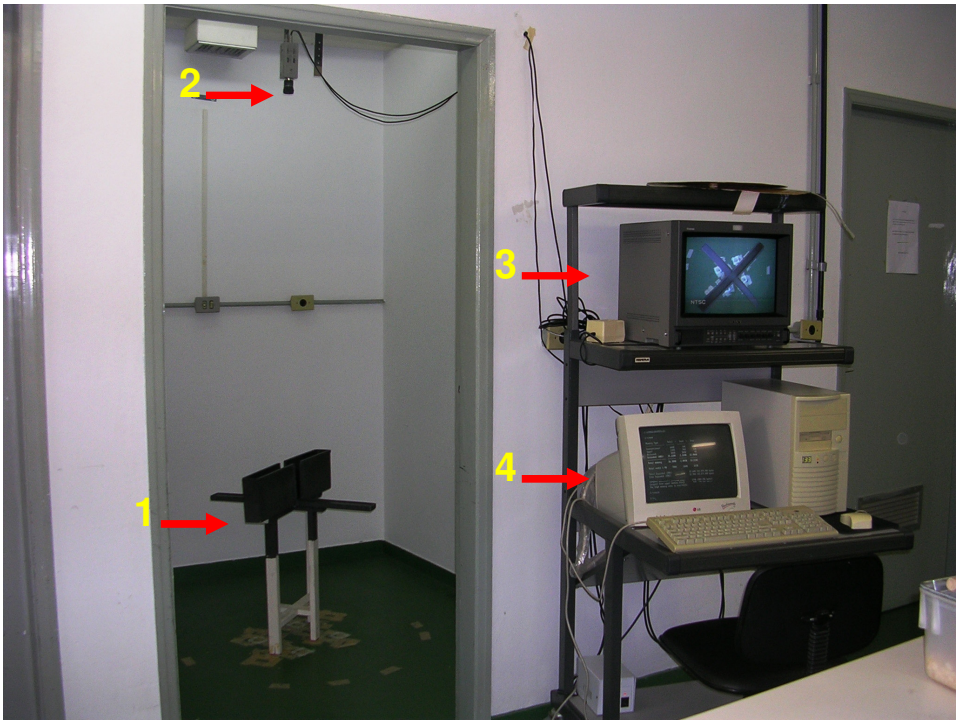


Figura 2 - Etho Vision® - (Vídeo Tracking Motion & Behavior Recognition System Versão 1.90) - equipamento de rastreamento em vídeo, utilizado no procedimento experimental para análise de movimentos As setas indicam: **1**-Labirinto em cruz para camundongo, **2**-Câmera filmadora acoplada ao computador, **3**-Monitor de vídeo e **4**-Imagem digitalizada representada em *pixels*.

A partir de imagens recebidas pela câmera filmadora e digitalizadas na placa de captura, o programa gera coordenadas (x e y) provenientes do centro de gravidade do animal, em intervalos de tempo determinados, obedecendo à uma taxa de amostragem de 6,66 amostras por segundo.

Uma vez que a imagem digitalizada é representada em *pixels* (*picture elements* – elementos de imagem), para que as coordenadas do animal sejam fielmente usadas para calcular seu deslocamento real, em centímetros, foi necessário usar um procedimento de calibração da arena. Especificamente, foi usado o método de calibração avançada, no qual, usava-as uma imagem digitalizada sobre uma cartolina, com pontos desenhados, com distâncias entre

si conhecidas, de forma tal que o sistema tenha condições de fazer uma representação gráfica homogênea das distâncias em toda a arena.

Os dados foram compilados e analisados. Cada seção de 5 minutos no campo aberto e no labirinto em cruz elevado corresponde a uma trilha (*track*). Os resultados foram exportados na forma de um arquivo "txt" (extensão de arquivo texto) que ao ser aberto na planilha do programa Microsoft Excel® 7.0, continha, nas colunas, as informações relacionadas ao número da trilha, zona, grupo e características de distribuição de cada parâmetro. Antes da análise estatística, a planilha, com esses dados, passou por uma série de etapas de organização e de cálculos de porcentagens de tempo e de número de ocorrências dos parâmetros em cada zona.

4.9. Carcinogênese pulmonar:

Foi utilizado o 4-(MethilNitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK), para indução de carcinogênese pulmonar conforme modelo descrito por HECHT e colaboradores (1989). Aos 45 dias de vida, aplicou-se por via intraperitoneal, uma dose única de 10μmol de NNK diluído em 0,05ml de solução salina (40mg NNK/ml salina). Essa única dose, quando administrada em camundongos da linhagem A/J, mostrou-se capaz de induzir a carcinogênese pulmunar em 100% dos animais injetados (HECHT et al., 1989).

4.10. Eutanásia do animal:

Os animais foram eutanasiados após anestesia profunda com xilazina e quetamina na proporção de 1:1.

4.11. Determinação do hemograma

O hemograma foi constituído pelo eritrograma e pelo leucograma. Os animais foram anestesiados e a coleta de sangue realizada imediatamente após, através de punção cardíaca dos mesmos com auxílio de seringas e agulhas previamente umedecidas em heparina. Em seguida, uma amostra deste sangue foi diluída no Diluidor DA-500 CELM ® para determinação do número de eritrócitos, número de leucócitos, hemoglobina e hematócrito dos animais no Contador de Células CC530 CELM ® de uso veterinário. A determinação do hemograma foi realizada segundo procedimento recomendado por BIRGEL (1982).

4.12. Avaliação imunológica:

A fim de se avaliar as alterações imunológicas dos animais submetidos ou não à separação materna, foi utilizado um citômetro de fluxo para medir a atividade dos macrófagos alveolares e dos neutrófilos sangüíneos.

4.12.1. Obtenção do lavado broncoalveolar (LBA):

O LBA foi obtido conforme descrito por LIGEIRO-OLIVEIRA e colaboradores (2004). Para a lavagem do espaço broncoalveolar, os animais foram eutanasiados conforme descrito no item 4.10; posteriormente, foi feita uma incisão longitudinal na região cérvico-ventral seguida pela canulação da traquéia. Para tanto, foi utilizada uma seringa de 5,0 ml com uma cânula de polietileno acoplada, contendo 1,5 ml de salina tamponada com fosfato (*phosphate-buffered saline*, PBS). A cânula foi inserida na traquéia, sendo feita a lavagem do espaço broncoalveolar. Esta lavagem foi feita em etapas, injetando-se lentamente no espaço alveolar um volume de 1,5 ml de PBS. A seguir, aspirou-se o PBS injetado, acompanhado de delicadas massagens no pulmão. Esse procedimento foi repetido 2 vezes.

4.12.2. Determinação do número de células presentes no LBA:

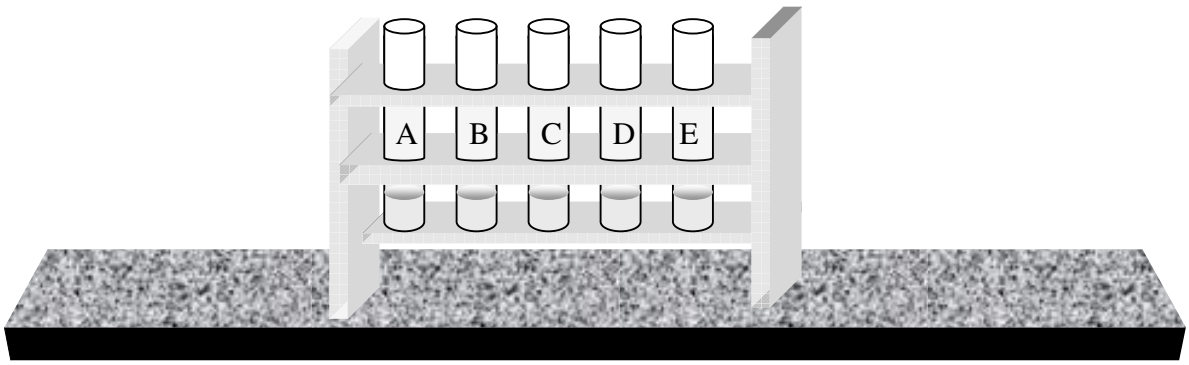
O LBA obtido foi centrifugado por 10 minutos a 1610 g. O sobrenadante foi desprezado e o botão ressuspenso em 1 ml de PBS. Alíquotas da amostra (100 µl) foram colocadas em Citospin®, por 5 minutos.

A contagem total de células presentes no LBA foi feita em câmara de Neubauer. Para tanto, uma alíquota da amostra (10 µl) foi acrescida de 90 µl de Azul de TRIPAN (*Merck*®) a 0,1 %. Os resultados foram expressos em número de células x 10^5/ml.

4.12.3. Avaliação do *burst* oxidativo e da fagocitose de neutrófilos e de macrófagos por citometria de fluxo:

Foi utilizado um método proposto por HASUI e colaboradores (1989) para análise do *burst* oxidativo desencadeado por diferentes estímulos.

Após a eutanásia, o sangue foi coletado. Uma bateria de 5 tubos numerados de “A” até “E”, sendo que cada tubo, de acordo com a sua letra, recebeu uma substância diferente, obedecendo-se sempre a uma mesma ordem (**figura 3)**.



A = Células (Sangue)
B = Células + DCFH
C = Células + SAPI
D = Células + DCFH + SAPI
E = Células + DCFH + PMA

Figura 3 – Representação esquemática de seqüências de reagentes utilizados nas técnicas de burst oxidativo e fagocitose: Tubo A – PBS; Tubo B – DCFH; Tubo C – SAPI; Tubo D – DCFH+SAPI, Tubo E – DCFH+PMA. Adaptado de Costa, 2004

Desta forma, todos os tubos de “A” a “E” receberam alíquotas que correspondem a 2 x 10^5 cel/100µl de sangue. O mesmo procedimento foi realizado na preparação das amostras utilizadas para avaliar os macrófagos alveolares, porém, ao invés de sangue, foi adicionada 100µl de LBA colhidos dos animais (2 x 10^5 cel). Os tubos com as letras “B”, ”D” e ”E” receberam 200µl da solução de 2,7,diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) 3mM

cada. Os tubos de letra “C” e “D” receberam 100µl da solução de *Staphylococcus aureus* marcado com iodeto de propídeo (SAPI) (100ng). O tubo de letra “E” recebeu 100µl de miristato-acetato de forbol (PMA) (100ng).

Como as amostras devem apresentar um volume final de 1100µl, todos os tubos foram completados com PBS 1x. Sendo assim, todos os tubos “A” receberam 1000µl de PBS, os tubos “B” 800µl, os “C”, 900µl e, finalmente, os tubos “D” e “E” receberam 700µl.

Em seguida, os tubos foram incubados em banho-maria sob agitação a 37^{o}C, por 30 minutos. Depois da incubação, foram adicionados 2ml de EDTA 3mM para interromper a reação, sendo os tubos centrifugados posteriormente a 1200rpm, por 10 minutos.

Nos experimentos que utilizaram sangue (para a análise de atividade de neutrófilos), após a centrifugação, desprezou-se o sobrenadante. As células foram ressuspensas por agitação manual, realizando-se a seguir a lise hipotônica das amostras com soluções de NaCl a 0,2% e 1,6%. Primeiramente, foi colocado em cada tubo 2ml de NaCl a 0,2%, durante 20 segundos. Imediatamente após este período, colocaram-se mais 2ml de NaCl a 1,6% para tornar a solução isotônica novamente.

Em seqüência, os tubos foram centrifugados novamente, sendo desprezados os sobrenadantes obtidos. Foi, então, realizada uma nova lise hipotônica (pela segunda vez), seguindo todo o procedimento citado acima. Após a segunda lise, os tubos foram centrifugados pela última vez, sendo os sobrenadantes desprezados. As células resultantes foram ressuspensas em 200µl de PBS gelado.

No experimento que utilizou LBA (para análise da atividade dos macrófagos) desprezou-se o sobrenadante após a centrifugação. As células resultantes foram ressuspensas em 200µl de PBS gelado. Após estes procedimentos, as amostras estavam prontas para serem lidas no citômetro.

Após todo este procedimento, efetuou-se a leitura das amostras no citômetro de fluxo, sendo que o tubo “A” foi utilizado para a calibração do aparelho (fluorescência basal das células), os tubos “C” e “D” foram utilizados para a avaliação da fagocitose, enquanto que o restante dos tubos foram utilizados na avaliação do *burst* oxidativo.

Cada amostra passou pelo citômetro apenas uma vez e, de cada uma, foram adquiridos 10000 eventos (células). Os valores referentes ao *burst* oxidativo das amostras foram avaliados por meio da média geométrica da intensidade de fluorescência emitida pela população de células. Este valor, ou seja, a média geométrica (geo mean) é dada pelo aparelho e foi esta unidade utilizada para se avaliar a intensidade de fluorescência das células.

Com relação à atividade fagocítica, verificou-se a porcentagem de fagocitose, ou seja, o número de macrófagos que fagocitaram o SAPI e, conseqüentemente, fluorescentes, dividido pelo número total destas células, multiplicadas por 100.

Foi avaliada, também, a intensidade de fagocitose (quantidade de bactérias fagocitadas). Os valores da intensidade de fagocitose também foram registrados por meio da média geométrica da intensidade de fluorescência emitida pelas células.

4.12.4. Medida do óxido nítrico (NO) por meio da produção de nitrito (NO_2^-):

A técnica utilizada para medir a produção de NO consiste na determinação indireta do NO, via dosagem de seu metabólito NO_2^-, que é uma molécula estável nas condições em que se realiza os experimentos.

Após o procedimento descrito no item 3.12.1, as células foram centrifugadas e ressuspendidas em 1mL de meio de cultura RPMI 1641, enriquecido com soro fetal bovino estéril. Então, 100 µl desta suspensão foi plaqueada em placa de 96 poços e incubadas por 24 horas a 37^oC com 5% de CO_2. Após a retirada da placa da estufa transferiu-se 50 µl do sobrenadante da células para outra placa. Nesta nova placa, a primeira coluna foi totalmente preenchida com 50 µl de RPMI 1641, de modo a permitir a obtenção de uma curva padrão. Após a transferência do sobrenadante das células, 50 µl do reagente de Griess foi adicionado a todos os poços da nova placa **(figura 4)**.

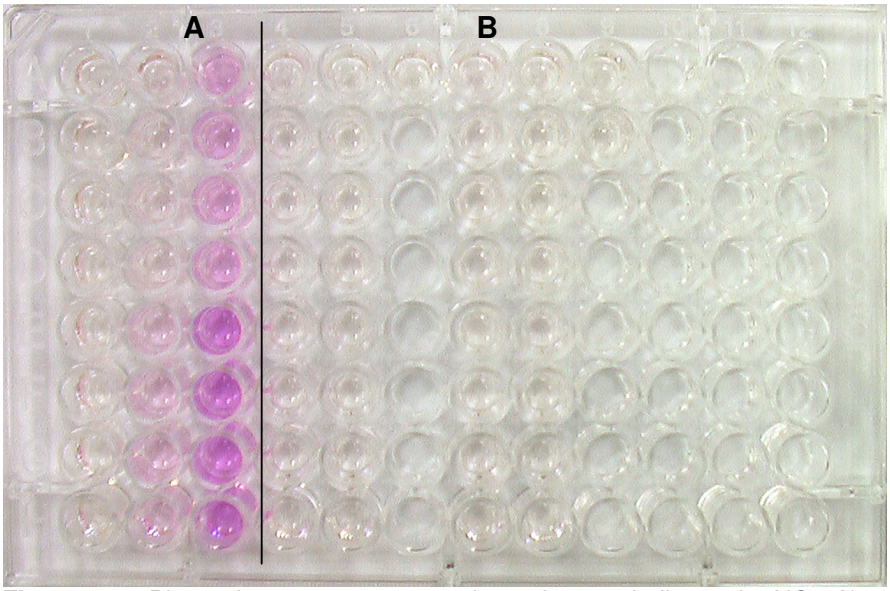


Figura 4 - Placa de 96 poços para determinação indireta de NO. A) Concentrações padrão (5,0, 10,0, 30,0 e 60,0 µmoles/1x10^5 células) e B) amostras.

A produção de NO_2^- foi determinada em um leitor de Elisa no comprimento de onda de 540 nm. Os resultados foram obtidos em densidade óptica (DO), sendo transformados em nmoles de nitrito liberados por $2x10^5$ células do lavado bronco alveolar, mediante equação de regressão linear com base na curva padrão.

4.13. Estresse por imobilização:

O estresse por imobilização foi realizado colocando-se os animais em tubos cilíndricos de plástico, especialmente feitos para essa finalidade. Nestes tubos, os animais ficam impossibilitados de se mover. As extremidades dos cilindros apresentam orifícios para a exteriorização da cauda e do focinho. Os tubos proporcionam ventilação adequada para a respiração dos animais, sem causar dor, desconforto ou superaquecimento **(figura 5)**.

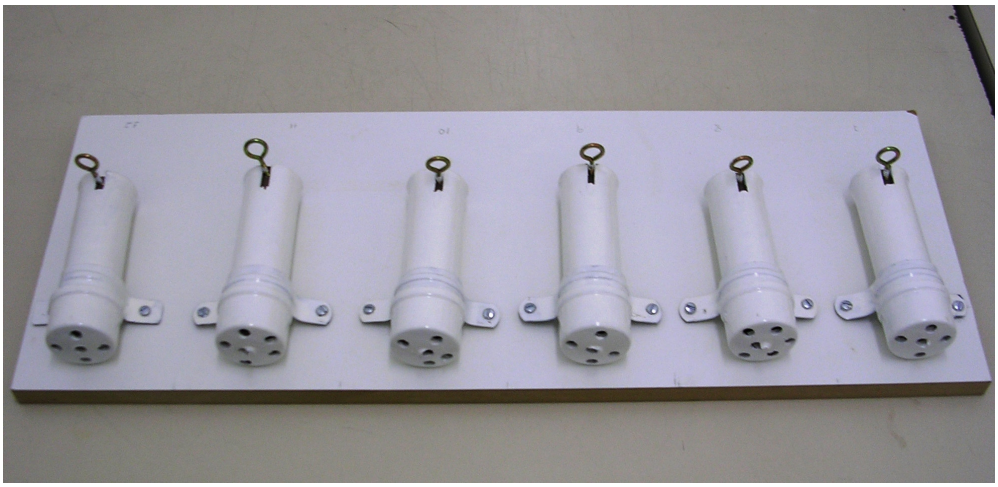


Figura 5 – Aparato para a imobilização dos animais.

Os animais foram mantidos nos tubos por um período de 30 minutos. O tempo e o tipo de estresse ao qual os animais foram submetidos foram embasados em dados da literatura (DONG et al., 2004).

4.14. Avaliação neuroquímica:

4.14.1 Coleta e processamento dos tecidos para dosagem neuroquímica:

Os animais foram eutanasiados após insensibilização com anestesia profunda, como descrito no item 3.10. Posteriormente, os cérebros foram retirados sendo lavados com solução salina gelada (4^{o}C). Imediatamente após a remoção, cada cérebro foi dissecado sobre placa de petri rodeado por pedras de gelo seco, formando-se assim, um micro-ambiente frio. O córtex frontal, hipotálamo e estriado foram retirados, pesados e congelados a –80^{o}C num tempo máximo de 3 minutos, onde permaneceram por no máximo 2 meses.

No momento da leitura, os tecidos cerebrais foram, então, homogeneizados por sonicação (caneta sonicadora), durante 2 a 3 minutos sobre uma cuba de gelo seco, com solução de ácido perclórico 0,1 M contendo 0,02% de $Na_2S_2O_5$, EDTA dissódico e uma concentração conhecida de DHBA, utilizado como padrão interno para as dosagens de monoaminas. O DHBA (3,4 diidroxibenzilamina) foi escolhido como padrão interno por ter as mesmas características físico-químicas que as monoaminas dosadas.

4.14.2. Dosagens neuroquímicas:

As dosagens neuroquímicas foram realizadas a partir de método previamente descrito (FELICIO et al., 1996). A técnica utilizada foi a de cromatografia em fase reversa com pareamento iônico. Esta técnica fundamenta-se na cromatografia de partição ou absorção. Foram dosados: noradrenalina, dopamina e serotonina e seus respectivos metabólitos.

As substâncias foram reconhecidas através do tempo de retenção na coluna cromatográfica, comparando-as com os padrões. O limite de detecção foi de 0,02 ng para noradrenalina, dopamina e serotonina e seus respectivos metabólitos. O tempo total de passagem de cada amostra foi de 20 min.

4.15. Dosagem de corticosterona sérica:

4.15.1. Coleta de sangue para obtenção do soro para dosagem de corticosterona:

A pós a anestesia, a coleta de sangue foi realizada através da veia hepática, sendo que o sangue foi acondicionado em tubos do tipo *eppendorfs* de polietileno. Esse sangue permaneceu à temperatura ambiente até a retração do coágulo sendo, então, centrifugado para obtenção do soro o qual foi armazenado em *freezer*, a –20^{o}C, até o momento da dosagem hormonal.

4.15.2. Dosagem de corticosterona:

As dosagens foram realizadas através de *kits* comerciais Coat-a Count/ (DPC®) que quantifica a corticosterona através de um método de

radioimunoensaio em fase sólida, como descrito em MASSOCO e PALERMO-NETO (2003).

No momento da dosagem, as amostras previamente identificadas foram retiradas do *freezer* e mantidas à temperatura ambiente (22 $\pm$ 2^{o}C) para o descongelamento.

Para a obtenção de uma curva padrão, foram utilizados calibradores-padrões (50 µl – em duplicata) com concentrações previamente conhecidas de corticosterona: 0 – 20 – 50 – 100 – 200 – 500 – 1000 – 2000 ng/mL.

Na técnica de radioimunoensaio, há competição da corticosterona do camundongo marcada com [I^{125}] (iodo radioativo) e do hormônio contido na amostra (soro) pelos sítios de anticorpos fixados à parede do tubo de ensaio ("fase sólida"). Foi pipetado dentro de cada tubo de ensaio um volume de 50 µl de cada amostra de soro dos animais. Após a adição de 1 mL da corticosterona marcada com [I^{125}] estes tubos foram incubados à temperatura ambiente durante 2 horas para atingirem um equilíbrio. A seguir, o conteúdo dos tubos foi desprezado para a leitura da radioatividade remanescente desta reação, a qual foi feita no Contador Automático de Radiação Gama (Packard®). Os resultados finais das contagens por minuto (cpm) foram expressos em ng/ml. Foram coletados dados de validação metodológica.

4.16. Exame dos pulmões:

Os pulmões foram examinados macroscopicamente e os nódulos contados na superfície pulmonar de cada animal. Posteriormente, realizou-se instilação intratraqueal com metacarn (60% de metanol, 30% de clorofórmio e 10% de ácido acético glacial) para a conservação do órgão (TILLMANN et

al., 1999). Para a análise histopatológica, todos os cinco lobos foram amostrados de maneira representativa, sendo seccionados longitudinalmente em criostato e, posteriormente, corados com H & E. Cortes histológicos de 3-4 µm de espessura foram, então, examinados em microscópio de luz. A classificação e o diagnóstico do tumor seguiu a nomenclatura proposta pela WHO/IARC (TURUSOV e MOHR, 1994).

4.17. Análise Estatística

Os resultados foram analisados primeiramente pelo teste de Bartlet, utilizado para avaliar a homogeneidade das variâncias, que determinou o uso subseqüente de análises paramétricas. Os dados foram, então, avaliados através do teste "t" de Student e análise de variância de duas vias seguida do teste de múltiplas comparações Student-Newman-Keuls, onde foram consideradas significantes as análises que apresentaram nível de significância $p<0,05$.

Todas as análises estatísticas foram feitas com o auxílio dos programas estatísticos denominados GRAPHPAD INSTAT em sua versão 3.01 e SIGMASTAT em sua versão 3.0.

5. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS

5.1. EXPERIMENTO 1 – Efeitos da separação materna sobre os parâmetros reprodutivos.

Foram utilizadas 86 ninhadas de camundongos A/J e 10 ninhadas de camundongos C57BL/6 que passaram, ou não, pela separação materna, como descrito no item 4.6. As proles obtidas, foram divididas em 2 grupos, como descrito no item 4.7: separação materna e controle, como descrito no item 4.7 e tiveram seus parâmetros reprodutivos avaliados conforme descritos no item 4.5.

RESULTADOS

A **tabela 1** mostra os dados dos parâmetros reprodutivos avaliados nas ninhadas dos camundongos A/J. A análise estatística mostrou que as ninhadas correspondentes ao grupo separação materna apresentaram um maior número de filhotes por ninhada ($p<0,05$).

Tabela 1 – Parâmetros reprodutivos das ninhadas de camundongos A/J. Os dados representam a média ± desvio padrão.

Parâmetros[a]	Controle	Separação materna
Número de filhotes	6,28 ± 1,91	7,31 ± 1,70*
Número de filhotes mortos[b]	1,00 ± 2,36	1,12 ± 1,29
Machos	2,73 ± 1,68	3,17 ± 1,36
Fêmeas	2,55 ± 1,57	3,07 ± 1,02

[a]Número de filhotes por ninhada; [b]Número de filhotes morto do nascimento até o desmame

* $p<0,05$ em relação ao grupo controle, teste "t" de Student

A **tabela 2** mostra os dados dos parâmetros reprodutivos avaliados nas ninhadas dos camundongos C57BL/6. A análise estatística mostrou que as ninhadas correspondentes ao grupo separação materna apresentaram um menor número de filhotes fêmeas por ninhada ($p<0,001$).

Tabela 2 – Parâmetros reprodutivos das ninhadas de camundongos C57BL/6. Os dados representam a média ± desvio padrão.

Parâmetros[a]	Controle	Separação materna
Número de filhotes	6,60 + 0,55	4,80 + 1,64
Número de filhotes mortos[b]	0,00 + 0,00	1,60 + 1,34
Machos	1,00 + 1,00	1,00 + 0,71
Fêmeas	5,60 + 1,34	2,20 + 1,48**

[a]Número de filhotes por ninhada; [b]Número de filhotes morto do nascimento até o desmame

** $p<0,001$ em relação ao grupo controle, teste "t" de Student

5.2. EXPERIMENTO 2 – Efeitos da separação materna sobre o comportamento avaliado no campo aberto e no labirinto em cruz elevado, de camundongos da linhagem A/J avaliados aos 45 dias de vida.

Foram utilizados 20 camundongos da linhagem A/J que passaram, ou não, pela separação materna, como descrito no item 4.6. As proles obtidas, foram divididos em 2 grupos: separação materna e controle, como descrito no item 4.7. Aos 45 dias de vida realizaram-se testes comportamentais no campo aberto e no labirinto em cruz elevado, conforme descrito no item 4.8.

RESULTADOS

A **tabela 3** mostra dados de comportamento obtidos no campo aberto, de camundongos que passaram, ou não, pela separação materna; as avaliações foram realizadas no PND 45.

A análise estatística desses dados mostrou que não houve diferença significante entre os grupos controle e separação materna ($p < 0,05$) como avaliado através dos seguintes parâmetros: tempo e locomoção, nas diferentes zonas, locomoção total na arena, tempo em movimento na arena, velocidade média, tempo de *freezing*, freqüência e tempo de levantar e freqüência e tempo de *grooming.*

Tabela 3 - Comportamento, no campo aberto, de camundongos que passaram, ou não, pela separação materna e que foram observados aos 45 dias de vida. Os dados representam a média ± desvio padrão.

Parâmetros[A]	Controle	S. Materna
TRC	12,00 ± 11,6	14,07 ± 14,16
TRP	288,00 ± 11,59	285,92 ± 14,16
LRC	102,08 ± 23,37	100,59 ± 63,49
LRP	894,07 ± 85,26	903,76 ± 118,31
LTA	920,16 ± 34,53	979,57 ± 150,70
TMA	26,78 ± 10,71	27,16 ± 13,36
VMA	3,11 ± 0,82	3,29 ± 0,70
TF	261,15 ± 28,62	262,37 ± 16,82
FL	3,50 ± 2,41	3,90 ± 2,60
TL	4,11 ± 3,98	4,78 ± 3,46
FG	2,7 ± 1,49	2,10 ± 1,20
TG	10,67 ± 9,05	12,19 ± 8,81

[A] TRC=Tempo na região central, TRP=Tempo na região periférica, LRC=Locomoção na região central, LRP=Locomoção na região periférica, LTA=Locomoção total na arena, TMA=Tempo em movimento na arena, VMA=Velocidade média na arena, TF=Tempo em *freezing*, FL=Freqüência de levantar, TL=Tempo de levantar, FG=Freqüência de *grooming*, TG=Tempo de *grooming*

A **tabela 4** mostra e as **figuras 6**, **7** e **8** ilustram os efeitos comportamentais, no labirinto em cruz elevado, de camundongos que passaram, ou não, pela separação materna, medidos aos 45 dias de vida.

A análise estatística demonstra que houve diferença significante entre os dados comportamentais obtidos dos grupos controle e separação materna ($p < 0,05$), para os seguintes parâmetros: diminuição da locomoção total na arena, diminuição na velocidade média e aumento na freqüência de *risk assesment*. Já os parâmetros como tempo em movimento na arena, tempo de *freezing*, freqüência e tempo de levantar e freqüência e tempo de

grooming não apresentaram diferença significante, analisados pelo teste "t" de Student.

Parâmetros como a porcentagem de tempo nos braços abertos e fechados, porcentagem de entradas nos braços abertos e fechados não puderam ser analisados através do testes estatísticos por apresentarem desvio-padrão igual a zero.

Tabela 4 - Comportamento, no labirinto em cruz elevado, de camundongos A/J que passaram, ou não, pela separação materna, e que foram observados aos 45 dias de vida. Os dados representam a média ± desvio padrão

Parâmetros[A]	Controle	S. Materna
%TBA	0,00 ± 0,00	1,00 ± 2,40
%TBF	100,00 ± 0,00	99,00 ± 2,40
%EBA	0,00 ± 0,00	6,30 ± 9,10
%EBF	100,00 ± 0,00	93,7 ± 9,10
LTA	1215,00 ± 136,11	1087,50 ± 115,30*
TMA	30,27 ± 9,00	33,61 ± 10,30
VMA	3,98 ± 0,52	3,44 ± 0,52*
TF	196,44 ± 39,75	185,97 ± 24,78
FL	6,70 ± 1,49	7,50 ± 2,55
TL	10,56 ± 4,05	9,98 ± 4,41
FG	7,80 ± 3,33	6,50 ± 2,12
TG	42,71 ± 16,11	44,95 ± 19,75
FRA	13,2 ± 7,12	22,70 ± 9,38*

[A] %TBA= Porcentagem de tempo nos braços abertos, %TBF= Porcentagem de tempo nos braços abertos, %EBA= Porcentagem de entradas nos braços abertos, %EBF= Porcentagem de entradas nos braços fechados, LTA=Locomoção total na arena, TMA=Tempo em movimento na arena, VMA=Velocidade média na arena, TF=Tempo em *freezing*, FL=Freqüência de levantar, TL=Tempo de levantar, FG=Freqüência de *grooming*, TG= Tempo de *grooming*, FRA=Freqüência de *risk assesment*

* $p<0,05$ em relação ao grupo controle, teste "t" de Student

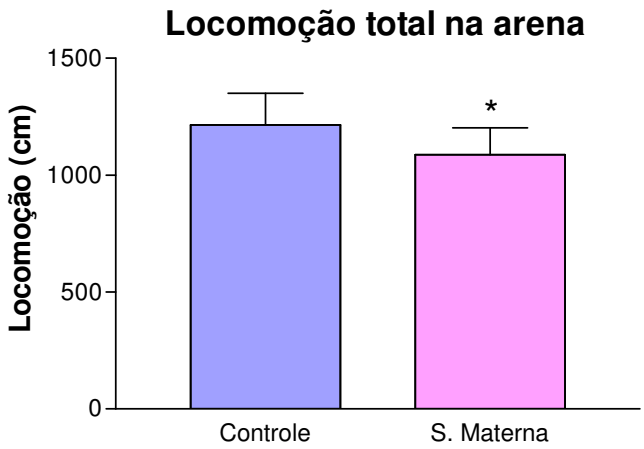


Figura 6 – Efeitos da separação materna sobre a locomoção total de camundongos A/J no labirinto em cruz elevado. * p<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=10 animais/grupo

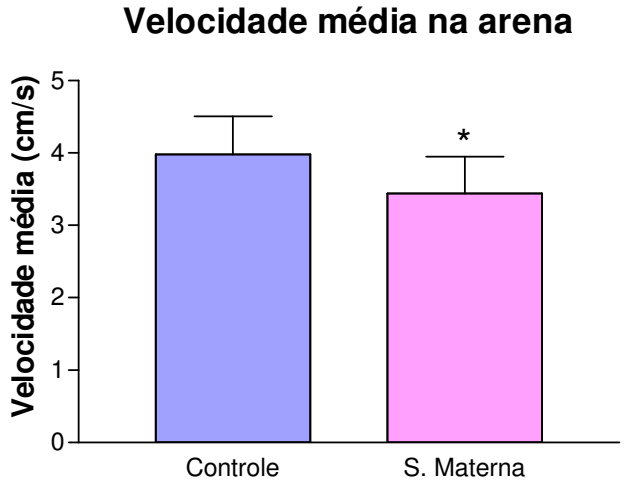


Figura 7 – Efeitos da separação materna sobre velocidade média de camundongos A/J na arena do labirinto em cruz elevado. * p<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=10 animais/grupo

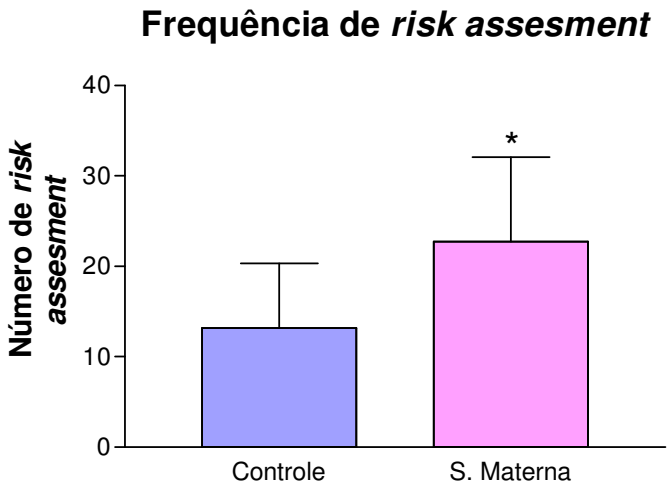


Figura 8 – Efeitos da separação materna sobre o tempo gasto por camundongos A/J em comportamento de *risk assesment* no labirinto em cruz elevado. *<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=10 animais/grupo

5.3. EXPERIMENTO 3 – Efeitos da separação materna sobre o comportamento avaliado no campo aberto e no labirinto em cruz elevado, de camundongos da linhagem A/J observados aos 45 dias de vida e que foram submetidos a um estresse por contenção.

Foram utilizados 20 camundongos que passaram, ou não, pela separação materna, como descrito no item 4.6. Estes animais foram divididos em 2 grupos, como descrito no item 4.7: separação materna e controle. Aos 45 dias de vida os animais de ambos os grupos foram submetidos a um desafio estressor por imobilização, como descrito no item 4.13. Logo após o desafio, realizaram-se testes comportamentais no campo aberto e no labirinto em cruz elevado, conforme descrito no item 4.8.

RESULTADOS

A **tabela 5** mostra e as **figuras 9** a **13** ilustram os efeitos comportamentais, avaliados no campo aberto, de camundongos que passaram, ou não, pela separação materna; os dados foram obtidos aos 45 dias de vida e após um desafio por imobilização.

A análise estatística mostrou existência de diferenças significantes entre os dados comportamentais obtidos no grupo controle e no grupo separação materna ($p < 0,05$) para os seguintes parâmetros: aumento de locomoção na região periférica, aumento do tempo de permanência na região central, aumento locomoção total na arena e diminuição da freqüência e tempo de *grooming*. Já os dados relativos a parâmetros como locomoção na região central, tempo na região periférica, tempo em movimento na arena, velocidade na arena, tempo em *freezing* e freqüência e tempo de levantar não foram diferentes entre os 2 grupos (teste “t” de Student).

Tabela 5 - Comportamento, de camundongos que passaram, ou não, pela separação materna observados no campo aberto aos 45 dias de vida após terem sido submetidos a um estresse por imobilização. Os dados representam a média ± desvio padrão.

Parâmetros[A]	Controle	S. Materna
TRC	4,10 ± 4,37	12,34 ± 7,87*
TRP	294,06 ± 7,10	288,07 ± 12,16
LRC	50,80 ± 15,48	39,89 ± 15,26
LRP	899,98 ± 180,83	1104,90 ± 176,39*
LTA	923,66 ± 172,59	1265,10 ± 207,24#
TMA	34,78 ± 13,34	46,88 ± 15,62
VMA	3,35 ± 0,88	3,65 ± 0,83
TF	248,20 ± 32,10	248,23 ± 32,29
FL	2,83 ± 1,61	3,02 ± 1,23
TL	2,10 ± 1,56	2,18 ± 1,26
FG	4,76 ± 2,18	3,03 ± 0,82*
TG	24,99 ± 17,89	9,81 ± 6,48*

[A] TRC=Tempo na região central, TRP=Tempo na região periférica, LRC=Locomoção na região central, LRP=Locomoção na região periférica, LTA=Locomoção total na arena, TMA=Tempo em movimento na arena, VMA=Velocidade média na arena, TF=Tempo em *freezing*, FL=Freqüência de levantar, TL=Tempo de levantar, FG=Freqüência de *grooming*, TG= Tempo de *grooming*

* $p<0,05$ e # $p<0,0001$ em relação ao grupo controle, teste "t" de Student

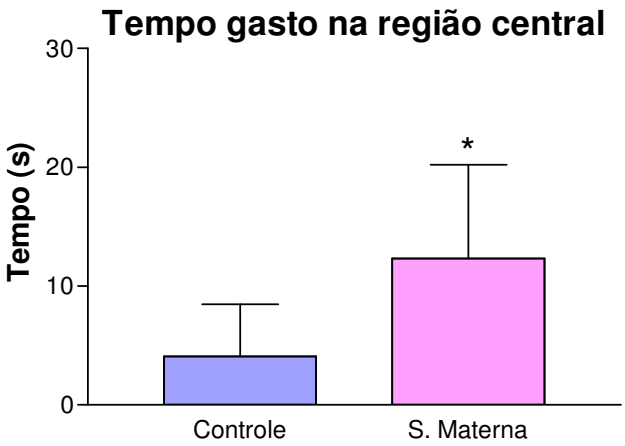


Figura 9 – Efeitos da separação materna sobre o tempo gasto na região central do campo aberto por camundongos A/J que foram submetidos a um desafio por imobilização. * p<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=10 animais/grupo

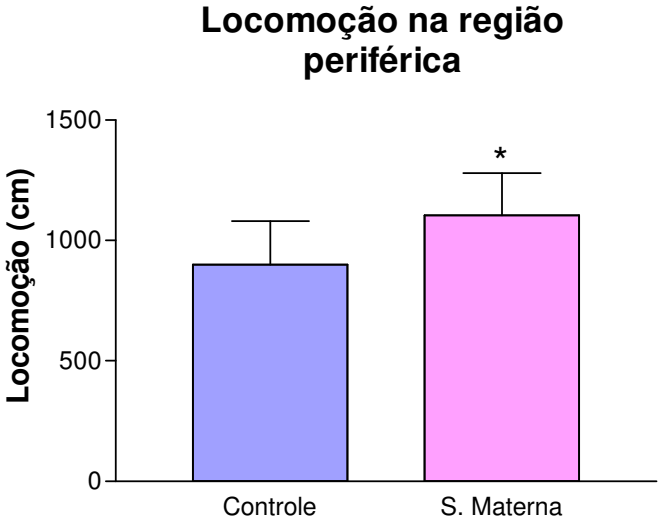


Figura 10 – Efeitos da separação materna sobre a locomoção na região periférica do campo aberto de camundongos A/J que foram submetidos a um desafio por imobilização. * p<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=10 animais/grupo

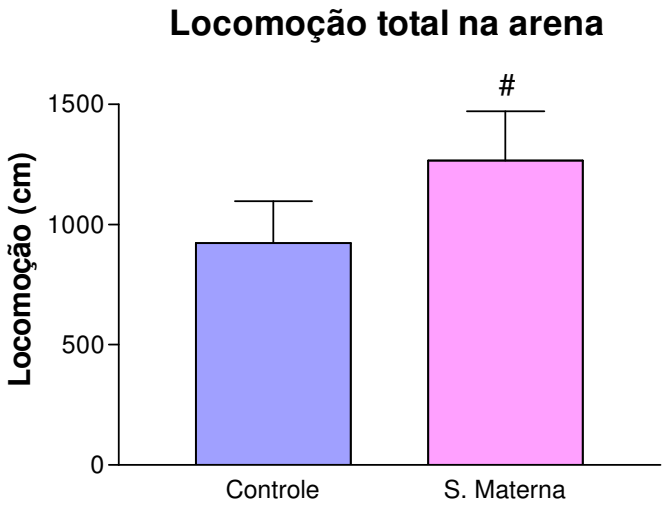


Figura 11 – Efeitos da separação materna sobre a locomoção total na arena do campo aberto de camundongos A/J que foram submetidos a um desafio por imobilização. # p<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=10 animais/grupo

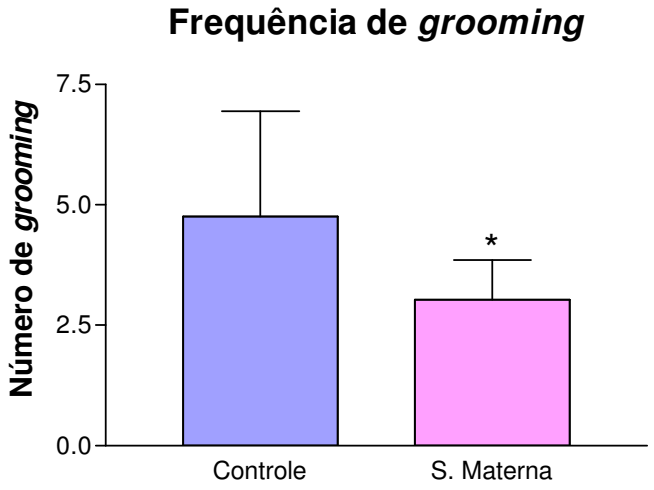


Figura 12 – Efeitos da separação materna sobre a freqüência do comportamento de *grooming* no campo aberto de camundongos A/J que foram submetidos a um desafio por imobilização. * p<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=10 animais/grupo

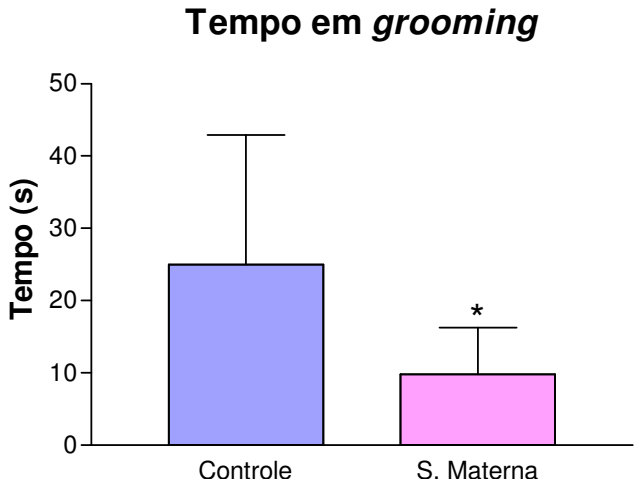


Figura 13 – Efeitos da separação materna sobre o tempo em comportamento de *grooming* no campo aberto de camundongos A/J que foram submetidos a um desafio por imobilização. * p<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=10 animais/grupo

A **tabela 6** mostra e as **figuras 14** a **18** ilustram os efeitos comportamentais, avaliados no labirinto em cruz elevado, de camundongos que passaram, ou não, pela separação materna, e que aos 45 dias de vida foram submetidos a um novo desafio estressor por imobilização.

A análise estatística mostrou existência de diferenças significantes entre os dados comportamentais obtidos nos grupos controle e separação materna ($p < 0,05$) para os seguintes parâmetros: aumento da porcentagem de entradas nos braços abertos, diminuição da locomoção total na arena, diminuição da freqüência e tempo de *grooming* e aumento do tempo em *freezing*. Já parâmetros como: porcentagem de entradas nos braços fechados, porcentagem de tempo nos braços abertos e fechados, tempo em movimento na arena, velocidade média na arena, freqüência e tempo de levantar e freqüência de *risk assesment* não foram diferentes entre os grupos (teste "t" de Student).

Tabela 6 - Comportamento, de camundongos que passaram, ou não, pela separação materna e que aos 45 dias de vida foram submetidos a um estresse por imobilização e avaliados no labirinto em cruz elevado. Os dados representam a média ± desvio padrão.

Parâmetros[A]	Controle	S. Materna
%TBA	0,02 ± 0,05	0,21 ± 0,31
%TBF	99,98 ± 0,05	98,71 ± 2,55
%EBA	0,05 ± 0,15	2,15 ± 2,90*
%EBF	99,52 ± 1,51	96,81 ± 4,66
LTA	1256,20 ± 188,74	1009,40 ± 152,30**
TMA	32,59 ± 13,98	32,93 ± 12,58
VMA	3,91 ± 0,94	3,32 ± 1,10
TF	170,06 ± 17,87	204,15 ± 45,16*
FL	5,50 ± 2,27	5,98 ± 2,82
TL	4,82 ± 2,75	6,73 ± 3,77
FG	11,80 ± 2,78	6,30 ± 3,80**
TG	72,33 ± 27,95	37,65 ± 19,72**
FRA	10,92 ± 4,48	11,99 ± 4,37

[A] %TBA= Porcentagem de tempo nos braços abertos, %TBF= Porcentagem de tempo nos braços abertos, %EBA= Porcentagem de entradas nos braços abertos, %EBF= Porcentagem de entradas nos braços fechados, LTA=Locomoção total na arena, TMA=Tempo em movimento na arena, VMA=Velocidade média na arena, TF=Tempo em *freezing*, FL=Freqüência de levantar, TL=Tempo de levantar, FG=Freqüência de *grooming*, TG= Tempo de *grooming*, FRA=Freqüência de *risk assesment*

* $p<0,05$ e ** $p<0,001$ em relação ao grupo controle, teste "t" de Student

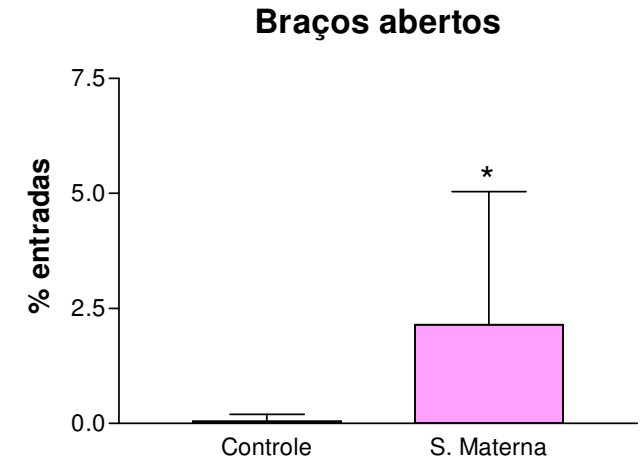


Figura 14 – Efeitos da separação materna sobre a porcentagem de entradas nos braços abertos do labirinto em cruz elevado em camundongos A/J submetidos a um estresse por imobilização. * p<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=10 animais/grupo

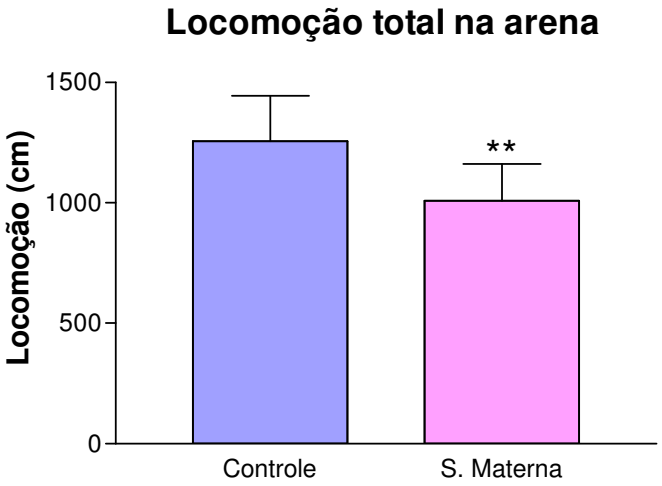


Figura 15 – Efeitos da separação materna sobre a locomoção total na arena do labirinto em cruz elevado em camundongos A/J submetidos a um estresse por imobilização. ** p<0,001 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=10 animais/grupo

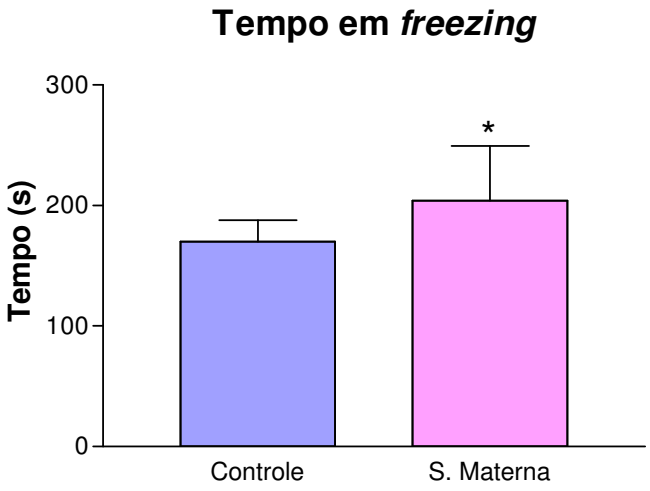


Figura 16 – Efeitos da separação materna sobre o tempo em comportamento de *freezing* no labirinto em cruz elevado em camundongos A/J submetidos a um estresse por imobilização. * p<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=10 animais/grupo

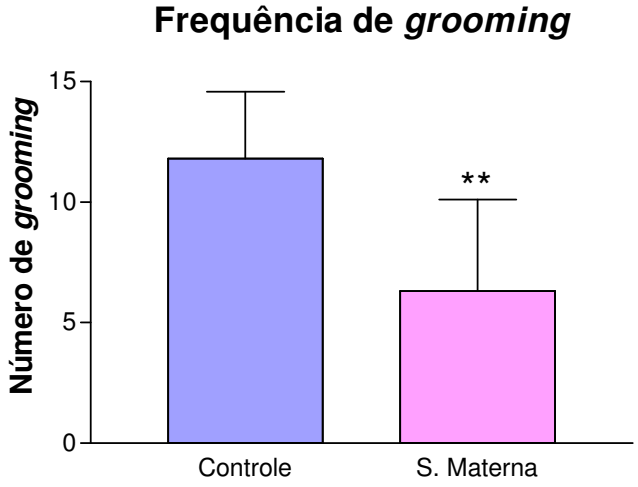


Figura 17 – Efeitos da separação materna sobre a freqüência do comportamento de *grooming* no labirinto em cruz elevado em camundongos A/J submetidos a um estresse por imobilização. ** p<0,001 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=10 animais/grupo

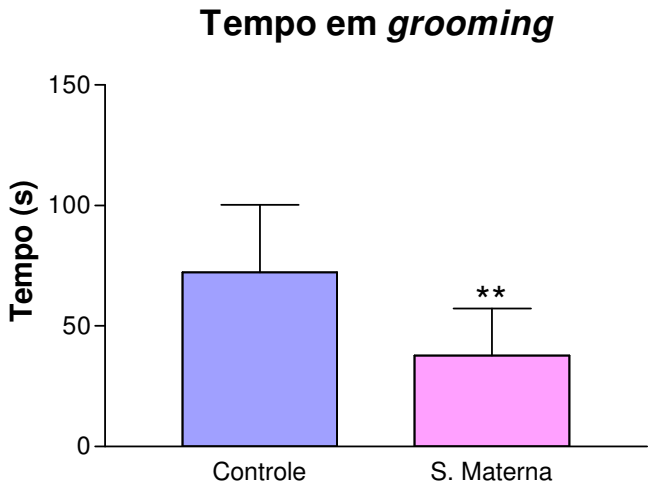


Figura 18 – Efeitos da separação materna sobre o tempo em comportamento de *grooming* no labirinto em cruz elevado em camundongos A/J submetidos a um estresse por imobilização. ** p<0,001 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=10 animais/grupo

5.4. EXPERIMENTO 4 – Efeitos da separação materna sobre atividade de neutrófilos sangüíneos, avaliada por citometria de fluxo, em camundongos da linhagem A/J avaliados para esse parâmetro aos 45 dias de vida.

Foram utilizados 20 camundongos que passaram, ou não, pela separação materna, como descrito no item 4.6. Os animais foram divididos em 2 grupos, como descrito no item 4.7: separação materna e controle. Aos 45 dias de vida avaliou-se a atividade de neutrófilos sangüíneos, colhidos desses animais, por citometria de fluxo, conforme descrito no item 4.12.3.

RESULTADOS

A **tabela 7** mostra os dados referentes à atividade de neutrófilos sangüíneos, avaliada por citometria de fluxo, em camundongos que passaram, ou não, pela separação materna e observados aos 45 dias de vida.

A análise estatística mostra que houve diferença significante entre os dados dos grupos controle e separação materna ($p < 0,05$) para os seguintes parâmetros: diminuição do *burst* basal, aumento do *burst* induzido pela fagocitose e diminuição do *burst* induzido por PMA, analisados pelo teste "t" de Student. Já os dados relacionados à porcentagem e intensidade de fagocitose não apresentaram diferenças significantes. As **figuras 19** e **20** ilustram esses resultados.

Tabela 7 - Atividade de neutrófilos sangüíneos de camundongos A/J que passaram ou não, pela separação materna e observados para esse parâmetro aos 45 dias de vida. Os dados representam a média ± desvio padrão.

Parâmetros[A]	Controle	S. Materna
***Burst* Basal**	18,29 ± 4,84	13,61 ± 3,64*
***Burst* SAPI**	21,90 ± 4,70	31,10 ± 5,14**
***Burst* PMA**	19,58 ± 2,64	16,81 ± 2,74*
% fagocitose	43,04 ± 15,75	51,13 ± 15,50
Int. fagocitose	3,83 ± 2,42	3,24 ± 2,11

Os dados representam a intensidade média de fluorescência (media±desvio padrão), correspondente ao *gate* da população de neutrófilos sangüíneos. *p<0,05 e ** p<0,001 em relação ao grupo controle, dentro do mesmo parâmetro, teste "t"de Stundent. n=10 animais/grupo

[A] Porcentagem de Fagocitose: quantos neutrófilos fagocitaram partículas de SAPI. Intensidade de Fagocitose: quantas bactérias foram ingeridas pela população de neutrófilos. Expresso pela intensidade de fluorescência da população de neutrófilos

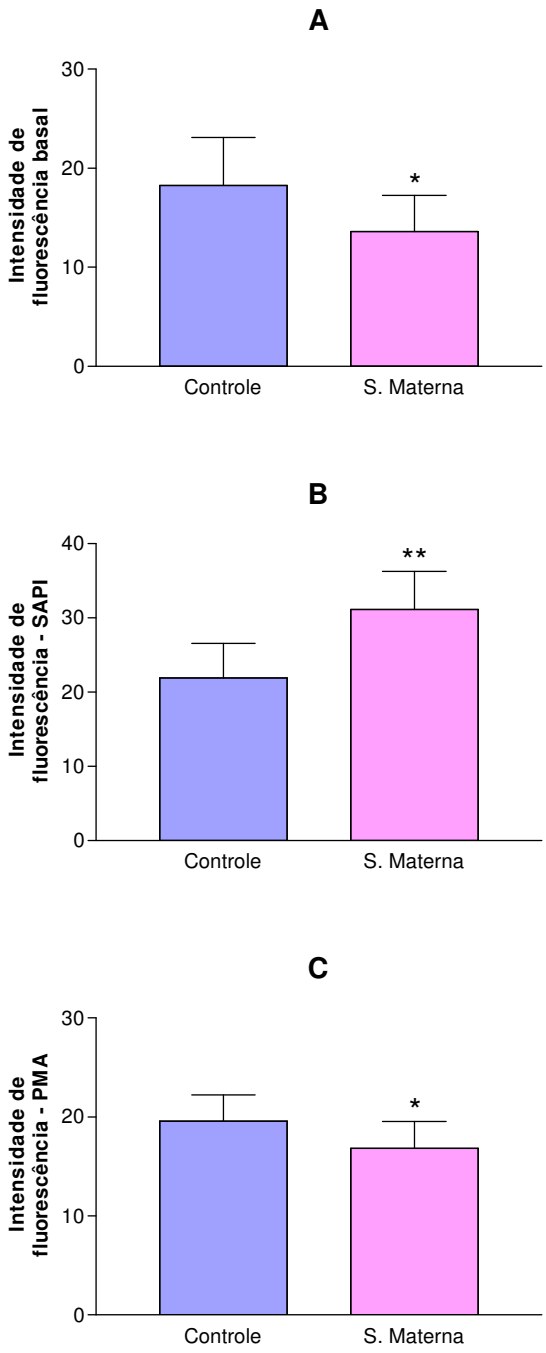


Figura 19 - Efeitos da separação materna sobre a atividade de neutrófilos sangüíneos de camundongos A/J. A – *burst* oxidativo basal, B – *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com SAPI, C – *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com PMA. * $p<0,05$ e **$p<0,001$ em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=10 animais/grupo

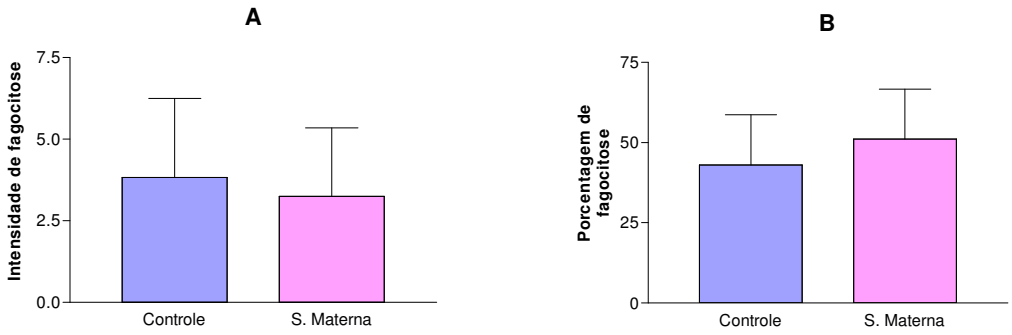


Figura 20 - Efeitos da separação materna sobre a atividade de neutrófilos sangüíneos de camundongos A/J. A – intensidade de fagocitose, B – porcentagem de fagocitose. $p<0,05$ em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=10 animais/grupo

5.5. EXPERIMENTO 5 – Efeitos da separação materna sobre a atividade de neutrófilos sangüíneos de camundongos da linhagem A/J com 45 dias de vida e que foram submetidos a um estresse adicional por imobilização.

Foram utilizados 20 camundongos que passaram, ou não, pela separação materna, como descrito no item 3.6. Os animais foram divididos em 2 grupos, como descrito no item 4.7: separação materna e controle. Aos 45 dias de vida os camundongos de ambos os grupos foram submetidos a um novo desafio estressor por imobilização como descrito no item 4.13. Logo após, foi avaliada a atividade de neutrófilos sangüíneos por citometria de fluxo, conforme descrito no item 4.12.3.

RESULTADOS

A **tabela 8** mostra os dados referentes a atividade de neutrófilos sangüíneos, avaliada por citometria de fluxo, em camundongos que passaram, ou não, pela separação materna; os dados foram avaliados aos 45 dias de vida e após um novo desafio estressor por imobilização.

A análise estatística mostrou que há diferença significante entre os grupos controle e separação materna ($p < 0,05$) para os seguintes parâmetros: aumento do *burst* basal, aumento do *burst* induzido por PMA, analisados pelo teste "t" de Student. Já os dados relacionados ao *burst* induzido pela fagocitose e porcentagem e intensidade de fagocitose não apresentaram diferenças significantes entre si. As **figuras 21** e **22** ilustram esses resultados.

Tabela 8 - Atividade de neutrófilos sangüíneos de camundongos A/J que passaram ou não, pela separação materna e que aos 45 dias de vida foram submetidos a um novo desafio estressor por imobilização. Os dados representam a média ± desvio padrão.

Parâmetros[A]	Controle	S. Materna
Burst Basal	31,90 ± 6,48	40,35 ± 6,92*
Burst SAPI	33,79 ± 6,23	34,81 ± 4,04
Burst PMA	27,62 ± 7,19	40,03 ± 14,18*
% fagocitose	63,04 ± 8,85	67,37 ± 5,59
Int. fagocitose	14,43 ± 3,66	16,24 ± 4,88

Os dados representam a intensidade média de fluorescência (media±desvio padrão), correspondente ao *gate* da população de neutrófilos sangüíneos. *p<0,05 em relação ao grupo controle, dentro do mesmo parâmetro, teste "t"de Stundent. n=10 animais/grupo

[A] Porcentagem de Fagocitose: quantos neutrófilos fagocitaram partículas de SAPI. Intensidade de Fagocitose: quantas bactérias foram ingeridas pela população de neutrófilos. Expresso pela intensidade de fluorescência da população de neutrófilos

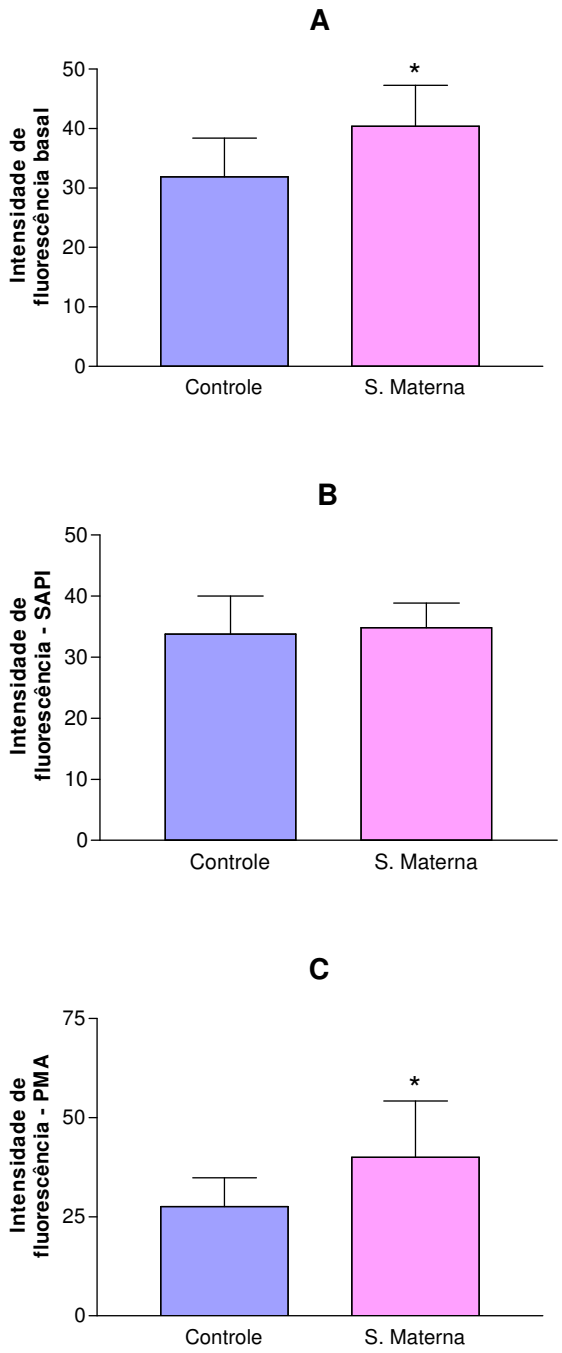


Figura 21 - Efeitos da separação materna e um novo desafio estressor, sobre a atividade de neutrófilos sangüíneos de camundongos A/J. A – *burst* oxidativo basal, B – *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com SAPI, C – *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com PMA. * $p<0,05$ em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=10 animais/grupo

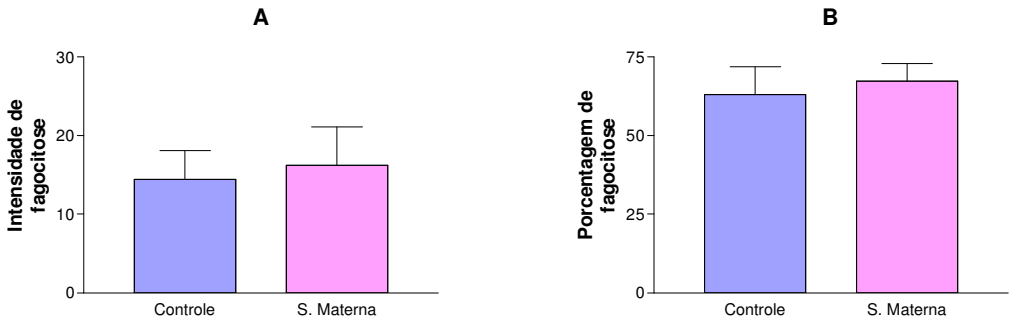


Figura 22 - Efeitos da separação materna e um novo desafio estressor, sobre a atividade de neutrófilos sangüíneos de camundongos A/J. A – intensidade de fagocitose, B – porcentagem de fagocitose. p<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=10 animais/grupo

5.6. EXPERIMENTO 6 – Efeitos da separação materna sobre a atividade de macrófagos alveolares, avaliada por citometria de fluxo, em camundongos da linhagem A/J avaliados aos 45 dias de vida.

Foram utilizados 20 camundongos que passaram, ou não, pela separação materna, como descrito no item 4.6. Os animais foram divididos em 2 grupos, como descrito no item 4.7: separação materna e controle. Aos 45 dias de vida a atividade de macrófagos alveolares foi avaliada por citometria de fluxo, conforme descrito no item 4.12.3.

RESULTADOS

A **tabela 9** mostra e as **figuras 23** e **24** ilustram a atividade de macrófagos alveolares, avaliada por citometria de fluxo, em camundongos que passaram, ou não, pela separação materna; as medidas foram feitas aos 45 dias de vida.

A análise estatística mostrou que há diferenças significantes entre os grupo controle e separação materna ($p < 0,05$) para os seguintes

parâmetros: aumento do *burst* basal e aumento do *burst* induzido pela fagocitose, analisados pelo teste "t" de Student. Já os dados relacionados ao *burst* induzido por PMA e porcentagem e intensidade de fagocitose dos 2 grupos não apresentaram diferenças significantes entre si.

Tabela 9 - Atividade de macrófagos alveolares de camundongos A/J que passaram ou não, pela separação materna e avaliados aos 45 dias de vida. Os dados representam a média ± desvio padrão.

Parâmetros[A]	Controle	S. Materna
Burst Basal	118,10 ± 36,44	184,13 ± 48,34**
Burst SAPI	117,78 ± 18,19	149,15 ± 20,71*
Burst PMA	141,63 ± 28,93	198,22 ± 59,45
% fagocitose	24,56 ± 5,31	24,99 ± 9,09
Int. fagocitose	3,55 ± 1,91	3,15 ± 1,14

Os dados representam a intensidade média de fluorescência (media±desvio padrão), correspondente ao *gate* da população de macrófagos alveolares. *p<0,05 e ** p<0,001 em relação ao grupo controle, dentro do mesmo parâmetro, teste "t"de Stundent. n=10 animais/grupo

[A] Porcentagem de Fagocitose: quantos macrófagos fagocitaram partículas de SAPI. Intensidade de Fagocitose: quantas bactérias foram ingeridas pela população de macrófagos. Expresso pela intensidade de fluorescência da população de macrófagos

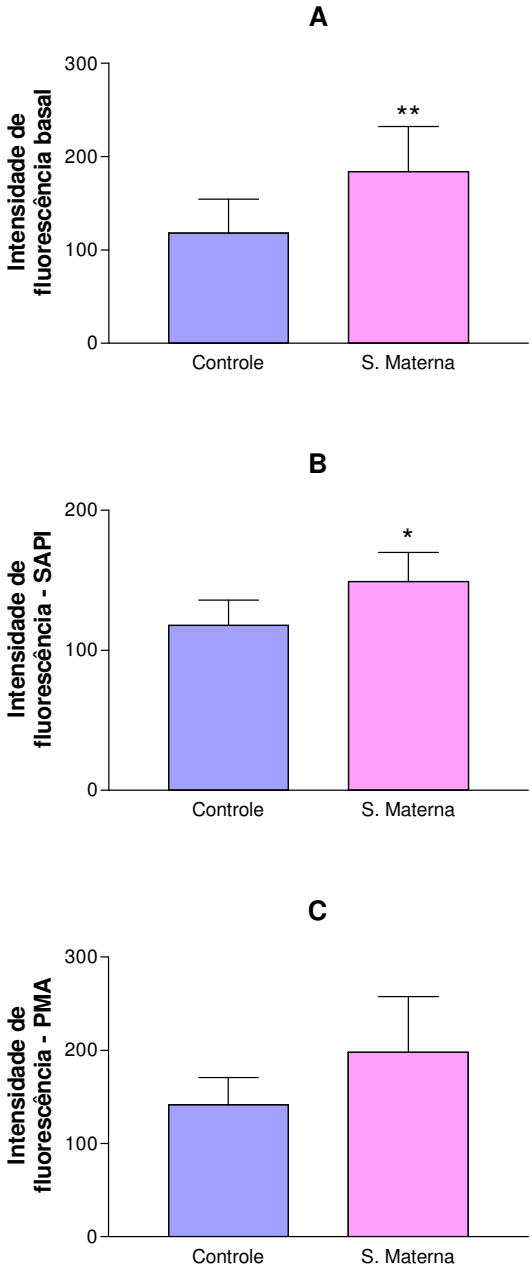


Figura 23 - Efeitos da separação materna sobre a atividade de macrófagos alveolares de camundongos A/J. A – *burst* oxidativo basal, B – *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com SAPI, C – *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com PMA. * $p<0,05$ em relação ao grupo controle, teste "t" de Stundent. n=10 animais/grupo

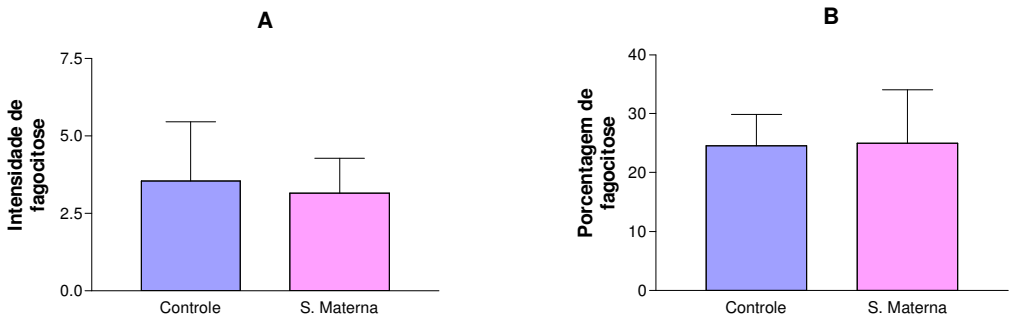


Figura 24 - Efeitos da separação materna sobre a atividade macrófagos alveolares de camundongos A/J. A – intensidade de fagocitose, B – porcentagem de fagocitose. p<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=10 animais/grupo

5.7. EXPERIMENTO 7 – Efeitos da separação materna sobre parâmetros hematológicos, de camundongos da linhagem A/J avaliados aos 45 dias de vida.

Foram utilizados 20 camundongos que passaram, ou não, pela separação materna, como descrito no item 4.6. Os animais foram divididos em 2 grupos, como descrito no item 4.7: separação materna e controle. Aos 45 dias de vida foi realizado o hemograma, conforme descrito no item 4.11.

RESULTADOS

A **tabela 10** mostra os parâmetros hematológicos de camundongos que passaram, ou não, pela separação materna; as avaliações foram feitas aos 45 dias de vida.

A análise estatística desses dados mostrou que não houve diferença significante entre os grupos controle e separação materna ($p < 0,05$) para os seguintes parametros hematológicos: número de leucócitos, número de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito.

Tabela 10 – Efeitos da separação materna em camundongos A/J, sobre parâmetros hematológicos avaliados aos 45 dias de vida. Os dados representam a média ± desvio padrão.

Parâmetros	Controle	S. Materna
Leucócitos ($x10^6/mm^3$)	2,98 ± 1,03	2,68 ± 0,59
Eritrócitos ($x10^6/mm^3$)	7,92 ± 0,56	8,62 ± 1,60
Hemoglobina (g/dL)	11,41 ± 0,66	11,96 ± 0,81
Hematócrito (%)	44,30 ± 2,31	44,40 ± 2,84

Teste "t" de Student. n=10 animais/grupo

5.8. EXPERIMENTO 8 – Efeitos da separação materna sobre parâmetros neuroquímicos de camundongos A/J aos 45 dias de vida.

Foram utilizados 20 camundongos que passaram, ou não, pela separação materna, como descrito no item 4.6. Os animais foram divididos em 2 grupos, como descrito no item 4.7: separação materna e controle. Aos 45 dias de vida realizou-se coleta e análise, conforme descrito nos itens 4.14.1 e 4.14.2, respectivamente.

RESULTADOS

A **tabela 11** mostra o efeito da separação materna sobre sobre os níveis e *turnover* hipotalâmicos de noradrenaliana, dopamina e serotonina.

A análise estatística mostrou que não houve diferença significativa nos níveis e *turnover* hipotalâmicos de noradrenaliana, dopamina e serotonina entre os animais controle e os animais que passaram pela separação materna ($p<0,05$).

Tabela 11 – Efeitos da separação materna sobre os níveis e *turnover* hipotalâmicos de noradrenaliana, dopamina e serotonina. Os dados representam a média ± desvio padrão.

	Hipotálamo	
Parâmetros	Controle	Separação Materna
NOR	1254,67 ± 223,83	1360,14 ± 285,27
VMA	801,24 ± 145,28	823,27 ± 119,58
VMA/NOR	0,64 ± 0,05	0,62 ± 0,09
DA	317,33 ± 123,86	268,71 ± 55,44
DOPAC	233,06 ± 137,15	176,77 ± 30,30
HVA	289,45 ± 105,66	277,82 ± 61,72
DOPAC/DA	0,74 ± 0,23	0,69 ± 0,19
HVA/DA	0,98 ± 0,29	1,06 ± 0,29
DOPAC+HVA/DA	1,72 ± 0,49	1,75 ± 0,44
5-HT	778,31 ± 210,72	816,52 ± 98,88
5-HIAA	2360,43 ± 1146,41	2145,06 ± 475,76
5-HIAA/5-HT	3,16 ± 1,54	2,52 ± 0,75

Teste "t" de Student. n=10 animais/grupo

A **tabela 12** mostra o efeito da separação materna sobre os níveis e *turnover* estriatais de noradrenaliana, dopamina e serotonina. As **figuras 25** e **26** ilustram esses resultados.

A análise estatística mostrou que a separação materna aumentou o *turnover* de dopamina e os níveis de serotonina e seu metabólito, 5-HIAA, no estriado ($p<0,05$) Já os demais parâmetros não se apresentaram alterados.

Tabela 12 – Efeitos da separação materna sobre os níveis e o *turnover* estriatal de noradrenaliana, dopamina e serotonina. Os dados representam a média ± desvio padrão.

	Estriado	
Parâmetros	Controle	Separação Materna
NOR	240,59 ± 157,06	312,46 ± 146,97
VMA	1101,01 ± 149, 35	1245,48 ± 308,97
VMA/NOR	6,58 ± 3,89	4,76 ± 2,10
DA	2283,81 ± 1433,71	1705,38 ± 1507,64
DOPAC	641,39 ± 152,30	579,72 ± 428,68
HVA	606,19 ± 371,38	661,01 ± 440,13
DOPAC/DA	0,32 ± 0,09	0,43 ± 0,20
HVA/DA	0,28 ± 0,14	0,61 ± 0,52*
DOPAC+HVA/DA	0,61 ± 0,20	1,04 ± 0,70*
5-HT	362,21 ± 106,02	571,52 ± 261,36*
5-HIAA	857,45 ± 307,46	1261,42 ± 405,91*
5-HIAA/5-HT	2,44 ± 0,86	2,41 ± 0,82

Teste “t” de Student. n=10 animais/grupo

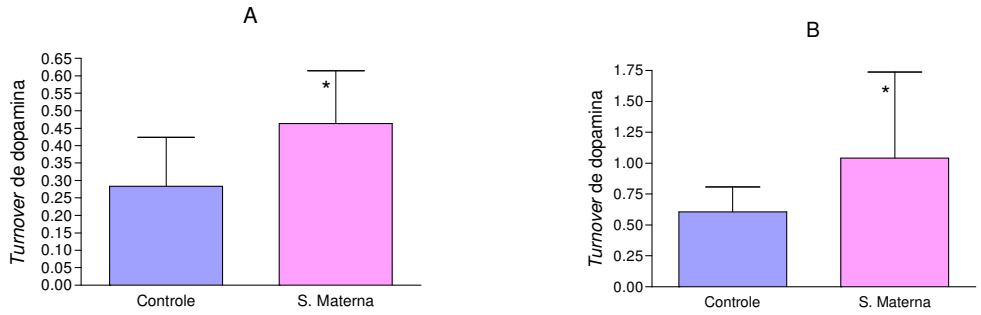


Figura 25 **-** Efeitos da separação materna em camundongos A/J sobre *turnover* estriatal de dopamina **(A)**; HVA/dopamina e **(B)** DOPAC+HVA/dopamina. *p<0,05 em relação ao grupo controle; teste "t" de Student.n=10 animais/grupo.

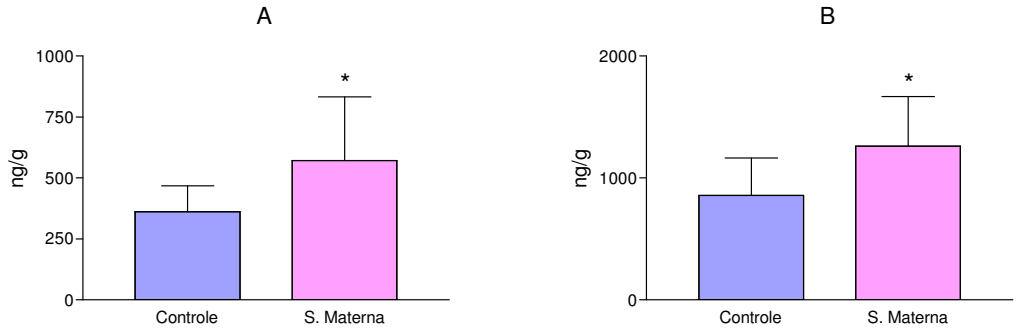


Figura 26 **-** Efeitos da separação materna em camundongos A/J sobre os níveis estriatas de serotonina e seu metabólito 5-HIAA. **(A)** serotonina e **(B)** 5-HIAA. *p<0,05 em relação ao grupo controle; teste "t" de Student.n=10 animais/grupo.

A **tabela 13** mostra o efeito da separação materna sobre os níveis e *turnover* de noradrenaliana, dopamina e serotonina no córtex pré-frontal. A **figura 27** ilustra esse resultado.

A análise estatística mostrou que a separação materna diminuiu o nível do metabólico dopaminérgico, DOPAC, no córtex pré-frontal (p<0,05). Os demais parâmetros não foram alterados.

Tabela 13 – Efeitos da separação materna sobre os níveis e o *turnover* no córtex pré-frontal de noradrenaliana, dopamina e serotonina. Os dados representam a média ± desvio padrão.

	Córtex pré-frontal	
Parâmetros	Controle	Separação Materna
NOR	267,93 ± 87,81	317,82 ± 99,97
VMA	1138,20 ± 90,92	1123,19 ± 86,39
VMA/NOR	4,66 ± 1,53	3,93 ± 1,52
DA	1685,52 ± 865,70	1484,85 ± 881,31
DOPAC	580,19 ± 173,67	422,62 ± 133,83*
HVA	565,09 ± 278,18	474,57 ± 248,16
DOPAC/DA	0,42 ± 0,25	0,39 ± 0,28
HVA/DA	0,49 ± 0,40	0,40 ± 0,24
DOPAC+HVA/DA	0,81 ± 0,46	0,79 ± 0,44
5-HT	534,31 ± 172,08	625,06 ± 173,71
5-HIAA	768,21 ± 138,12	838,43 ± 100,11
5-HIAA/5-HT	1,65 ± 0,85	1,45 ± 0,51

Teste "t" de Student. n=10 animais/grupo

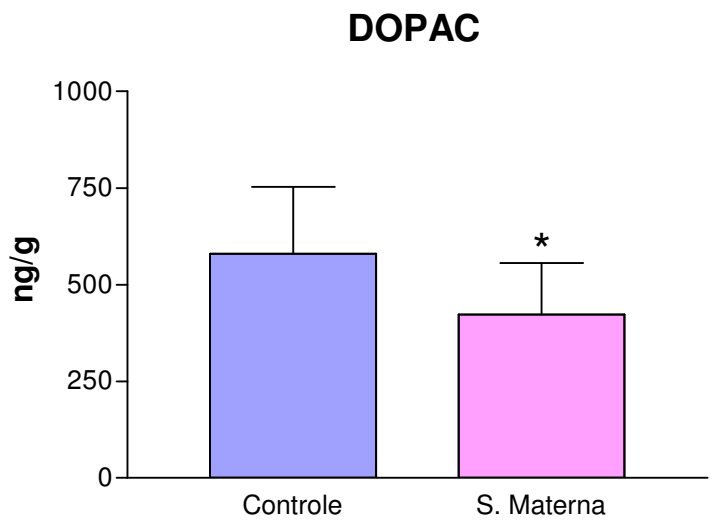


Figura 27 **-** Efeitos da separação materna em camundongos A/J sobre os níveis do metabólito doparminégico DOPAC no córtex pré-frontal. *p<0,05 em relação ao grupo controle; teste "t" de Student.n=10 animais/grupo.

5.9. EXPERIMENTO 9 – Efeitos da separação materna sobre os níveis séricos de corticosterona de camundongos A/J aos 45 dias de vida.

Foram utilizados 20 camundongos que passaram, ou não, pela separação materna, como descrito no item 4.6. Os animais foram divididos em 2 grupos, como descrito no item 4.7: separação materna e controle. Aos 45 dias de vida realizou-se a coleta e análise, conforme descrito nos itens 4.15.1 e 4.15.2, respectivamente.

RESULTADOS

A **tabela 14** mostra e a **figura 28** ilustra o efeito da separação materna sobre os níveis séricos de corticosterona. A análise estatística mostra que houve redução dos níveis séricos de corticosterona ($p<0,001$).

Tabela 14 - Efeitos da separação materna sobre os níveis séricos de corticosterona de camundongos A/J aos 45 dias de vida. Os dados representam a média ± desvio padrão.

Parâmetro	Controle	S. Materna
Corticosterona	229,35 ± 102,64	203,16 ± 86,02**

**p<0,001 teste "t" de Student. n=10 animais/grupo

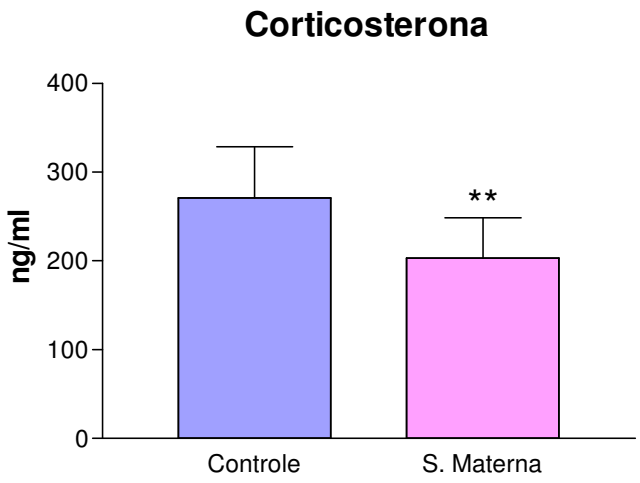


Figura 28 – Efeitos da separação materna sobre os níveis plasmáticos de corticosterona de camundongos A/J. ** p<0,001 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=10 animais/grupo

5.10. EXPERIMENTO 10 – Efeitos da separação materna sobre o comportamento avaliado no campo aberto e no labirinto em cruz elevado, de camundongos da linhagem A/J avaliados após o desenvolvimento tumoral.

Foram utilizados 20 camundongos que passaram, ou não, pela separação materna, como descrito no item 4.6. Estes, foram divididos em 4 grupos, conforme descritos no item 4.7. Aos 45 dias de vida realizou-se a indução da carcinogênese pulmonar conforme descrito no item 4.9. Após 5 meses foram realizados testes comportamentais no campo aberto e no labirinto em cruz elevado, conforme descrito no item 4.8.

RESULTADOS

A **tabela 15** mostra e as **figuras 29 a 34** ilustram os dados de comportamento, no campo aberto, de camundongos que passaram, ou não,

pela separação materna e que receberam ou não o carcinógeno pulmonar; as avaliações foram realizadas após 5 meses da indução da carcinogênese.

Para este experimento realizou-se análise de variância de duas vias onde se considerou: o efeito do fator tumor, o efeito do fator separação materna e o efeito da interação tumor X separação materna. A análise estatística desses dados mostrou que houve diferença significante, entre os grupos e que estas, eram dependentes da presença de tumor ($p < 0,05$). Os parâmetros que apresentaram diferenças entre os grupos que receberam o carcinógeno e que receberam somente salina foram: maior locomoção nas regiões periférica e central, maior locomoção total na arena, maior tempo nas zonas tigmotaxica, externa e média. Em relação ao tempo na zona externa, o fator separação materna também influenciou, aumentando o tempo de permanência ($p<0,05$).

Tabela 15 - Comportamento, no campo aberto, de camundongos que passaram, ou não, pela separação materna e observados 5 meses após a indução da carcinogênese pulmonar. Os dados representam a média ± desvio padrão.

Parâmetros[A]	Cont.+salina	Cont.+NNK	S.M.+salina	S.M.+NNK
TRC	25,81 ± 18,21	40,75 ± 26,80	20,81 ± 18,47	29,98 ± 16,49
TRP	276,53 ± 19,97	267,91 ± 21,46	279,19 ± 18,47	270,56 ± 15,83
LRC	72,41 ± 58,77*[a]	179,53 ± 125,30	79,27 ± 84,18*	154,17 ± 115,58
LRP	579,46 ± 174,37*[a]	782,39 ± 115,19[b]	629,38 ± 113,47*	699,54 ± 116,81
LTA	648,18 ± 196,06*[a]	906,26 ± 201,67	762,09 ± 278,10*	813,11 ± 152,85
FL	6,00 ± 2,31	12,00 ± 4,57	8,14 ± 4,60	9,22 ± 5,09
TZT	182,20 ± 49,19*	115,05 ± 66,53	141,28 ± 54,77*	89,45 ± 61,47
TZE	94,33 ± 41,38*[ac]	152,86 ± 52,67[c]	137,90 ± 46,47*	181,11 ± 49,65
TZM	8,72 ± 9,82*	23,09 ± 20,54	10,48 ± 10,80*	15,00 ± 12,78
TZI	14,75 ± 15,44	13,62 ± 14,17	10,33 ± 11,67	14,98 ± 8,78

[A] TRC=Tempo na região central, TRP=Tempo na região periférica, LRC=Locomoção na região central, LRP=Locomoção na região periférica, LTA=Locomoção total na arena, FL=Freqüência de levantar, TZT=Tempo na zona tigmotaxica, TZE= Tempo na zona externa, TZM= Tempo na zona média e TZT=Tempo na zona interna. Análise de variância de duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações Student-Newman-Keuls.

* em relação aos grupos Cont.+NNK e S.M.+NNK ($p<0,05$)

[a] em relação ao grupo Cont.+NNK ($p<0,05$)

[b] em relação ao grupo S.M.+NNK ($p<0,05$)

[c] em relação aos grupos S.M.+NNK e S.M.+NaCl ($p<0,05$)

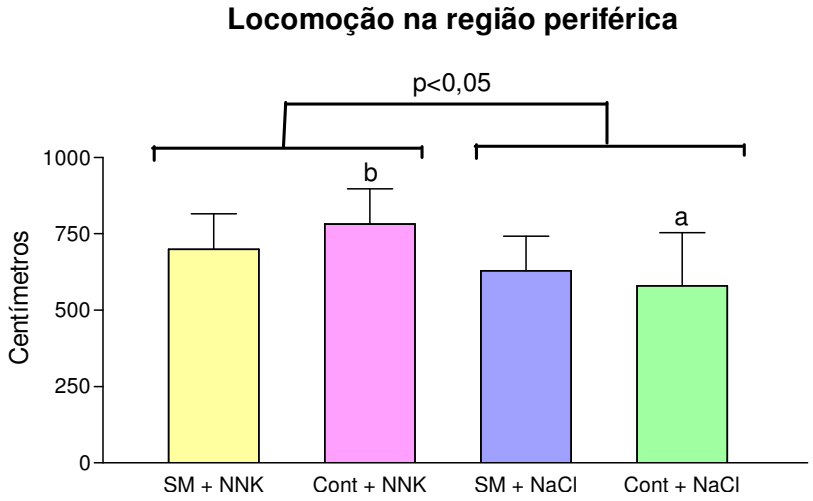


Figura 29 – Efeitos da separação materna sobre locomoção na região periférica do campo aberto por camundongos A/J que foram submetidos a carcinogênese pulmonar. [a] p<0,05 em relação ao grupo Cont.+NNK e [b] p<0,05 em relação ao grupo S.M.+NNK, análise de variância de duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações Student-Newman-Keuls, n=10 animais/grupo

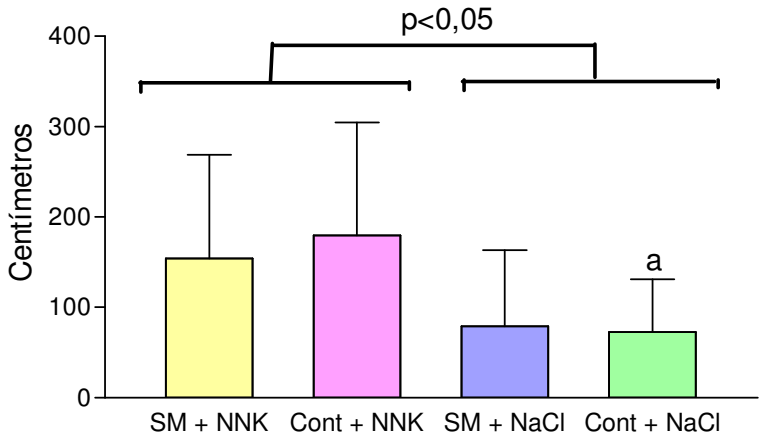


Figura 30 – Efeitos da separação materna sobre locomoção na região central do campo aberto por camundongos A/J que foram submetidos a carcinogênese pulmonar. [a] p<0,05 em relação ao grupo Cont.+NNK, análise de variância de duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações Student-Newman-Keuls, n=10 animais/grupo

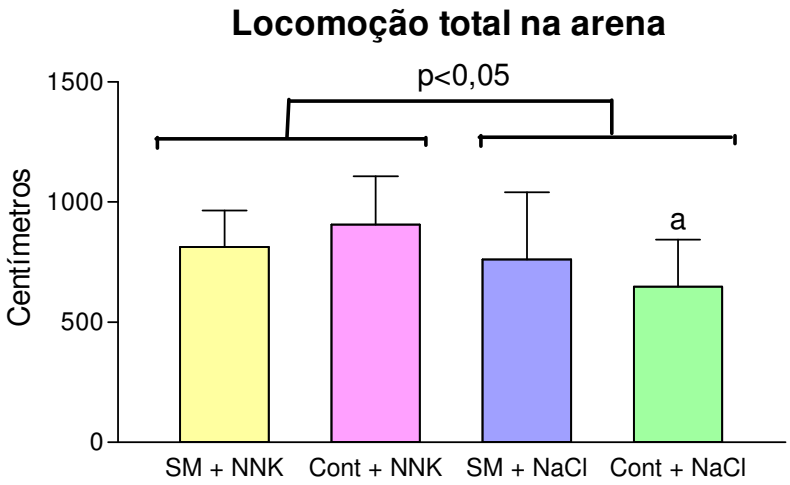


Figura 31 – Efeitos da separação materna sobre locomoção total na arena do campo aberto por camundongos A/J submetidos a carcinogênese pulmonar. [a] p<0,05 em relação ao grupo Cont.+NNK, análise de variância de duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações Student-Newman-Keuls, n=10 animais/grupo

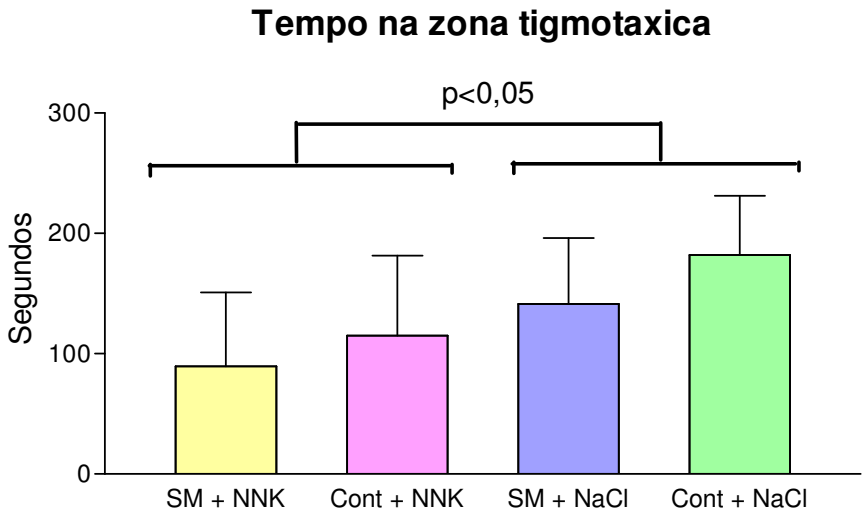


Figura 32 – Efeitos da separação materna sobre o tempo na zona tigmotaxica do campo aberto por camundongos A/J submetidos a carcinogênese pulmonar. análise de variância de duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações Student-Newman-Keuls, n=10 animais/grupo

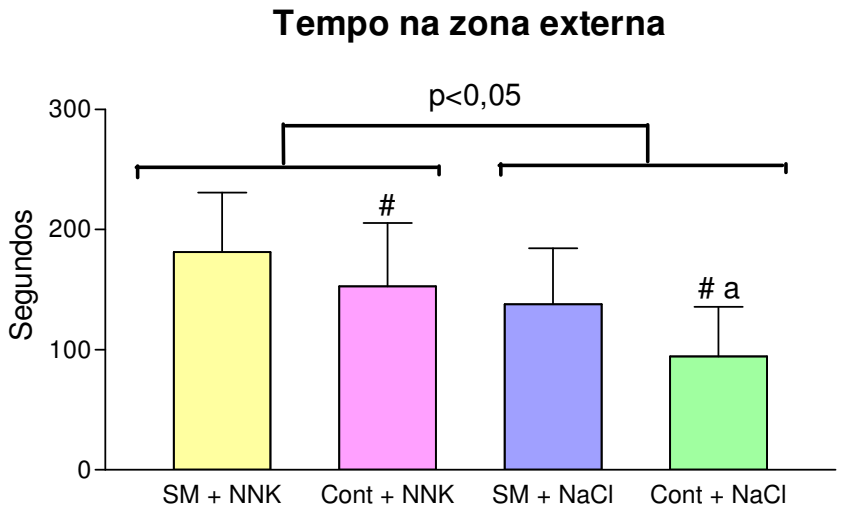


Figura 33 – Efeitos da separação materna sobre o tempo na zona externa do campo aberto por camundongos A/J submetidos a carcinogênese pulmonar. [a] p<0,05 em relação ao grupo Cont.+NNK, [#] p<0,05 em relação aos grupos S.M.+NNK e S.M.+NaCl, análise de variância de duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações Student-Newman-Keuls, n=10 animais/grupo

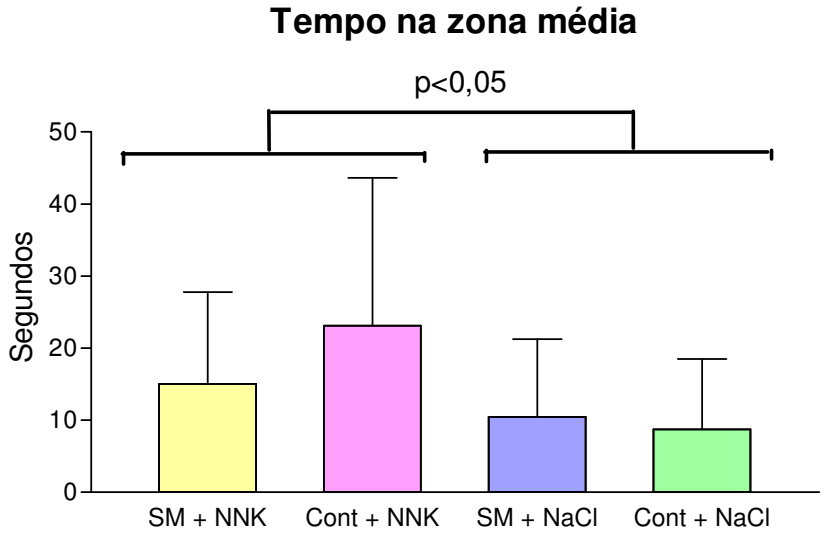


Figura 34 – Efeitos da separação materna sobre o tempo na zona tigmotaxica do campo aberto por camundongos A/J submetidos a carcinogênese pulmonar, análise de variância de duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações Student-Newman-Keuls, n=10 animais/grupo

A **tabela 16** mostra e as **figuras 35 e 36** ilustram os efeitos comportamentais, no labirinto em cruz elevado, de camundongos que passaram, ou não, pela separação materna e que foram observados 5 meses após a indução da carcinogênese pulmonar.

A análise estatística demonstra que houve diferença significante entre os dados comportamentais obtidos dos animais que passaram pela separação materna e os que não passarm ($p < 0,05$), para os seguintes parâmetros: aumento da locomoção total na arena e aumento do tempo em movimento na arena.

Tabela 16 - Comportamento, no labirinto em cruz elevado, de camundongos A/J que passaram, ou não, pela separação materna e observados 5 meses após a indução da carcinogênese pulmonar. Os dados representam a média ± desvio padrão.

Parâmetros[A]	Cont.+salina	Cont.+NNK	S.M.+salina	S.M.+NNK
%TBA	0,52 ± 1,53	1,89 ± 5,57	0,79 ± 1,55	2,33 ± 4,40
%TBF	99,48 ± 1,53	98,11 ± 5,57	99,21 ± 1,55	97,67 ± 4,40
%EBA	3,76 ± 9,47	5,25 ± 12,91	4,80 ± 7,48	9,75 ± 10,59
%EBF	96,24 ± 9,47	94,75 ± 12,91	95,20 ± 7,48	90,25 ± 10,59
LTA	798,41 ± 258,77	966,93 ± 211,37	1158,91 ± 222,96*[a]	1073,37 ± 363,51*
TMA	11,19 ± 9,78	14,50 ± 12,22	28,46 ± 17,48*[a]	26,52 ± 17,64*

[A] %TBA= Porcentagem de tempo nos braços abertos, %TBF= Porcentagem de tempo nos braços abertos, %EBA= Porcentagem de entradas nos braços abertos, %EBF= Porcentagem de entradas nos braços fechados, LTA=Locomoção total na arena e TMA=Tempo em movimento na arena.

* $p<0,05$ em relação aos grupos Cont.+salina e Cont.+NNK; [a] $p<0,05$ em relação ao grupo Cont.+salina. Análise de variância de duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações Student-Newman-Keuls.

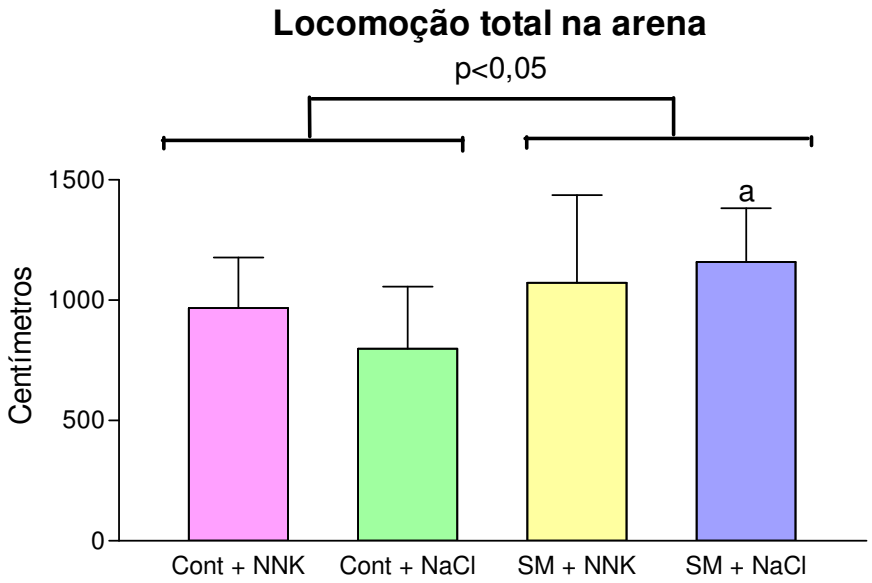


Figura 35 – Efeitos da separação materna sobre a locomoção total na arena do labirinto em cruz elevado por camundongos A/J submetidos a carcinogênese pulmonar. [a] p<0,05 em relação ao grupo Cont.+NaCl, análise de variância de duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações Student-Newman-Keuls, n=10 animais/grupo

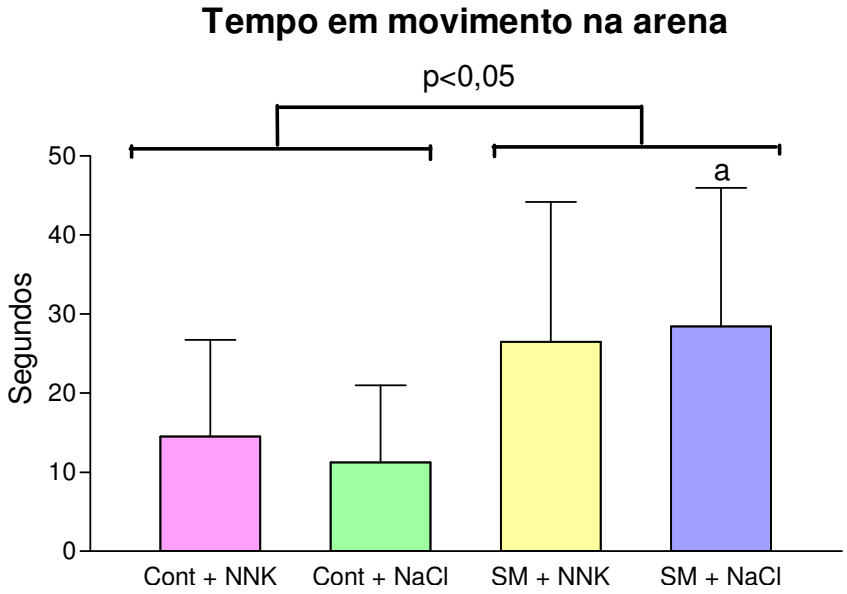


Figura 36 – Efeitos da separação materna sobre o tempo em movimento na arena do labirinto em cruz elevado por camundongos A/J submetidos a carcinogênese pulmonar. [a] p<0,05 em relação ao grupo Cont.+NaCl, análise de variância de duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações Student-Newman-Keuls, n=10 animais/grupo

5.11. EXPERIMENTO 11 – Efeitos da separação materna sobre a atividade de neutrófilos sanguíneos, de camundongos da linhagem A/J avaliados após o desenvolvimento tumoral.

Foram utilizados 20 camundongos que passaram, ou não, pela separação materna, como descrito no item 4.6. Estes, foram divididos em 4 grupos, conforme descritos no item 4.7. Aos 45 dias de vida realizou-se a indução da carcinogênese pulmonar conforme descrito no item 4.9. Após 5 meses avaliou-se a atividade de neutrófilos sangüíneos, colhidos desses animais, por citometria de fluxo, conforme descrito no item 4.12.3.

RESULTADOS

A **tabela 17** mostra e as **figuras 37 e 38** ilustram os dados de atividade de neutrófilos, de camundongos A/J que passaram, ou não, pela separação materna e que receberam ou não o carcinógeno pulmonar; as avaliações foram realizadas após 5 meses da indução da carcinogênese por citometria de fluxo.

Para este experimento realizou-se análise de variância de duas vias onde se considerou: o efeito do fator tumor, o efeito do fator separação materna e o efeito da interação tumor X separação materna. A análise estatística desses dados mostrou que houve diferença significante entre os grupos ($p < 0,05$). O *burst* basal dos grupos separação materna e controle, que receberam o carcinógeno NNK, apresentaram-se reduzidos quando comparados aos grupos que receberam solução salina. Em relação aos dados relativos ao *burst* na presença de PMA, intensidade e porcentagem de fagocitose, houve relação entre o fato de terem ou não sido separados das mães, ou seja os grupos

experimentais apresentaram esses parâmetros aumentados ($p < 0,05$). Já o burst induzido pela fagocitose não mostrou diferença estatística significativa.

Tabela 17 – Atividade de neutrófilos sanguíneos, avaliada por citometria de fluxo, de camundongos que passaram, ou não, pela separação materna e observados após a indução da carcinogênese pulmonar. Os dados representam a média ± desvio padrão.

Parâmetros[A]	Cont.+salina	Cont.+NNK	S.M.+salina	S.M.+NNK
***Burst* Basal**	16,18 ± 4,34[a]	21,80 ± 6,82	15,17 ± 1,57[a]	18,38 ± 5,64
***Burst* SAPI**	32,02 ± 6,17	33,93 ± 5,23	30,47 ± 5,76	34,55 ± 10,50
***Burst* PMA**	41,66 ± 9,28[c]	42,07 ± 7,48[b]	24,20 ± 6,24*[b]	33,28 ± 5,25*
% fagocitose	67,54 ± 13,43[c]	69,72 ± 8,70	87,24 ± 6,74*	78,55 ± 11,06*
Int. fagocitose	15,04 ± 6,01[c]	13,58 ± 4,90	23,56 ± 4,71*[b]	19,76 ± 7,85*

Os dados representam a intensidade média de fluorescência (media±desvio padrão), correspondente ao *gate* da população de neutrófilos sanguíneos. [a] em relação aos grupos Cont.+NNK e S.M.+NNK; * em relação aos grupos Cont.+salina e Cont.+NNK; [b] em relação ao grupo S.M.+NNK; [c] em relação ao grupo S.M.+salina, $p<0,05$ análise de variância de duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações Student-Newman-Keuls, n=10 animais/grupo.

[A] Porcentagem de Fagocitose: quantos neutrófilos fagocitaram partículas de SAPI. Intensidade de Fagocitose: quantas bactérias foram ingeridas pela população de neutrófilos. Expresso pela intensidade de fluorescência da população de neutrófilos.

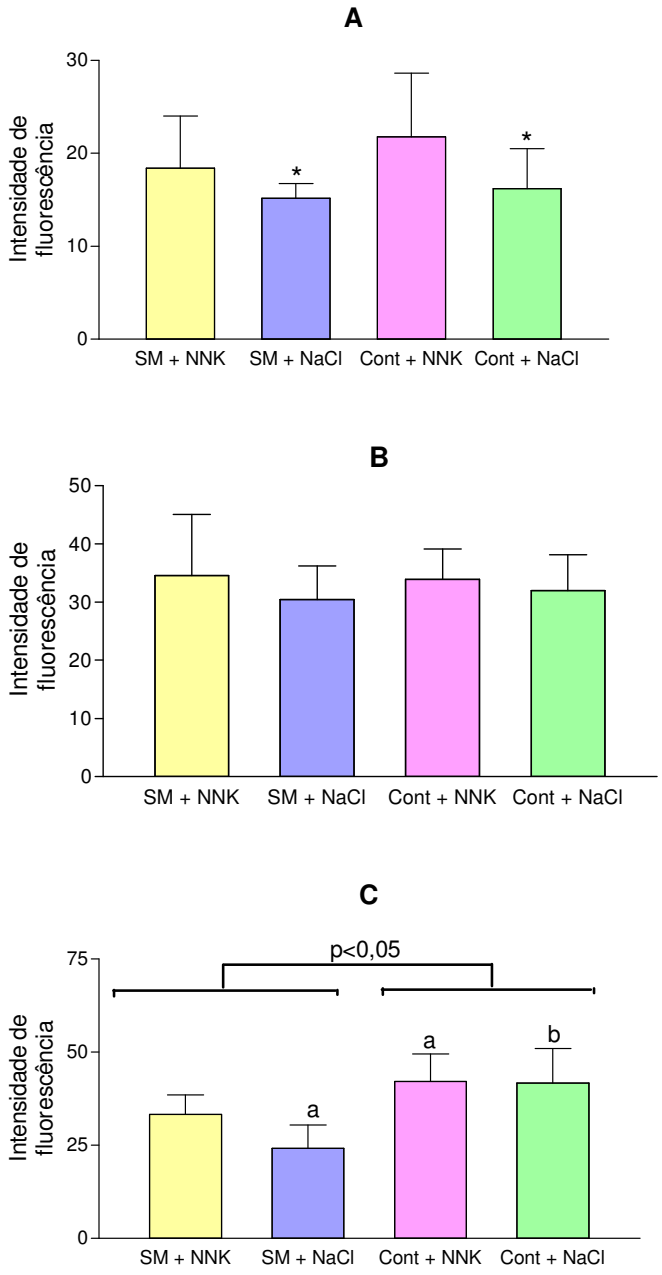


Figura 37 - Efeitos da separação materna sobre a atividade de neutrófilos sangüíneos de camundongos A/J avaliada após a carcinogênese pulmonar. A – *burst* oxidativo basal, B – *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com SAPI, C – *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com PMA. * $p<0,05$ em relação aos grupos SM+NNK e Cont+NNK; [a] $p<0,05$ em relação ao grupo SM+NNK e [b] $p<0,05$ em relação ao grupo SM+NaCl, análise de variância de duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações Student-Newman-Keuls. n=10 animais/grupo

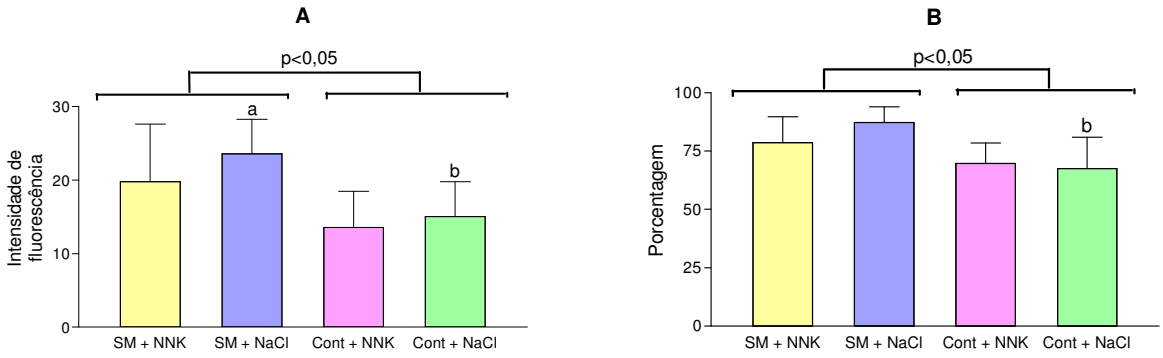


Figura 38 - Efeitos da separação materna sobre a atividade de neutrófilos sangüíneos de camundongos A/J avaliada após a carcinogênese pulmonar. A – intensidade de fagocitose, B – porcentagem de fagocitose. [a] p<0,05 em relação ao grupo SM+NNK e [b] p,0,05 em relação ao grupo SM+NaCl, análise de variância de duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações Student-Newman-Keuls. n=10 animais/grupo

5.12. EXPERIMENTO 12 – Efeitos da separação materna sobre a atividade de macrófagos alveolares, de camundongos da linhagem A/J avaliados após o desenvolvimento tumoral.

Foram utilizados 20 camundongos que passaram, ou não, pela separação materna, como descrito no item 4.6. Estes, foram divididos em 4 grupos, conforme descritos no item 4.7. Aos 45 dias de vida realizou-se a indução da carcinogênese pulmonar conforme descrito no item 4.9. Após 5 meses avaliou-se a atividade de macrófagos alveolares, colhidos desses animais, por citometria de fluxo, conforme descrito no item 4.12.3.

RESULTADOS

A **tabela 18** mostra e as **figuras 39 e 40** ilustram os dados de atividade de macrófagos alveolares, de camundongos A/J que passaram, ou não, pela separação materna e que receberam ou não o carcinógeno pulmonar; as avaliações foram realizadas após 5 meses da indução da carcinogênese por citometria de fluxo.

A análise estatística desses dados mostrou que houve diferença significante entre os grupos ($p < 0,05$). O *burst* basal e o *burst* na presença do PMA dos grupos relacionados à separação materna, apresentaram-se aumentados quando comparados aos grupos controles. Em relação aos dados relativos ao *burst* induzido pela fagocitose, o grupo S.M.+NNK apresentou aumento deste parâmetro em relação ao grupo Cont.+NNK. O grupo S.M.+NaCl apresentou redução do *burst* induzido pela fagocitose quando comparado aos grupos Cont.+NaCl e S.M.+NNK. Em relação à intensidade e porcentagem de fagocitose, os grupos Cont.+NaCl e S.M.+NNK apresentaram valores reduzidos em relação aos do grupo Cont.+NNK ($p < 0,05$).

Tabela 18 – Atividade de macrófagos alveolares, avaliada por citometria de fluxo, de camundongos que passaram, ou não, pela separação materna e observados após a indução da carcinogênese pulmonar. Os dados representam a média ± desvio padrão.

Parâmetros[A]	Cont.+salina	Cont.+NNK	S.M.+salina	S.M.+NNK
***Burst* Basal**	74,29 ± 20,99	87,00 ± 10,32	63,42 ± 18,81*	97,79 ± 17,04*
***Burst* SAPI**	59,20 ± 7,47	59,65 ± 9,16	43,27 ± 10,64[b]	61,99 ± 13,64[a]
***Burst* PMA**	90,59 ± 29,04	106,41 ± 18,25	87,74 ± 7,42*[c]	118,34 ± 26,48*
% fagocitose	34,96 ± 5,15[a]	50,82 ± 17,33	47,76 ± 15,61	35,98 ± 6,52[a]
Int. fagocitose	9,22 ± 0,91[a]	11,49 ± 2,80	10,92 ± 2,54	9,12 ± 1,00[a]

Os dados representam a intensidade média de fluorescência (media±desvio padrão), correspondente ao *gate* da população de macrófagos alveolares. * em relação aos grupos Cont.+NNK e Cont.+salina; [a] em relação ao grupo Cont.+NNK; [b] em relação ao grupo Cont.+NNK; [c] em relação ao grupo S.M.+NNK, $p<0,05$ análise de variância de duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações Student-Newman-Keuls, n=10 animais/grupo.

[A] Porcentagem de Fagocitose: quantos macrófagos fagocitaram partículas de SAPI. Intensidade de Fagocitose: quantas bactérias foram ingeridas pela população de macrófagos. Expresso pela intensidade de fluorescência da população de macrófagos.

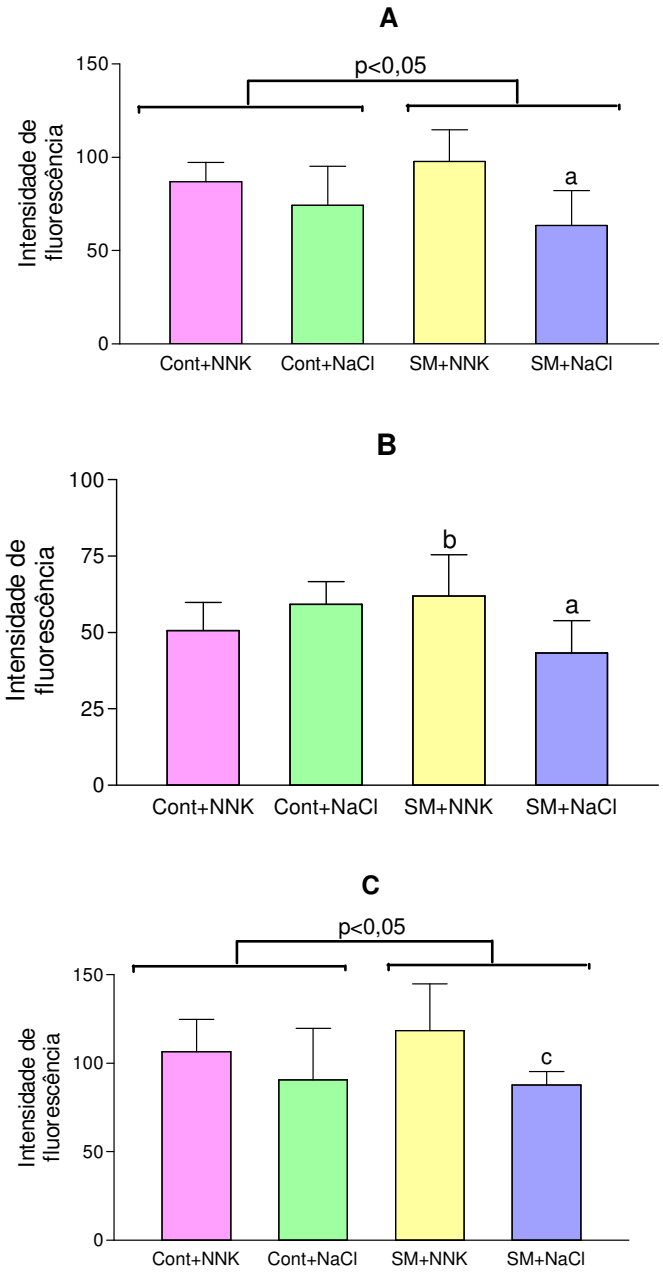


Figura 39 - Efeitos da separação materna sobre a atividade de macrófagos alveolares de camundongos A/J avaliada após a carcinogênese pulmonar. A – *burst* oxidativo basal, B – *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com SAPI, C – *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com PMA. [a] p<0,05 em relação aos grupos Cont+NaCl e SM+NNK; [b] p<0,05 em relação ao grupo Cont+NNK e [c] p<0,05 em relação ao grupo SM+NNK, análise de variância de duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações Student-Newman-Keuls. n=10 animais/grupo

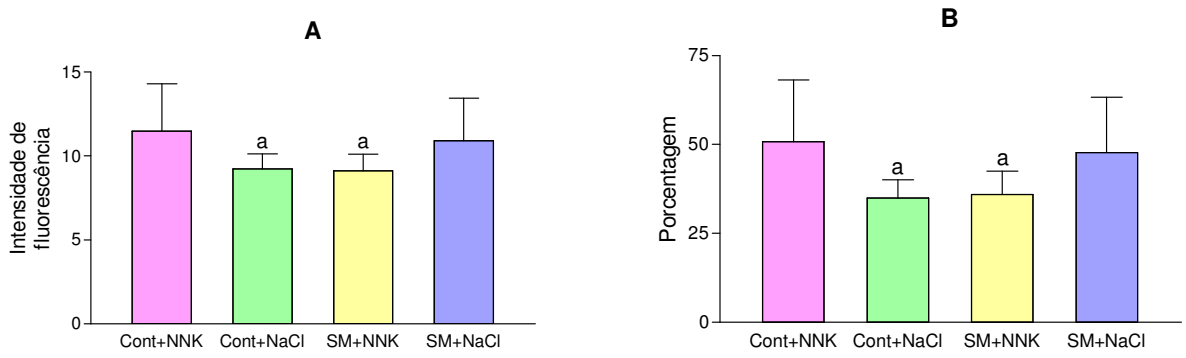


Figura 40 - Efeitos da separação materna sobre a atividade de macrófagos alveolares de camundongos A/J avaliada após a carcinogênese pulmonar. A – intensidade de fagocitose, B – porcentagem de fagocitose. [a] $p<0,05$ em relação ao grupo Cont+NNK, análise de variância de duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações Student-Newman-Keuls. n=10 animais/grupo

5.13. EXPERIMENTO 13 – Efeitos da separação materna sobre a produção de NO por macrófagos alveolares, de camundongos da linhagem A/J avaliados após o desenvolvimento tumoral.

Foram utilizados 20 camundongos que passaram, ou não, pela separação materna, como descrito no item 4.6. Estes, foram divididos em 4 grupos, conforme descritos no item 4.7. Aos 45 dias de vida realizou-se a indução da carcinogênese pulmonar conforme descrito no item 4.9. Após 5 meses avaliou-se a produção de NO por macrófagos alveolares, colhidos desses animais, por um detector de ELISA, conforme descrito no item 4.12.4.

RESULTADOS

A **tabela 19** mostra e a **figura 41** ilustra os dados de produção de NO por macrófagos alveolares, de camundongos A/J que passaram, ou não, pela separação materna e receberam ou não o carcinógeno pulmonar; as avaliações foram realizadas após 5 meses da indução da carcinogênese por ELISA.

A análise estatística desses dados mostrou ausência de diferenças significantes entre os grupos ($p < 0,05$).

Tabela 19 – Produção de NO por macrófagos alveolares, avaliada por ELISA, de camundongos que passaram, ou não, pela separação materna e observados 5 meses após a indução da carcinogênese pulmonar. Os dados representam a média ± desvio padrão.

Parâmetro[A]	Cont.+salina	Cont.+NNK	S.M.+salina	S.M.+NNK
NO_2	0,88 ± 0,61	1,30 ± 0,92	1,32 ± 0,76	1,54 ± 0,87

Análise de variância de duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações Student-Newman-Keuls. n=10 animais/grupo
[A] µmol/1x10^5células

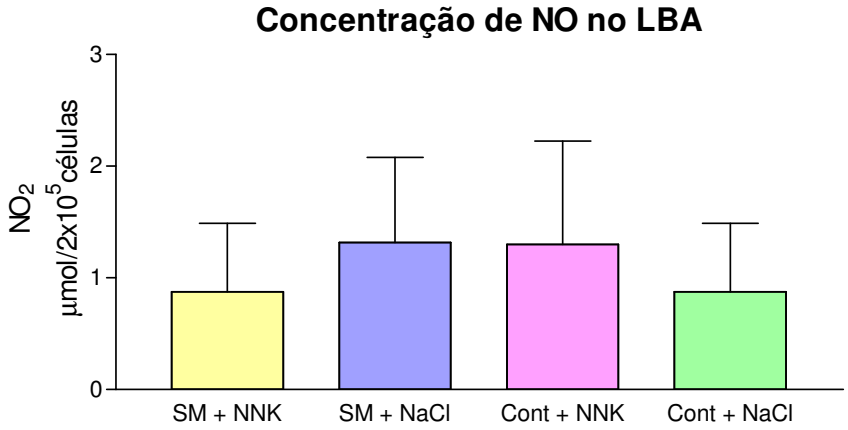


Figura 41 - Efeitos da separação materna sobre a produção de NO por macrófagos alveolares de camundongos A/J avaliada após a carcinogênese pulmonar, análise de variância de duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações Student-Newman-Keuls. n=10 animais/grupo

5.14. EXPERIMENTO 14 – Efeitos da separação materna sobre parâmetros hematológicos, de camundongos da linhagem A/J avaliados após o desenvolvimento tumoral.

Foram utilizados 20 camundongos que passaram, ou não, pela separação materna, como descrito no item 4.6. Estes, foram divididos em 4 grupos, conforme descritos no item 4.7. Aos 45 dias de vida realizou-se a indução da carcinogênese pulmonar conforme descrito no item 4.9. Após 5 meses realizou-se o hemograma, conforme descrito no item 4.11.

RESULTADOS

A **tabela 20** mostra e a **figura 42** ilustra os parâmetros hematológicos de camundongos que passaram, ou não, pela separação materna, as avaliações foram feitas após 5 meses da indução da carcinogênese.

A análise estatística desses dados mostrou ausência de diferenças significantes entre os grupos ($p<0,05$) para os seguintes parametros

hematológicos: número de leucócitos, número de eritrócitos e hemoglobina. Com relação ao hematócrito, os grupos separação materna (S.M.+salina e S.M+NNK) apresentaram aumento em relação aos grupos controle (Cont.+salina e Cont.+NNK) ($p<0,05$).

Tabela 20 – Efeitos da separação materna em camundongos A/J, sobre parâmetros hematológicos observados após a indução da carcinogênese pulmonar. Os dados representam a média ± desvio padrão.

Parâmetros	Cont.+salina	Cont.+NNK	S.M.+salina	S.M.+NNK
Leucócitos ($x10^6/mm^3$)	4,54 ± 1,00	4,86 ± 2,02	4,58 ± 1,45	4,19 ± 1,88
Eritrócitos ($x10^6/mm^3$)	8,79 ± 1,35	8,86 ± 0,97	8,90 ± 0,43	8,91 ± 0,74
Hemoglobina (g/dL)	9,42 ± 1,23	9,46 ± 0,49	9,44 ± 0,66	10,02 ± 1,04
Hematócrito (%)	37,44 ± 2,24	37,11 ± 2,03	38,56 ± 2,35[a]	40,10 ± 2,69[ab]

[a] em relação aos grupos Cont.+salina e Cont.+NNK; [b] em relação ao grupo Cont.+NNK, $p<0,05$ análise de variância de duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações Student-Newman-Keuls, n=10 animais/grupo.

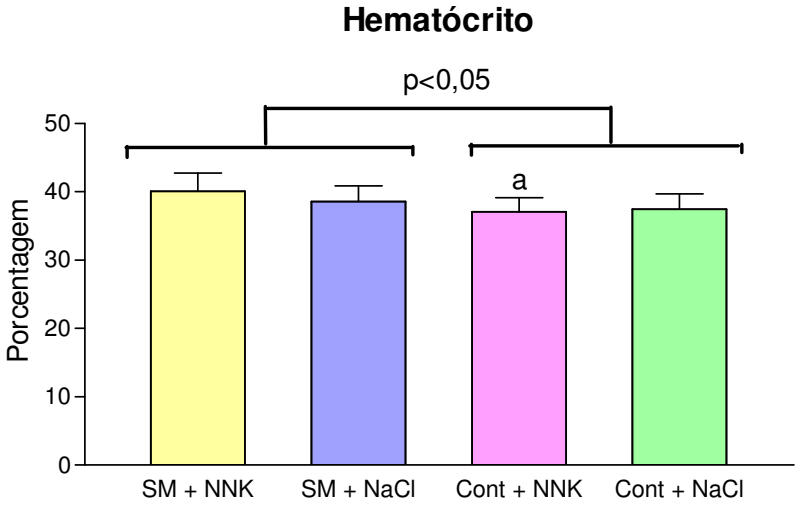


Figura 42 - Efeitos da separação materna sobre os parâmetros hematológicos de camundongos A/J avaliada após a carcinogênese pulmonar. [a] p<0,05 em relação ao grupo SM+NNK, análise de variância de duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações Student-Newman-Keuls. n=10 animais/grupo

A **tabela 21** mostra a contagem diferencial de células do sangue periférico de camundongos que passaram, ou não, pela separação materna, as avaliações foram feitas após 5 meses da indução da carcinogênese.

A análise estatística desses dados mostrou ausência de diferenças significantes entre os grupos (p<0,05) para todos os tipos celulares: linfócitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos e mastócitos.

Tabela 21 – Efeitos da separação materna em camundongos A/J, sobre a contagem diferencial de células do sangue periférico observados após a indução da carcinogênese pulmonar. Os dados representam a média ± desvio padrão.

Parâmetros[A]	Cont.+salina	Cont.+NNK	S.M.+salina	S.M.+NNK
Linfócitos	68,22 ± 10,76	60,50 ± 28,15	62,89 ± 18,30	66,00 ± 13,00
Neutrófilos	28,67 ± 10,89	37,50 ± 25,98	33,67 ± 16,85	31,11 ± 13,07
Basófilos	1,00 ± 0,00	0,88 ± 0,35	0,78 ± 0,42	0,89 ± 0,57
Eosinófilos	1,11 ± 0,31	1,13 ± 0,35	1,22 ± 0,63	1,00 ± 0,00
Mastócitos	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00	1,00 ± 0,00

[A] Porcentagem de células no sangue periférico.
Análise de variância de duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações Student-Newman-Keuls, n=10 animais/grupo.

5.15. EXPERIMENTO 15 – Efeitos da separação materna sobre a incidência tumoral e sobre o número de lesões tumorais por grupo, de camundongos da linhagem A/J avaliados após o desenvolvimento tumoral.

Foram utilizados 20 camundongos que passaram, ou não, pela separação materna, como descrito no item 4.6. Estes, foram divididos em 4 grupos, conforme descritos no item 4.7. Aos 45 dias de vida realizou-se a indução da carcinogênese pulmonar conforme descrito no item 4.9. Após 5 meses realizou-se a coleta e análise, conforme descrito no item 4.16.

RESULTADOS

A **tabela 22** mostra e a **figura 43** ilustra a incidência tumoral, ou seja, quantos animais apresentaram ou não lesões tumorais, em camundongos que

passaram, ou não, pela separação materna; as avaliações foram feitas 5 meses após a indução da carcinogênese.

A avaliação feita levou em consideração dois parâmetros: **Sim** (os animais apresentaram lesões nos pulmões) e **Não** (os animais não apresentaram lesões nos pulmões). A análise estatística, realizada pelo teste exato de Fisher, desses dados mostrou que houve diferença significante entre os grupos que receberam o carcinógino NNK e os que receberam solução salina ($p<0,001$), sendo que, os grupos que receberam o carcinógeno apresentaram mais lesões pulmonares do que os grupos que receberam a solução salina. Essa diferença também se mostrou significante quando comparados tanto os grupos S.M.+salina e S.M.+NNK ($p<0,001$) quanto quando comparados os grupos Cont.+salina e Cont.+NNK ($p<0,05$). Porém quando comparados os grupos separação materna e os controles não houve diferença significante.

Tabela 22 – Efeitos da separação materna em camundongos A/J, sobre a incidência de nódulos tumorais observados após a indução da carcinogênese pulmonar.

	Cont + NaCl	**Cont + NNK**	**SM + NaCl**	**SM + NNK**
Sim	4	9^{ac}	1	10^{ab}
Não	4	0^{ac}	6	0^{ab}

[a] em relação aos grupos que receberam salina $p<0,001$; [b] em relação ao grupo SM+NaCl $p<0,001$, [c] em relação ao grupo Cont+NaCl $p<0,05$, análise pelo teste exato de Fisher , n=10 animais/grupo.

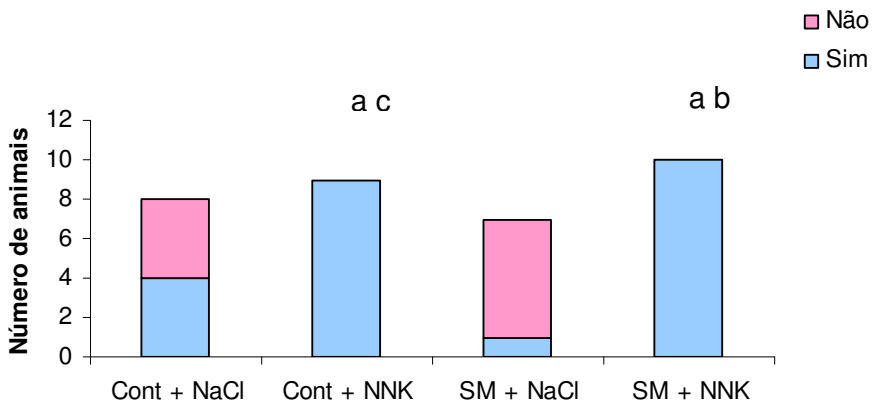


Figura 43 - Efeitos da separação materna sobre a incidência de nódulos tumorais de camundongos A/J avaliada após a carcinogênese pulmonar. [a] em relação aos grupos que receberam salina $p<0,001$; [b] em relação ao grupo SM+NaCl $p<0,001$, [c] em relação ao grupo Cont+NaCl $p<0,05$, análise pelo teste exato de Fisher , n=10 animais/grupo.

A **tabela 23** mostra e a **figura 44** ilustra o número de lesões tumorais por grupo de camundongos que passaram, ou não, pela separação materna; as avaliações foram feitas 5 meses após da indução da carcinogênese.

A análise estatística desses dados mostrou presença de diferenças significantes entre os grupos que receberam o carcinógino NNK e os que receberam solução salina ($p<0,05$), sendo que, os grupos que receberam o carcinógeno apresentaram um maior número de lesões pulmonares do que os grupos que receberam a solução salina. Essa diferença também se mostrou significante quando comparados tanto os grupos S.M.+salina e S.M.+NNK ($p<0,05$) e também o quando comparados os grupos Cont.+salina e Cont.+NNK ($p<0,05$).

Tabela 23 – Efeitos da separação materna em camundongos A/J, sobre o número de lesões tumorais por grupo observados após a indução da carcinogênese pulmonar. Os dados representam a média ± desvio padrão.

Parâmetros	Cont.+salina	Cont.+NNK	S.M.+salina	S.M.+NNK
Número de lesões tumorais por grupo	0,63 ± 0,74	9,22 ± 4,02[ac]	0,14 ± 0,38	7,7 ± 3,02[ab]

[a] em relação aos grupos que receberam salina; [b] em relação ao grupo SM+NaCl; [c] em relação ao grupo Cont+NaCl p<0,05, análise de variância de duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações Student-Newman-Keuls, n=10 animais/grupo.

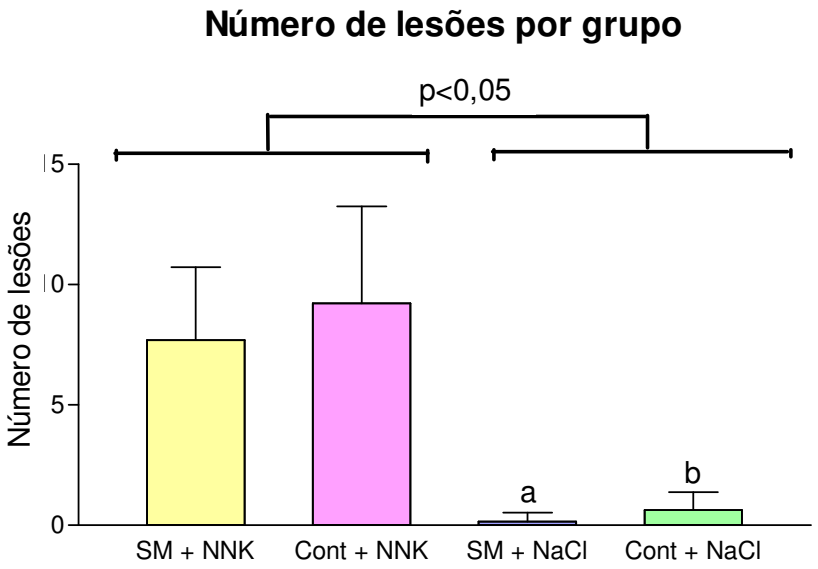


Figura 44 - Efeitos da separação materna sobre o número de lesões por pulmão de camundongos A/J avaliado após a carcinogênese pulmonar. [a] em relação ao grupo SM+NNK; [b] em relação ao grupo Cont+NNK p<0,05, análise de variância de duas vias seguido pelo teste de múltiplas comparações Student-Newman-Keuls, n=10 animais/grupo.

5.16. EXPERIMENTO 16 – Efeitos da separação materna sobre alguns parâmetros microscópicos de tumores de camundongos da linhagem A/J avaliados após o desenvolvimento tumoral.

Foram utilizados 20 camundongos que passaram, ou não, pela separação materna, como descrito no item 4.6. Estes, foram divididos em 4 grupos, conforme descritos no item 4.7. Aos 45 dias de vida realizou-se a indução da

carcinogênese pulmonar conforme descrito no item 4.9. Após 5 meses realizou-se a coleta e análise, conforme descrito no item 4.16.

RESULTADOS

A **tabela 24** mostra a porcentagem de área de lesão, ou seja, a relação de área de lesão pela área pulmonar, o número de lesões por área pulmonar e a área de lesão por número de lesões. Estes parâmetros foram observados em cortes histológicos de pulmão, de camundongos que passaram, ou não, pela separação materna; as avaliações foram feitas 5 meses após a indução da carcinogênese.

A análise estatística, realizada pelo teste "t" de Student, desses dados mostrou que não houve diferença significante entre os grupos S.M.+NNK e o grupo Cont.+NNK.

Tabela 24 – Efeitos da separação materna em camundongos A/J, sobre a porcentagem de área de lesão, o número de lesões por área pulmonar e a área de lesão por número de lesões. Os dados representam a média ± desvio padrão.

	Cont + NNK	**SM + NNK**
Porcentagem de área de lesão	1,20 ± 0,83	1,50 ± 0,45
Número de lesões por área de pulmão	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01
Área de lesões por número de lesões	0,50 ± 0,34	0,49 ± 0,12

Teste "t" de Student.

A **tabela 25** mostra a porcentagem de tumores de padrão histológico sólido ou misto. As **figuras 45 e 46** mostram fotos das lesões tumorais, onde

podemos observar um tumor sólido e um misto. Estes parâmetros foram observados em cortes histológicos de pulmão, de camundongos que passaram, ou não, pela separação materna; as avaliações foram feitas 5 meses após a indução da carcinogênese.

Tabela 25 – Efeitos da separação materna em camundongos A/J, sobre a porcentagem de tumores de padrão histológico sólido ou misto**.**

	Cont + NNK	**SM + NNK**
Porcentagem de tumores sólidos	33,330	63,640
Porcentagem de tumores mistos	66,670	36,360

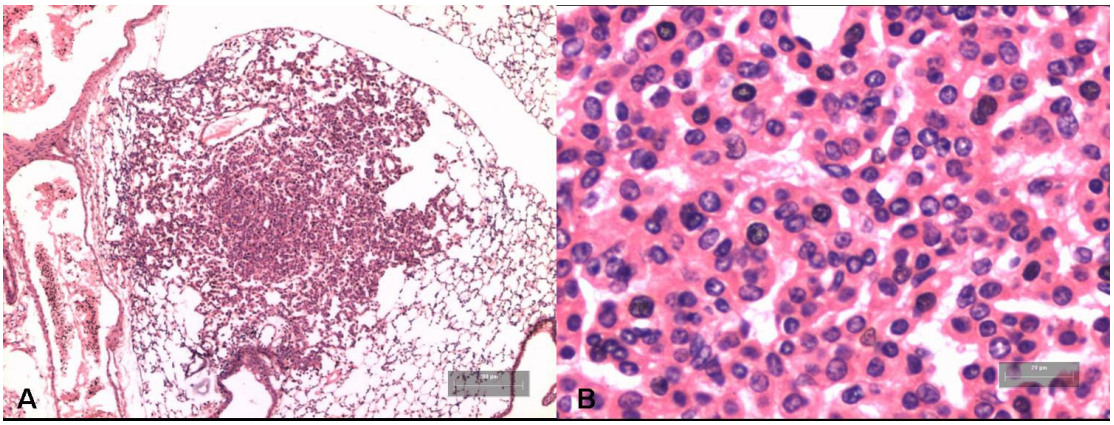


Figura 45 – Tumor do tipo sólido sendo: (A) aumento de 4x; (B) aumento de 40x. Podemos observar uma massa não circunscrita, comprimindo levemente o parênquima pulmonar adjacente. Encontramos também células neoplásicas sem arcabouço citoplasmático delimitado demonstrando aspecto sólido, com citoplasma eosinofílico e pouco granular. Os núcleos apresentam baixo grau de atipia, sendo basofílicos, grandes e esféricos, apresentando nucléolos por vezes evidentes e em número variável (1 à 5).

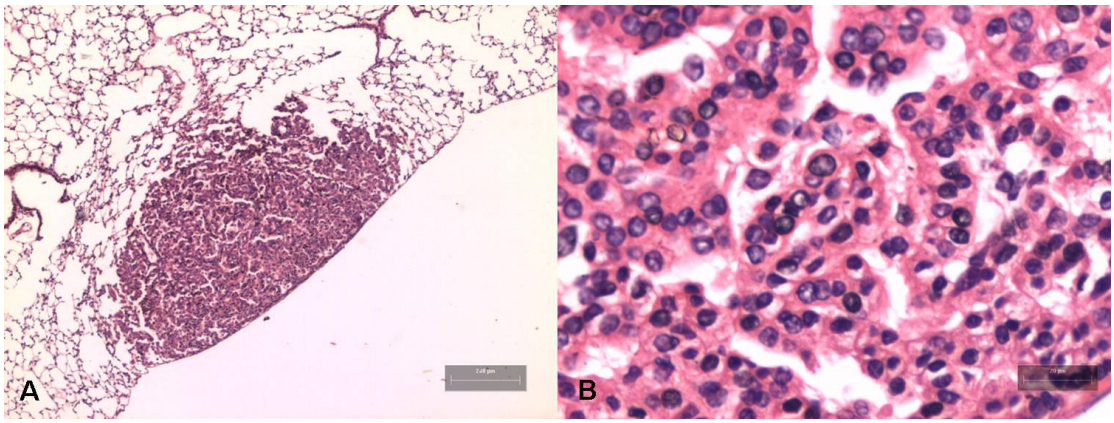


Figura 46 - Tumor do tipo misto sendo: (A) aumento de 4x; (B) aumento de 40x. Podemos observar uma massa levemente circunscrita, comprimindo o parênquima pulmonar adjacente. Poucas células apresentam bordos celulares delimitados, sendo que estas se apresentam de duas formas, sólida, ou formando pequenos cordões, onde muitas vezes estes se formam com uma ou duas células adjacentes. O citoplasma é eosinofílico pouco granular e por vezes apresentando vacúolos. Já os núcleos apresentam grau moderado de atipia, variando de esféricos e grandes, a ovais e um pouco menores, sempre basofílicos. Ocorre ainda a presença de nucléolos que são pouco evidentes.

5.17. EXPERIMENTO 17 – Efeitos da separação materna sobre o comportamento de camundongos da linhagem C57BL/6 aos 45 dias de vida avaliados no campo aberto e no labirinto em cruz elevado.

Foram utilizados 10 camundongos da linhagem C57BL/6 que passaram, ou não, pela separação materna, como descrito no item 4.6. Estes animais, foram divididos em 2 grupos: separação materna e controle. Aos 45 dias de vida realizaram-se testes comportamentais no campo aberto, conforme descrito no item 4.8.

RESULTADOS

A **tabela 26** mostra os efeitos comportamentais, avaliados no campo aberto, de camundongos da linhagem C57BL/6 que passaram, ou não, pela separação materna;as medidas foram feitas aos 45 dias de vida.

A análise estatística mostrou diferenças significantes entre os dados comportamentais obtidos entre os grupos controle e separação materna ($p < 0,05$) para os seguintes parâmetros: aumento do tempo na região periférica e aumento da locomoção na região periférica, diminuição do tempo na região central, aumento da locomoção total na arena, aumento do tempo em movimento na arena e aumento da velocidade média na arena. Os parâmetros, locomoção na região central e freqüência e tempo de *grooming* não apresentaram diferenças significantes, teste “t” de Student. As **figuras 47** a **52** ilustram as direções das diferenças encontradas.

Tabela 26 – Comportamento de camundongos da linhagem C57BL/6 que passaram, ou não, pela separação materna, avaliados no campo aberto aos 45 dias de vida.

Parâmetros[A]	Controle	S. Materna
TRC	30,64 ± 2,05	25,26 ± 2,64**
TRP	269,36 ± 2,05	274,74 ± 2,64**
LRC	304,54 ± 24,60	318,92 ± 18,62
LRP	1822,00 ±172,20	2303,40 ± 270,99*
LTA	2210,00 ± 263,86	2622,30 ± 288,08*
TMA	122,55 ± 21,29	151,77 ± 13,28*
VMA	7,37 ± 0,88	8,75 ± 0,96*
FG	2,60 ± 1,34	1,92 ± 0,91
TG	4,98 ± 1,57	5,21 ± 1,54

[A] TRC=Tempo na região central, TRP=Tempo na região periférica, LRC=Locomoção na região central, LRP=Locomoção na região periférica, LTA=Locomoção total na arena, TMA=Tempo em movimento na arena, VMA=Velocidade média na arena, FG=Freqüência de *grooming*, TG= Tempo de *grooming*

* $p<0,05$ e ** $p<0,001$ em relação ao grupo controle, teste "t" de Student

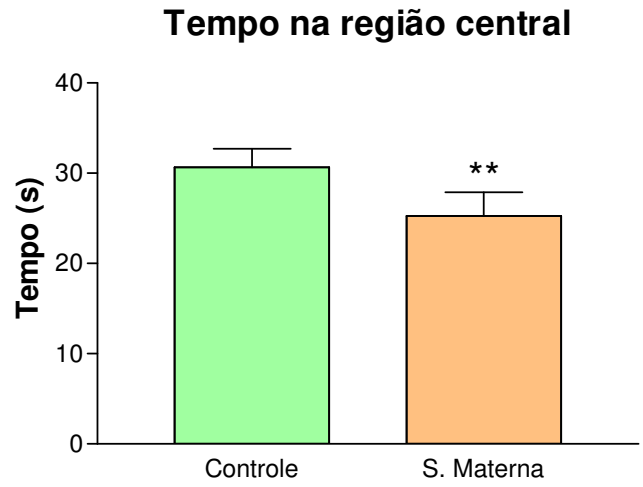


Figura 47 – Efeitos da separação materna sobre o tempo de permanência na região central do campo aberto de camundongos C57BL/6. ** p<0,001 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=5 animais/grupo

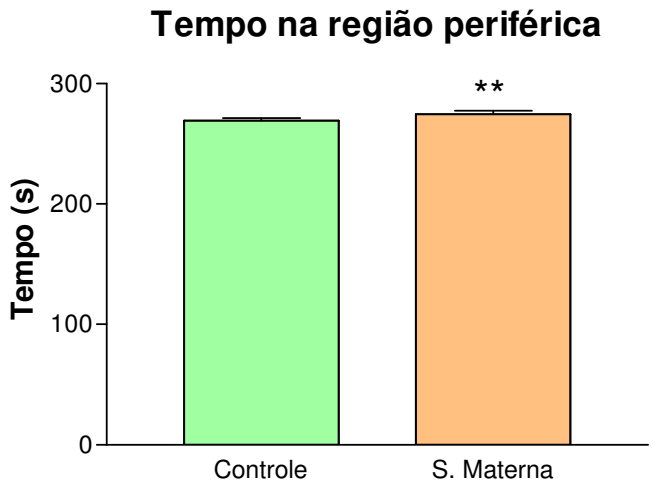


Figura 48 – Efeitos da separação materna sobre o tempo de permanência na região periférica do campo aberto de camundongos C57BL/6. ** p<0,001 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=5 animais/grupo

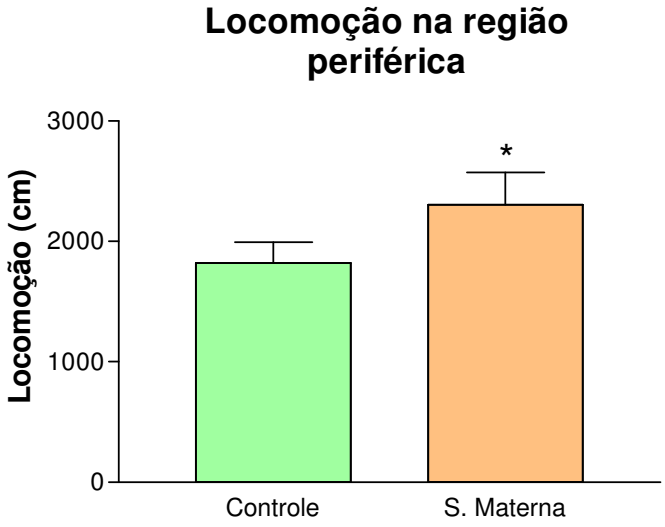


Figura 49 – Efeitos da separação materna sobre a locomoção na região periférica do campo aberto de camundongos C57BL/6. * p<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=5 animais/grupo

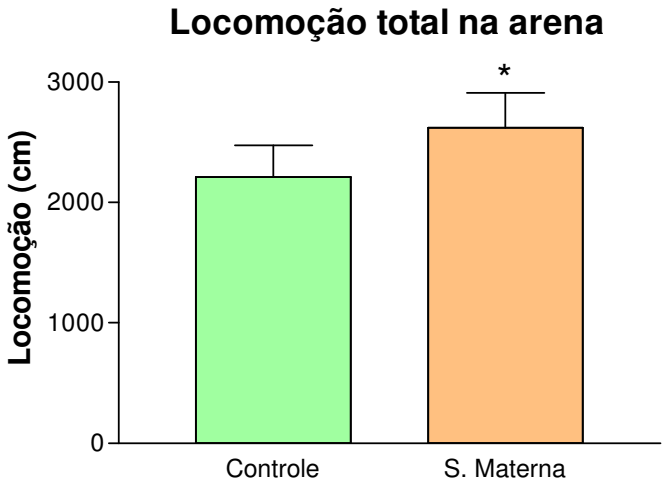


Figura 50 – Efeitos da separação materna sobre a locomoção total na arena do campo aberto de camundongos C57BL/6. * p<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=5 animais/grupo

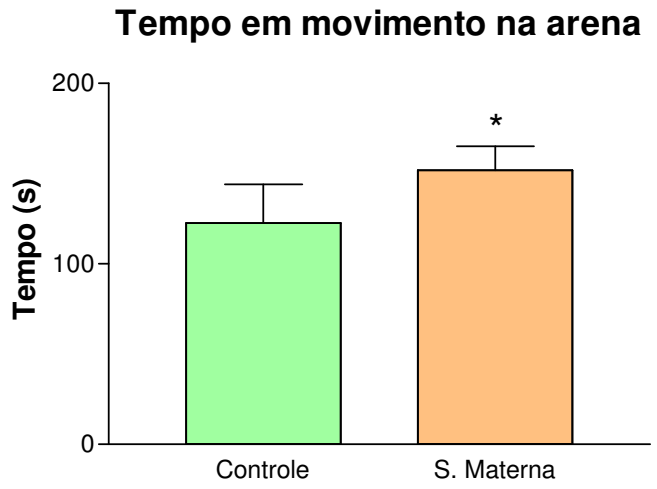


Figura 51 – Efeitos da separação materna sobre tempo em movimento na arena do campo aberto de camundongos C57BL/6. * p<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=5 animais/grupo

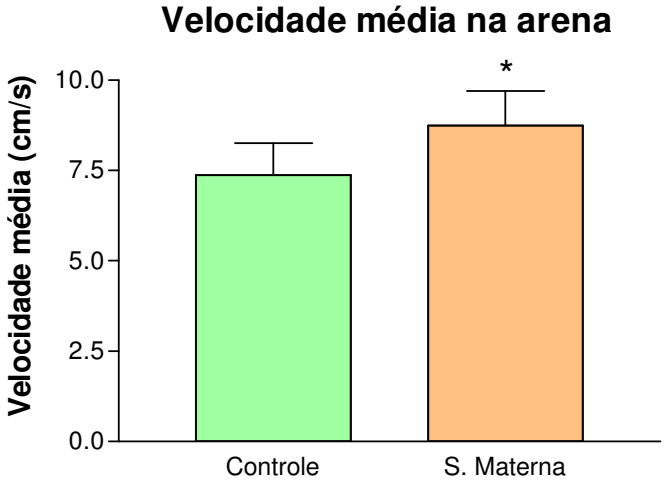


Figura 52 – Efeitos da separação materna sobre a velocidade média na arena do campo aberto de camundongos C57BL/6. * p<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=5 animais/grupo

A **tabela 27** mostra dados comportamentais, de camundongos da linhagem C57BL/6 que passaram, ou não, pela separação materna, avaliados agora no labirinto em cruz elevado;os animais foram observados aos 45 dias de vida.

A análise estatística mostrou diferenças significantes entre os dados comportamentais obtidos entre os grupos controle e separação materna ($p < 0,05$) para os parâmetros: aumento da locomoção total na arena e diminuição do tempo em comportamento de *grooming*. A analise dos demais parâmetros não mostrou diferenças significantes entre eles (teste “t” de Student). Porém, é interessante notar uma tendência de diminuição da porcentagem de tempo nos braços abertos e uma tendência de aumento da porcentagem de entradas nos braços fechados. As **figuras 53** a **56** ilustram esses resultados.

Tabela 27 – Comportamento de camundongos da linhagem C57BL/6 que passaram, ou não, pela separação materna, avaliados aos 45 dias de vida no labirinto em cruz elevado.

Parâmetros[A]	Controle	S. Materna
%TBA	15,69 ± 5,416	10,90 ± 2,39
%TBF	90,71 ± 5,53	90,90 ± 5,46
%EBA	26,06 ± 5,69	23,24 ± 2,91
%EBF	73,94 ± 5,69	79,56 ± 8,20
LTA	1451,80 ± 73,96	1622,40 ± 106,37*
TMA	66,76 ± 15,44	70,56 ± 12,06
VMA	5,69 ± 1,28	5,51 ± 0,48
FG	1,60 ± 1,14	1,00 ± 1,00
TG	14,94 ± 7,78	3,27 ± 4,42*

[A] %TBA= Porcentagem de tempo nos braços abertos, %TBF= Porcentagem de tempo nos braços abertos, %EBA= Porcentagem de entradas nos braços abertos, %EBF= Porcentagem de entradas nos braços fechados, LTA=Locomoção total na arena, TMA=Tempo em movimento na arena, VMA=Velocidade média na arena, FG=Freqüência de *grooming*, TG= Tempo de *grooming*

* p<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student

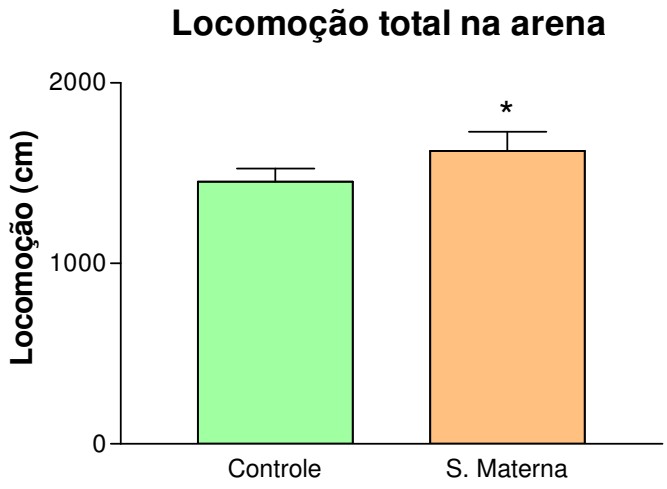


Figura 53 – Efeitos da separação materna sobre a locomoção total na arena de camundongos C57BL/6, observados no labirinto em cruz elevado. * p<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=5 animais/grupo

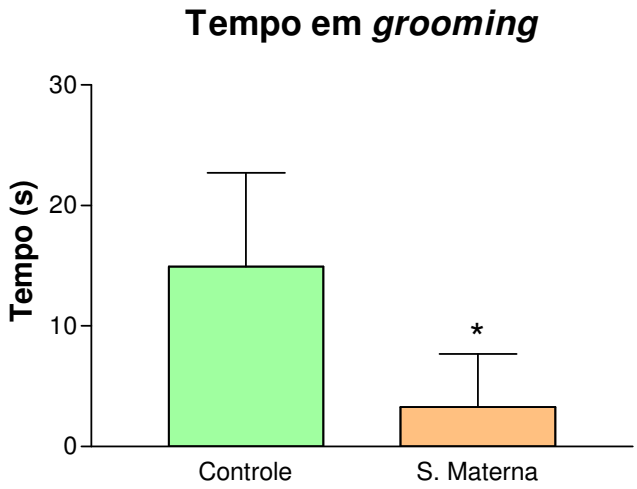


Figura 54 – Efeitos da separação materna sobre o tempo em comportamento de *grooming* de camundongos C57BL/6, observados no labirinto em cruz elevado. *p<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=5 animais/grupo

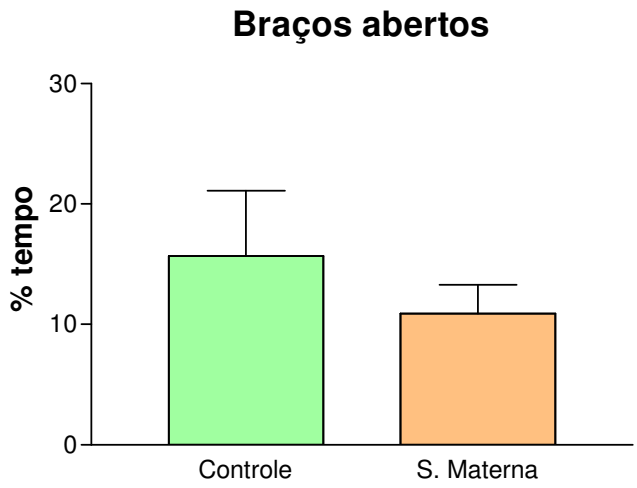


Figura 55 – Efeitos da separação materna sobre a porcentagem de tempo nos braços abertos de camundongos C57BL/6, observados no labirinto em cruz elevado. *p<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=5 animais/grupo

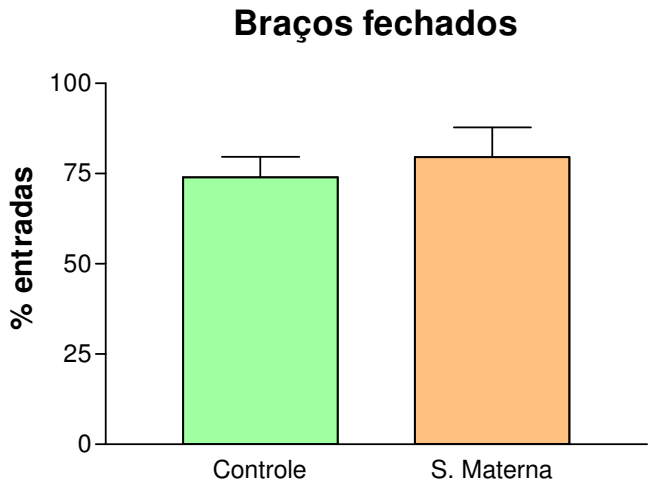


Figura 56 – Efeitos da separação materna sobre a porcentagem de entradas nos braços fechados de camundongos C57BL/6, observados no labirinto em cruz elevado. *p<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=5 animais/grupo

5.18. EXPERIMENTO 18 – Efeitos da separação materna sobre a atividade de neutrófilos sangüíneos, de camundongos da linhagem C57BL/6, avaliada por citometria de fluxo, aos 45 dias de vida.

Foram utilizados 10 camundongos que passaram, ou não, pela separação materna, como descrito no item 4.6. Os animais, foram divididos em 2 grupos: separação materna e controle. Aos 45 dias de vida foi avaliada a atividade de neutrófilos sangüíneos por citometria de fluxo, conforme descrito no item 4.12.3.

RESULTADOS

A **tabela 28** mostra os dados de atividade de neutrófilos sangüíneos, avaliados por citometria de fluxo, em camundongos que passaram, ou não, pela separação materna; as mensurações foram realizadas aos 45 dias de vida.

A análise estatística mostrou diferenças significantes entre grupos controle e separação materna ($p < 0,05$) para os seguintes parâmetros: aumento do *burst* induzido por PMA e aumento da porcentagem e intensidade de fagocitose (teste "t" de Student). Já os dados relacionados à *burst* basal e *burst* induzido pela fagocitose não foram significantemente diferentes entre si. As **figuras 57** e **58** mostram as direções das diferenças encontradas.

Tabela 28 - Atividade de neutrófilos sangüíneos de camundongos C57BL/6 que passaram ou não, pela separação materna, observados aos 45 dias de vida.

Parâmetros[A]	Controle	S. Materna
***Burst* Basal**	17,75 ± 3,34	14,75 ± 2,48
***Burst* SAPI**	18,70 ± 3,15	16,66 ± 2,67
***Burst* PMA**	17,25 ± 3,04	22,37 ± 4,05*
% fagocitose	87,45 ± 4,18	91,85 ± 2,23*
Int. fagocitose	28,28 ± 3,90	37,76 ± 3,22**

Os dados representam a intensidade média de fluorescência (media±desvio padrão), correspondente ao *gate* da população de neutrófilos sangüíneos. *p<0,05 e ** p<0,001 em relação ao grupo controle, dentro do mesmo parâmetro, teste "t"de Stundent. n=5 animais/grupo

[A] Porcentagem de Fagocitose: quantos neutrófilos fagocitaram partículas de SAPI. Intensidade de Fagocitose: quantas bactérias foram ingeridas pela população de neutrófilos. Expresso pela intensidade de fluorescência da população de neutrófilos

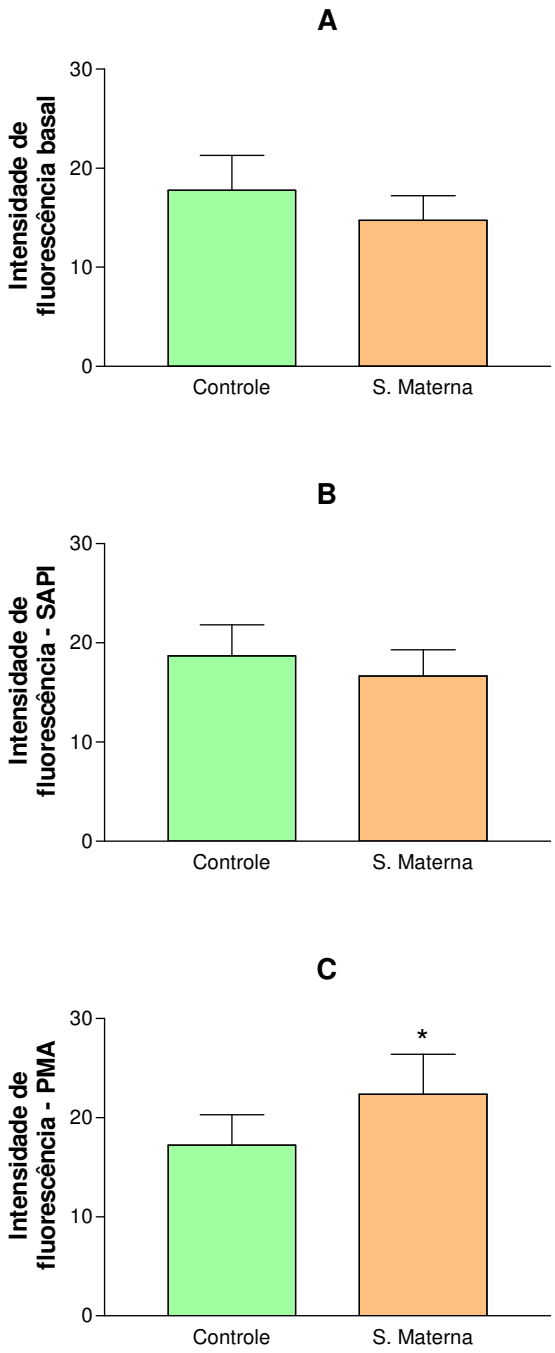


Figura 57 - Efeitos da separação materna sobre a atividade de neutrófilos sangüíneos de camundongos C57BL/6. A – *burst* oxidativo basal, B – *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com SAPI, C – *burst* oxidativo após estímulo *in vitro* com PMA. *p<0,05 em relação ao grupo controle, teste "t" de Student. n=5 animais/grupo

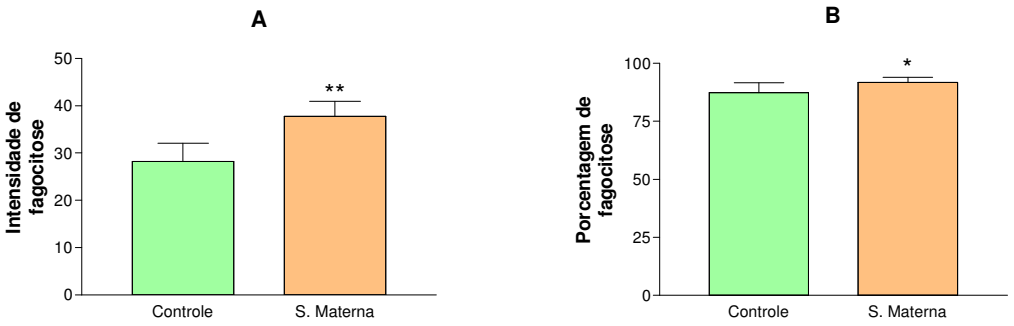


Figura 58 - Efeitos da separação materna sobre a atividade de neutrófilos sangüíneos de camundongos C57BL/6. A – intensidade de fagocitose, B – porcentagem de fagocitose. * $p<0,05$ e ** $p<0,001$ em relação ao grupo controle, teste “t” de Student. n=5 animais/grupo

6. DISCUSSÃO

Analisemos em primeiro lugar as avaliações comportamentais. Os resultados mostraram que camundongos da linhagem A/J que passaram uma hora por dia de separação materna nos 13 primeiros dias de vida não apresentaram alterações comportamentais, aos 45 dias de vida, nos diversos parâmetros avaliados no campo aberto. Em relação às avaliações no labirinto em cruz elevado observou-se nesses animais: 1) diminuição na locomoção total na arena; 2) diminuição na velocidade média na arena; 3) aumento de movimento de *risk assesment.*

No contexto da presente discussão, é importante ressaltar que a avaliação comportamental dos animais foi realizada em uma sala fracamente iluminada e sem ruído, e que os dados foram adquiridos por meio de uma câmera de vídeo instalada dentro da sala. Desta forma, a presença do observador não interferiu com a manifestação do comportamento dos animais. Neste sentido, infere-se a existência de níveis elevados de emocionalidade ou ansiedade no campo aberto pela preferência dos animais em mover-se nas áreas externa e tigmotáxica (próximo às paredes) do aparelho (BARNETT, 1958; GROSSEN & KELLEY, 1972) e/ou pela diminuição de atividade exploratória (BERNARDI & PALERMO-NETO, 1983; LISTER, 1987).

O nível de ansiedade dos animais no labirinto em cruz elevado, por sua vez, pode ser operacionalmente inferido como proposto por PELLOW et al. (1985), isto é, como uma resposta a uma situação na qual o comportamento é influenciado por duas forças motivacionais opostas – a curiosidade natural dos animais pela exploração de lugares novos e a aversão dos mesmos por locais

abertos. Animais mais “ansiosos” tendem a explorar mais os braços fechados, evitando os abertos.

Diversos trabalhos encontrados na literatura têm mostrado informações contraditórias sobre os efeitos da separação materna em parâmetros comportamentais avaliados no campo aberto e no labirinto em cruz elevado (LEHMANN et al., 1999, WIGGER & NEUMANN, 1999, PENKE et al., 2001, ROMEO et al., 2003, SLOTTEN et al., 2006, MILLSTEIN & HOLMES, 2007). Quer nos parecer que, a variedade dessas informações esteja relacionada a diferenças metodológicas e a fatores genéticos. Em um estudo realizado com ratos, NEUMANN e colaboradores (2005) mostraram existência de diferenças no nível basal de comportamento ansioso entre linhagens. Neste mesmo sentido, estudos prévios monstraram que certas linhagens de camundongos diferem, comportamentalmente, umas das outras em testes relacionados à ansiedade e à depressão e, também que apresentam diferenças quanto à sensibilidade aos efeitos de diversos estressores (CLEMENT et al., 2002, HOLMES et al., 2005).

Um trabalho conduzido por van GAALEN & STECKLER (2000) teve como objetivo avaliar diversos parâmetros comportamentais, de quatro linhagens diferentes de camundongos, em testes de ansiedade. As linhagens testadas foram C57BL/6ChR, C57BL/6J, Swiss Webster/J e A/J; as avaliações foram realizadas no labirinto em cruz elevado, na caixa claro/escuro, na exploração de um objeto novo no campo aberto, no *hole board*, e em condição de medo condicionado. Assim, foi demonstrado que a linhagem A/J, comparada com as demais linhagens, apresentou os maiores níveis de ansiedade. Pelo exposto, podemos sugerir que os resultados comportamentais apresentados neste

trabalho possam ter sido influenciados pelos níveis basais de ansiedade da linhagem estudada.

Desta forma, devido a essa particularidade dos camundongos A/J, pareceu-nos relevante acrescentar um novo desafio estressor, aplicado agora na fase adulta, para tentar exacerbar eventuais diferenças existentes entre os grupos.

Os dados de campo aberto provenientes do experimento em que se realizou um estresse por contenção, nos camundongos que passaram pela separação materna revelaram nesses animais: 1) aumento no tempo de permanência na região central; 2) aumento de locomoção na região periférica; 3) aumento na locomoção total na arena; 4) diminuição na freqüência do comportamento de *grooming*; 5) diminuição no tempo em *grooming*. Com relação aos dados obtidos no labirinto em cruz elevado observamos nos mesmos: 1) aumento na porcentagem de entradas nos braços abertos; 2) diminuição na locomoção total na arena; 3) aumento no tempo em *freezing*; 4) diminuição na freqüência do comportamento de *grooming*; 5) diminuição no tempo em *grooming*.

A técnica de imobilização já é bem conhecida como um bom modelo de indução de estresse, sendo que 15 minutos de imobilização já são suficientes para aumentar os níveis de corticosterona que atingem um pico máximo de concentração uma hora após o início da imobilização (DONG et al., 2004, TAHERA et al., 2006). Porém, apesar de o estresse por imobilização ser um bom desafio estressor, mais uma vez, não observamos diferenças consistentes na linhagem A/J com relação aos comportamentos indicativos de ansiedade e avaliados no campo aberto e no labirinto em cruz elevado. Estes resultados

sugerem que, apesar do desafio, o comportamento ansioso basal, a baixa atividade locomotora e, quiçá uma alta atividade do eixo HPA (van GAALEN & STECKLER, 2000) presentes nos camundongos A/J, poderiam ter influenciado os parâmetros comportamentais avaliados em nosso trabalho.

Analisemos agora a atividade neuroimune dos animais submetidos à separação materna. O eixo HPA é um dos mais importantes sistemas de integração do organismo, sendo ativado em resposta a estímulos estressores ou distúrbios homeostáticos (MC EWEN, 1998; MC EWEN, 2000 a,b), resultando em elevação dos níveis de corticosterona no plasma (AXELROD & REISINE, 1984). Sabe-se que essas alterações podem levar a prejuízos na imunidade (ELENKOV, et al., 2000; RIGHI & PALERMO-NETO, 2003; LIGEIRO DE OLIVEIRA et al., 2004, ALVES, et al., 2006). Desta forma, pareceu-nos relevante estudar, também, as relações neuroimunes induzidas pela separação materna.

Com relação ao eixo HPA, sabe-se que existe uma fase chamada de "período hiporesponssivo ao stress", que abrange as duas primeiras semanas de vida dos roedores; esse período é considerado crítico para a maturação do eixo HPA (WIGGER & NEUMANN, 1991; ROMAN, et al., 2006; SCHMIDT, et al., 2006; AISA, et al., 2007). Em especial, ele é caracterizado por uma baixa responsividade do sistema adrenocortical aos diversos estressores, causado provavelmente e em parte, pela redução de sensibilidade das adrenais ao hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), em decorrência a uma amplificação do *feedback* negativo da corticosterona (SAPOLSKY, et al., 1986; WALKER, et al., 1986; SCHIMIDT, et al., 2005; WIGGER & NEUMANN, 1991; SCHMIDT, et al., 2006). Durante este período hiporesponssivo, o cuidado materno é o principal

fator ambiental regulador da atividade adrenocortical (LEVINE, 2002). Assim, por exemplo, mostrou-se que a manipulação pós natal (separação rápida e diária da mãe) aumenta a performance materna (EKLUND & ARBORELIUS, 2006; SLOTTEN, et al., 2006) reduzindo, provavelmente, o comportamento ansioso dos filhotes em idades pós natais (WIGGER & NEUMANN, 1991; SLOTTEN, et al., 2006). Paralelamente a estes resultados, observou-se uma variedade de mudanças fisiológicas persistentes causadas nos filhotes pela manipulação pós natal; dentre elas, mostrou-se uma atenuação de respostas mediadas pelo ACTH e pela corticosterona a estressores agudos aplicados na fase adulta (REES; STEINER; FLEMING, 2006; AISA, et al., 2007). Da mesma maneira, durante o período de hiporesponssivedade do eixo HPA, observou-se uma redução da expressão do mRNA para o hormônio liberador de corticotropina (CRH) em tecidos hipotalâmicos e naqueles do núcleo paraventricular (AVISHAI-ELINER, et al., 1995; DIRKS, et al., 2002; SCHMIDT, et al., 2006), aumento da expressão de mRNA de neuropeptídeo Y no núcleo arqueado, aumento da densidade de receptores para glucocorticoides no hipocampo (WIGGER & NEUMANN, 1991), aumento de ACTH (SCHMIDT, et al., 2002) e aumento dos níveis de corticosterona sérica (SCHMIDT, et al., 2006). Essas ocorrências, em seu conjunto, levam a um aumento do *feedback* negativo do eixo HPA, resultando numa *downregulation* deste mesmo eixo no animal em desenvolvimento.

Por tudo quanto exposto, parece-nos possível inferir que nossos resultados, quanto às análises de corticosterona sérica, seriam decorrentes de uma adaptação na regulação do eixo HPA dos filhotes, via aumento de *feedback* negativo deste mesmo eixo. Por outro lado, não se pode deixar de

esquecer que esses resultados também poderiam ser conseqüentes e/ou estar sujeitos a diversas influencias, como por exemplo, do cuidado materno, da idade em que a prole foi analisada e da espécie animal estudada (EKLUND & ARBORELIUS, 2006; REES; STEINER; FLEMING, 2006).

Em relação aos dados obtidos quando da análise neuroquímica realizada aos 45 dias de vida, observamos ausência de diferenças significantes em relação aos neurotransmissores e seus metabólitos no hipotálamo. Já no estriado, observamos: aumento no *turnover* de dopamina e aumento nos níveis de serotonina e seu metabólito 5-HIAA. Em relação aos dados obtidos do córtex pré-frontal, apenas observamos diminuição nos níveis do metabólito dopaminérgico DOPAC.

Diversos trabalhos têm estudado os efeitos da separação materna em parâmetros neuroquímicos de ratos. Em linhas gerais relatou-se: aumento de dopamina no estriado, diminuição no *turnover* dopaminérgico no córtex pré-frontal, aumento de noradrenalina no hipocampo, diminuição de serotonina no hipocampo e córtex pré-frontal e diminuição de seu *turnover* no hipocampo, diminuição de serotonina na rafe medial (MATTHEWS et al., 2001; LEE et al., 2007). Porem as respostas neuroquímicas à separação materna são dependentes do tempo de separação, das condições ambientais, da idade em que se fez a avaliação e do tipo e da linhagem estudada (MATTHEWS et al., 2001; BHANSALI et al., 2007).

Vale ressaltar que o período em que os animais passaram pela separação materna é um período de maturação cerebral onde há uma grande vulnerabilidade a desafios ambientais que podem desencadear diferentes

graus de adaptação plastica neural (WIGGER & NEUMANN, 1991; YAP et al., 2006; COE & LUBACH, 2007).

Foi interessante notar que apesar de observarmos um aumento no *turnover* de dopamina no estriado, não verificamos um aumento de atividade locomotora dos animais. Provavelmente o aumento dos níveis de serotonina no estriado tenha inibido essa ação motora da dopamina, explicando assim os dados obtidos no campo aberto e no labirinto em cruz elevado. Sabe-se que um dos moduladores de comportamentos em situações de aproximação/excitação é o sistema serotonérgico. De fato, há muito tempo tem se relacionado o aumento da atividade serotonérgica no SNC com diminuição da impulsividade (PALERMO-NETO, 1971; GRAEFF, 2003).

Existem diversas contradições nos estudos que analisam o envolvimento do sistema serotonérgico com os níveis de ansiedade. Estudos embasados em teste de conflito ou punição mostraram inibição da síntese de serotonina (GRAEFF e DEACKIN, 1991). Como os testes de conflito são encarados como modelo de ansiedade, estes resultados indicam que a serotonina aumentaria os níveis de ansiedade. Entretanto, em outros modelos animais de ansiedade, por exemplo, naquela em que se faz estimulação elétrica nas patas, a própria serotonina e outros agonistas de receptores serotonérgicos atenuaram a fuga induzida por esta estimulação. Portanto, neste caso a serotonina diminuiria a ansiedade. Porem, em 1991, GRAEFF e DEACKIN propuseram que cada uma dessas reações envolveriam níveis de emocionalidade diferentes.

Estas proposições foram baseadas na análise crítica do modelo dos três níveis de defesa, elaborado pelo casal Blanchard. O primeiro nível de defesa seria induzido por uma ameaça potencial; o segundo nível, por uma ameaça

presente, porém distante; o terceiro, por uma ameaça muito próxima (GRAEFF, 2003). No primeiro caso a reação de defesa seria uma exploração cautelosa. No segundo nível verifica-se uma inibição comportamental resultando, esse fato, em uma imobilidade tensa. Finalmente, no terceiro nível de defesa a reação é de luta ou de fuga (GRAEFF, 2003).

Assim, a serotonina estaria envolvida como facilitadora de defesas potencial ou distal e inibiria a defesa proximal. Em nosso caso, provavelmente o nível de emocionalidade estaria relacionada ao medo distal levando a uma inibição da função dopaminérgica estriatal, resultando então em imobilidade, que foi relatada neste trabalho

Quanto à atividade de neutrófilos sanguíneos avaliados por citometria de fluxo, os camundongos A/J que passaram pela separação materna apresentaram aos 45 dias de vida: 1) diminuição no *burst* basal; 2) aumento no *burst* induzido pela fagocitose; 3) diminuição no *burst* induzido por PMA. Já os parâmetros relacionados à intensidade e porcentagem de fagocitose dos animais separados ou não de suas mães não mostraram diferenças significantes entre si.

Em relação à atividade de macrófagos alveolares, os camundongos A/J que passaram pela separação materna apresentaram: aumento no *burst* basal e aumento no *burst* induzido pela fagocitose.

Alguns trabalhos têm demonstrado ser o estresse neonatal capaz de alterar a resposta imune e as respostas a infecções parasitárias. Um trabalho conduzido por BARREAU e colaboradores (2006) mostrou em ratos que os animais que passaram pela separação materna tiveram maior susceptibilidade a uma infecção experimental por *Nippostrongylus brasiliensis*, tendo-se

observado facilitação da infecção primária a este parasita e aumento da resposta inflamatória na região do jejuno. Outro trabalho, também realizado com ratos, valeu-se da indução experimental de encefalomielite autoimune, tendo demonstrado um aumento na severidade dos sintomas da doença e uma diminuição na função de macrófagos nos animais submetidos à separação materna (TEUNIS et al., 2002). Trabalhos realizados com suínos demonstraram que a separação materna pode aumentar os níveis de corticosterona, diminuir a proliferação de linfócitos induzida por concanavalina A e diminuir a resposta de TNF-α a um desafio com LPS (KANITZ et al., 2004, TUCHSCHERER et al., 2004). Também já foi demonstrado, em macacos *Rhesus*, que a separação materna suprimiu a atividade de linfócitos T e aumentou o número e a atividade de células *natural killers* (LEWIS et al., 1999). Outro trabalho realizado por COE e colaboradores, citado por COE e LUBACH (2007), também com macacos *Rhesus* mostrou que a separação materna diminuiu a atividade de células NK e diminuiu as respostas às vacinações; os animais separados das mães apresentam, ainda, um maior número de células CD4+ e um menor número de células CD8+. Portanto, pelo exposto, podemos observar que os dados referentes a resposta imune e separação materna, também se mostram contraditórios.

Mais uma vez, pareceu-nos relevante tentar exarcebar os efeitos imunes da separação materna com um desafio estressor. Os camundongos A/J de nosso trabalho que passaram pela separação materna e que foram desafiados pelo estresse por imobilização, mostraram os seguintes resultados: aumento no *burst* basal e aumento no *burst* induzido por PMA. Os demais parâmetros não apresentaram diferenças significativas, mostrando então que o desafio

estressor não foi capaz de exarcebar os efeitos do estresse por separação materna.

Ainda com relação ao desafio estressor, trabalhos sugerem que um estresse pré-natal, por exemplo, pode modificar a responsividade imune dos animais a outro tipo de estresse (POLTYREV & WEINSTOCK, 1997, WEINSTOCK et al., 1998). Portanto, é possível sugerir que as alterações encontradas após o desafio pelo estresse por imobilização, possam estar relacionadas a mecanismos compensatórios gerados pelos neutrófilos para contrapor-se às alterações produzidas pelo estresse de separação materna.

Vale lembrar a participação de outro eixo neuroimune muito importante, o SNA. O SNS está relacionado às respostas de “ataque ou fuga”, que medeiam uma imediata regulação cardiovascular, respiratória e funções metabólicas durante esses períodos críticos. Portanto, é de se esperar que o sistema imune esteja sob regulação do SNS via liberação de noradrenalina a partir dos terminais nervosos e de adrenalina pela medula da adrenal (QIU et al., 2005; SANDERS; KAVELARS, 2007). Por outro lado, alguns trabalhos já monstraram que uma estimulação elétrica do nervo vago reduziu a concentração de TNF-α e de citocinas pró-inflamatórias durante uma endotoxemia sem interferir com a concentração de citocinas anti-inflamatórias, mostrando assim a participação do SNP (BORIKOVA et al., 2000; PAVLOV et al., 2006).

Quanto aos macrófagos alveolares, sabe-se que eles possuem receptores para catecolaminas e sabe-se que sua função pode ser modificada por catecolaminas e agonistas adrenérgicos (MADEN & LIVNAT, 1991). Portanto, pode-se sugerir que as alterações encontradas na atividade de macrófagos

possam ter sido induzidas pelo estresse via ativação do eixo HPA ou do SNA simpático, isto é, através da liberação de corticosterona e/ou de catecolaminas.

Com relação aos diversos estímulos utilizados, pode-se verificar que as células dos camundongos analisados nesse trabalho, responderam de forma diversa, dependendo do estímulo aplicado. A fagocitose, por exemplo, é um fenômeno complexo que se inicia pela ligação da partícula a ser fagocitada a receptores específicos presentes na superfície da célula imune; é um processo ativo induzido, entre outros, por produtos bacterianos ou tumorais e um processo em que as citocinas desempenham um papel importante (FIDLER, 1985, KELLER et al., 1990). De qualquer forma, mais uma vez supõe-se que os resultados por nós obtidos possam ter sido influenciados pelas características do sistema imune da linhagem já que a linhagem A/J é uma linhagem usualmente utilizada para estudos de carcinogênese. Apesar de termos observado uma resposta das células dos camundongos A/J ao DCFH, quando avaliado o *burst* oxidativo, não observamos essa mesma resposta quando avaliamos a fagocitose. Acreditamos que isso se deva ao fato de ter a linhagem A/J um sistema imune pouco responsivo a diversos estímulos como, por exemplo, à fitohemaglutinina (HEINIGER et al., 1972, HEINIGER et al., 1975).

Com relação aos parâmetros hematológicos, obtidos aos 45 dias de vida, como: contagem de leucócitos, contagem de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito, não foram encontradas quaisquer diferenças significantes entre os grupos estudados. Mais uma vez, esse resultado dever-se-ia provavelmente ao fato de se analisar os efeitos de um estresse psicogênico realizado no começo da vida do animal, que teria ao longo de sua vida amplas condições para

buscar e conseguir novamente a homeostasia. Esta hipótese já foi sugerida anteriormente por LAWRENCE & KIM (2000).

Outro ponto estudado em relação à imunidade dos animais foi aquele que avaliou a influência da separação à indução da carcinogênese.

Sabe-se que existe uma correlação entre uma vida com experiências estressantes e o desenvolvimento de determinados tipos de câncer (REICHE; NUNES; MORIMOTO, 2004). Neste contexto, um possível modelo causal para as relações entre estresse, depressão e carcinomas segue o seguinte raciocínio: o estresse aumentaria a expressão de interleucinas (IL) 1, IL-6 e TNFα liberadas por macrófagos e monócitos, reduzindo a expressão de IL-2, *interferon* γ e moléculas MHC classe-II; produzindo uma *downregulation* de IL-2 e redução da atividade de células NK. Muitos carcinomas estão associados a uma alta concentração de TNFα que inibe a atividade da tirosina fosfatase, resultando assim, em uma diminuição da expressão de moléculas MHC classe-I, permitindo desta maneira, que células com alguma malignidade “escapem” de uma ação imune. Desta forma, o estresse e a depressão poderiam colaborar com a progressão tumoral através de uma inibição da expressão de moléculas MHC classe-I e classe-II e/ou diminuindo a atividade de células NK (REICHE; NUNES; MORIMOTO, 2004).

Para analisar os efeitos da separação materna sobre o crecimento tumoral, utilizamos no presente trabalho um modelo bem conhecido de carcinogênese química, aquela que se vale do NNK que é um dos mais importantes carcinógenos presente na fumaça do tabaco (HECHT, et al., 1989).

Em relação à análise comportamental realizada após o desenvolvimento tumoral, nossos resultados obtidos no campo aberto mostraram que a

separação materna não modificou o comportamento dos animais. Curiosamente, o fator que produziu as diferenças encontradas foi o desenvolvimento tumoral (independente de terem os animais passado ou não pela separação materna). Especificamente observamos no campo aberto: aumento de locomoção total na arena, na região periférica e na região central, maior tempo de permanência na zona externa e média e diminuição no tempo de permanência na zona tigmotáxica. Já no labirinto em cruz elevado, observamos que a separação materna foi um fator que influenciou os resultados para dois parâmetros: aumento de locomoção total na arena e aumento de tempo de movimento na arena.

Com relação aos dados provenientes dos testes imunológicos, observamos que o fator separação materna influenciou as diferenças encontradas, independentemente da indução da carcinogênse.

Para a atividade de neutrófilos, analisada por citometria de fluxo, verificamos que a separação materna aumentou a intensidade e a porcentagem de fagocitose e diminuiu o *burst* induzido por PMA. Já com relação ao burst basal produzido por neutrófilos, apenas a carcinogênse atuou como fator modificador, ou seja, os neutrófilos dos animais que receberam o carcinógeno apresentaram uma diminuição no seu *burst* basal. O *burst* de neutrófilos induzido pela fagocitose não apresentou diferenças significantes entre os grupos.

Com relação à atividade de macrófagos alveolares, a separação materna produziu um aumento no *burst* basal e no *burst* induzido pela fagocitose. Já os animais que não passaram pela separação materna e que receberam o carcinógeno, apresentaram maior intensidade e porcentagem de fagocitose

realizada pelos macrófagos alveolares. Quanto à análise da produção de NO pelos macrófagos alveolares, não foram observados diferenças significantes entre os grupos.

Tomados os dados imunológicos em seu conjunto, observamos nesses resultados que a carcinogênese atuou como um desafio imunológico podendo-se sugerir, portanto, que as alterações encontradas após este desafio possam estar relacionadas a mecanismos compensatórios gerados pelos neutrófilos e macrófagos e/ou por adaptações de atividade do eixo HPA, como já mencionado anteriormente.

Quanto aos dados relativos à análise macro e microscópica dos pulmões acometidos pelo tumor, verificamos, mais uma vez, que o fator separação materna não foi capaz de influenciar esses resultados. O que observamos foi que o modelo de indução tumoral foi realmente eficiente, já que 100% dos animais que receberam o carcinógeno desenvolveram o tumor e apresentaram até dez vezes mais lesões pulmonares que os animais que receberam solução salina. Vale ressaltar mais uma vez que a linhagem A/J é uma linhagem usualmente utilizada para estudos de carcinogênese por apresentar um sistema imune pouco responsivo a diversos estímulos e uma maior propensão a desenvolver, mesmo que espontaneamente, tumores nos pulmões (HEINIGER et al., 1972, HEINIGER et al., 1975). Estes fatos explicariam o porquê de alguns animais que receberam solução salina também desenvolveram tumores nos pulmões.

Outro fato observado que nos pareceu bastante relevante apesar de não ser o objetivo central do trabalho foi a forma silenciosa de como esse tipo de tumor progridiu. Sabe-se que em diversas situações em que o sistema imune

responde com liberação de citocinas como, por exemplo, na vigência de processos inflamatórios e, até mesmo, tumorais observa-se o aparecimento do chamado “comportamento doentio”. Esse tipo de comportamento pode ser observado, por exemplo, após a injeção de IL-1 ou de um lipopolissacarídeo de *E. coli* (LPS) onde se verifica além de febre e anorexia, uma redução da atividade exploratória e da interação social (KELLEY et al., 2003; COHN; SÁ-ROCHA, 2006).

Sabemos que a produção e liberação de citocinas provoca uma resposta endócrina desencadeada pela ação direta e/ou indireta destas no SNC. As citocinas, de um modo geral, são mediadores solúveis produzidos por células imunes ativadas que servem de comunicação célula a célula no sistema imune. Porém, essas mesmas proteínas também atuam como mensageiras entre o sistema imune e células do SNC. Durante o curso de uma infecção e uma inflamação, a liberação de citocinas na periferia pode ter ações no sistema neuroendócrino e, no comportamento (DANTZER, 2007).

Era de se esperar que com o desenvolvimento dos tumores nos pulmões pudéssemos observar algumas alterações comportamentais relacionadas ao comportamento doentio, fato este que não ocorreu. Talvez esse não aparecimento de um comportamento doentio se deva ao fato de não termos observado, nos cortes histológicos, sítios de resposta inflamatória ao redor dos adenomas e nem alteração no número de macrófagos alveolares. A inexistência de um processo inflamatório e, a conseqüente não liberação de citocinas teria sido, assim, determinante para a falta de alterações comportamentais agora relatadas.

Já é de conhecimento comum que os tumores pulmonares são de progressão lenta e silenciosa e que a maioria dos pacientes só apresentam sintomas quando a doença se encontra em estágio bastante avançado (GOMEZ; SILVESTRI, 2008). Então, traçando um paralelo entre esses dados de progressão de tumores pulmonares em humanos e o modelo utilizado neste trabalho, que envolve um carcinógeno encontrado no cigarro, pode-se dizer que que uma breve exposição a um potente carcinógeno no começo da vida, pode ser suficiente para desencadear a progressão dos tumores na fase adulta. E estes, por apresentaram uma manifestação silenciosa, só serão detectados após o decorrer de um longo período da exposição e quando estiverem em estágios muito avançados, tendo assim um prognóstico muito desfavorável.

Outro fato relevante a discutir é aquele que sugere serem os tumores induzidos por carcinógenos químicos pouco afetados por fatores psicológicos, comportamentais e imunológicos, em comparação a tumores associados com infecção viral (como o modelo de Epstein Barr vírus) e a implante de células tumorais (como o tumor ascítico de Ehrlich). Os fatores psicológicos têm se monstrado capaz de interferir mais com a progressão tumoral do que com a iniciação tumoral (REICHE; NUNES; MORIMOTO, 2004). Pelo exposto, podemos então verificar que o modelo de indução de estresse por separação materna não foi capaz de influenciar a progressão tumoral.

Outro resultado interessante foi aquele obtido com o hemograma realizado após a carcinogênese. Todos os parâmetros mostraram-se inalterados, a não ser o hematócrito dos animais que passaram pela separação materna que estava aumentado. Considerando-se a carcinogênese como um

desafio, podemos inferir que talvez a manipulação no momento da coleta de sangue, possa ter agido como um novo fator estressor levando a uma policitemia transitória.

Sabe-se que uma policitemia transitória é encontrada após contração esplênica induzida pelo estresse, com conseqüente liberação de eritrócitos para a circulação sanguínea. Esse fato, que poderia ter ocorrido no presente experimento, dura em torno de uma hora e pode ser observado em animais estressados e/ou ansiosos (REBAR, 2003).

Devido aos fatos comentados para a linhagem A/J e, para melhor entende-los, pareceu-nos relevante realizar um experimento utilizando outra linhagem de camundongos. Para tanto, escolhemos animais da linhagem C57BL/6 por saber que eles apresentam baixos níveis basais de ansiedade e bom desempenho em testes comportamentais (van GAALEN & STECKLER, 2000).

Neste experimento, pode-se verificar no campo aberto em camundongos que passaram pela separação materna,: 1) menor tempo de permanência na região central; 2) maior tempo de permanência na região periférica; 3) maior locomoção na região periférica; 4) maior locomoção total na arena; 5) maior tempo em movimento na arena; 6) aumento da velocidade média. No labirinto em cruz elevado observaram-se: 1) maior locomoção total na arena; 2) menor tempo em *grooming*; 3) acentuada tendência de diminuição na porcentagem de tempo nos braços abertos; 4) acentuada tendência de aumento na porcentagem de entradas nos braços fechados. Quanto a atividade de neutrófilos sangüíneos obteve-se: 1) acentuada tendência de diminuição no *burst* basal; 2) acentuada tendência de diminuição no *burst* induzido por

fagocitose; 3) aumento no *burst* induzido por PMA; 4) aumento na intensidade de fagocitose; 5) aumento na porcentagem de fagocitose.

Os resultados comportamentais apresentados para essa linhagem concordam com um trabalho realizado por ROMEO e colaboradores (2003). De fato, os camundongos que passaram pela separação materna apresentaram maior comportamento ansioso na fase adulta, como mensurado através do campo aberto e no labirinto em cruz elevado.

Para os animais C57BL/6 realizou-se a coleta de material para análise de corticosterona sérica e neuroquímica e estamos aguardando os resultados desses experimentos.

Em relação aos dados imunológicos, sugere-se um incremento na função neutrofílica. Desta forma, pode-se verificar que sob algumas condições o estresse possa melhorar a imunidade celular *in vivo*, enquanto que sob outras condições o estresse suprime essa função imune. (DHABHAR & McEWEN, 1997). Essas condições podem estar relacionadas a uma adaptação evolutiva de vias neuroimunes, que aumentariam a resposta imune durante períodos de estresse (DHABHAR et al., 1995, DHABHAR et al., 1996).

Estresses diferentes (físicos e psicogênicos) mudam de forma também diferenciada atividades dos eixos HPA e SNAS (DHABHAR & McEWEN, 1997). Como estes sistemas modificam a síntese e/ou liberação de citocinas (VISSER, et al., 1998, ELENKOV & CHROUSOS, 2002, ELENKOV, 2004, VIVEROS-PAREDES et al., 2006) e como estas podem ser compreendidas como fazendo parte do eixo Th1 e Th2 é possível sugerir que o estresse por separação materna possa ter ativado diferencialmente esses dois sistemas. No caso dos camundongos C57BL/6, poderia ter ocorrido um aumento de atividade das

citocinas pró-inflamatórias como IL-12, TNF-α e IFN-γ. O estresse induz aumento de liberação de hormônio liberador de corticotropina aumentando, assim, a liberação sistêmica de glicocorticoides e de catecolaminas, principalmente epinefrina e norepinefrina, que podem levar a um desbalanço da resposta Th1 e Th2 (ELENKOV & CHROUSOS, 2002, ELENKOV, 2004.

De qualquer maneira, analisando a separação materna como um todo, MILLSTEIN & HOLMES (2007) sugerem ser ela um modelo de estresse neonatal que não produz alterações consistentes nos animais. Esses autores realizaram um interessante trabalho onde foram analisados os efeitos da separação materna em oito linhagens de camundongos. Em paralelo, eles analisaram, também, o comportamento materno das mães. Desta forma, e como já se disse, em todas as linhagens estudadas, a separação materna produziu um aumento no comportamento materno, mensurado pelo tempo gasto em reunir os filhotes novamente ao ninho.

Tomados em seu conjunto, nossos resultados sugerem que a separação materna tenha produzido alterações na atividade neuroimune dos animais (ora aumentando determinados parâmetros, ora diminuindo outros), evidenciadas por dados comportamentais (ansiedade) e de imunidade inata; essas alterações poderiam estar relacionadas com possíveis adaptações da atividade do eixo HPA, evidenciada pela diminuição dos níveis séricos de corticosterona nos camundongos A/J. Mais especificamente, os presentes resultados sugerem que as alterações comportamentais relatadas estejam relacionadas a um aumento dos níveis estriatais de serotonina enquanto que aquelas ligadas à imunidade inata, a uma *downregulation* da atividade do eixo HPA.

Finalmente, foi possível verificar, através do modelo de carcinogênese utilizado, que tumores pulmonares teriam uma progressão lenta e silenciosa, chamando esse fato a atenção para a importância de dados epidemiológicos e preventivos relacionados à exposição a carcinógenos químicos.

7. CONCLUSÕES

7.1. Específicas

Em camundongos A/J, a separação materna:

- Não produziu alterações comportamentais significantes no campo aberto. No labirinto em cruz elevado ela produziu: diminuição na locomoção total na arena; diminuição na velocidade média na arena; aumento na freqüência de *risk assesment*.

- Seguida por um estresse por contenção na fase adulta, ela produziu no campo aberto: aumento no tempo de permanência na região central; aumento na locomoção na região periférica; aumento na locomoção total na arena; diminuição na freqüência e no tempo gasto em *grooming*. No labirinto em cruz elevado: aumento na porcentagem de entradas nos braços abertos; diminuição na locomoção total na arena; aumento do tempo gasto em *freezing*; diminuição na freqüência e no tempo gasto em *grooming*.

- Em relação a atividade de neutrófilos sangüíneos, ela produziu: diminuição no *burst* basal; aumento no *burst* induzido pela fagocitose; diminuição no *burst* induzido por PMA. Quanto à atividade de macrófagos alveolares, produziu: aumento no *burst* basal; aumento no *burst* induzido pela fagocitose.

- Seguida por um estresse por contenção na fase adulta, em relação a atividade de neutrófilos sangüíneos, avaliada por citometria de fluxo, ela produziu: aumento no *burst* basal; aumento no *burst* induzido por PMA; não alterou o *burst* induzido pela fagocitose, a intensidade de fagocitose e nem na porcentagem de fagocitose.

- Não alterou os parâmetros hematológicos como: número de leucócitos, número de eritrócitos, hemoglobina e hematócrito.

- Aumentou os níveis estriatais de serotonina e de seu metabólito 5-HIAA assim como o *turnover* de dopamina.

- Diminuiu os níveis séricos de corticosterona.

- Não foi capaz de modificar o comportamento dos animais após o crescimento tumoral.

- Após o crescimento tumoral, em relação a atividade de neutrófilos sangüíneos, produziu: uma diminuição no *burst* induzido por PMA e um aumento na porcentagem e intensidade de fagocitose. Quanto à atividade de macrófagos alveolares, produziu: aumento no *burst* basal e induzido por PMA. Não alterou os parâmetros hematológicos.

- Não foi capaz de influenciar no desenvolvimento tumoral.

A separação materna, em camundongos C57BL/6:

- Produziu no campo aberto: diminuição no tempo de permanência na região central; aumento no tempo de permanência na região periférica; aumento na locomoção total na arena; aumento no tempo em movimento na arena; aumento da velocidade média na arena. No labirinto em cruz elevado: aumento na locomoção total na arena; diminição no tempo de *grooming*.
- Em relação à atividade de neutrófilos: aumento no *burst* induzido por PMA; aumento na intensidade de fagocitose; aumento na porcentagem de fagocitose.

7.2. Geral

Tomados em seu conjunto, parece-nos possível afirmar que a separação materna tenha produzido alterações na atividade neuroimune dos animais (ora aumentando determinados parâmetros, ora diminuindo outros), evidenciadas por dados comportamentais (ansiedade) e de imunidade inata; essas alterações poderiam estar relacionadas com possíveis adaptações da atividade do eixo HPA, evidenciada pela diminuição dos níveis séricos de corticosterona nos camundongos A/J. Mais especificamente, os presentes resultados sugerem que as alterações comportamentais relatadas estejam relacionadas a um aumento dos níveis estriatais de serotonina enquanto que aquelas ligadas à imunidade inata, a uma *downregulation* da atividade do eixo HPA.

Verificamos também, que o modelo de indução de estresse agora usado é influenciado pelas características individuais das linhagens. Este fato é

bastante relevante e deve ser analisado com cuidado principalmente quando se vai escolher a linhagem animal para a aplicação de um modelo de estudo.

Finalmente foi possível verificar, através do modelo de carcinogênese utilizado, que tumores pulmonares teriam uma progressão lenta e silenciosa, chamando esse fato a atenção para a importância de dados epidemiológicos e preventivos relevantes à exposição a carcinógenos químicos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACKERMAN, S. H.; KELLER, S. E.; SCHLEIFER, S. J.; SHINDLEDECKER, R. D.; CAMERINO, M.; HOFER, M. A.; WEINER, H.; STEIN, M. Premature maternal separation and lymphocyte function. **Brain, Behavior and Immunology**, v. 2, n. 2, p. 161-165, 1988.

ADER, R. **Psychoneuroimmunology: Fourth Edition**, Elsevier Academic Press, 2007. 703p.

AISA, B.; TORDERA, R.; LASHERAS, B.; DEL RIO, J.; RAMIREZ, M. J. Cognitive impairment associated to HPA axis hyperactivity alter maternal separation in rats. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, p. 256-266, 2007.

ALVES, G.J.; VISMARI, L.; FLORIO, J.C.; PALERMO-NETO, J. Cohabitation with a sick cage mate: Effects on noradrenaline turnover and neutrophil activity. **Neuroscience Research**, v. 2, n. 56, 172-179, 2006.

AVISHAI-ELINER, S.; YI, S.; NEWTH, C. J. L.; BARAM, T. Z. Effects of maternal and sibling deprivation on basal and stress induced hypothalamic-pituitary-adrenal components in infant rat. **Neuroscience Letters**, v. 192, p. 49-52, 1995.

AXELROD, J. & REISINE, TD. Stress hormones: their interaction and regulation. **Science,** Review, May 4;224 (4648): 452-9, 1984.

BANSHALI, P.; DUNNING, J.; SINGER, S. E.; DAVID, L.; SCHMAUS, C. Early life stress alters adult serotonin 2C receptor pre-mRNA editing and expression of the α subunit of the hetertrimeric G-protein Gq. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 6, p. 1467-1473, 2007.

BARNETT, S.A. Exploratory behaviour. **British Journal of Psychology**. v. 49, p.289-310, 1958.

BARREAU, F.; DE LAHITTE, J. D.; FERRIER, L.; FREXINOS, J.; BUENO, L.; FIORAMONTI, J. Neonatal maternal deprivation promotes Nippostrongylus brasiliensis infection in adult rats.**Brain, Behavior and Immunity**, v. 20, n. 3, p. 254-260, 2006.

BASHIR, M. E.; LOUIE, S.; SHI, H. N.; NAGLER-ANDERSON, C. Toll-like receptor 4 signaling by intestinal microbes influences susceptibility to food allergy. **Journal of Immunology**, v. 172, n. 11, p. 6978-6987, 2004.

BASSO AS, COSTA-PINTO FA, BRITTO LR, DE SA-ROCHA LC, PALERMO-NETO J. Neural pathways involved in food allergy signaling in the mouse brain: role of capsaicin-sensitive afferents. **Brain Research**, v. 1009, n. 1-2, p. 181-188, 2004.

BASSO AS, PINTO FA, RUSSO M, BRITTO LR, DE SA-ROCHA LC, PALERMO NETO J. Neural correlates of IgE-mediated food allergy. **Journal of Neuroimmunology**, v. 140, n. 1-2, p. 69-77, 2003.

BERNARDI, M. M.; PALERMO-NETO, J. Effects of apomorphine administration on locomotor activity of control and experimental rats withdrawn from long-term haloperidol treatment. **General Pharmacology**, v. 14, n. 5, p. 545-547, 1983.

BIRGEL, E. H. **Patologia clínica veterinária**, São Paulo: Sociedade Paulista de Medicina Veterinária, 1982. 260p.

BLALOCK, J. E.; SMITH, E. M. **Procceding of National Academy of Science USA**, v. 77, p. 5972-5974, 1980.

BLALOCK, J. E. The syntax of immune-neuroendocrine communication. **Immunology Today**, v. 15, n. 11, p. 504-510, 1994.

BOROVIKOVA, L.V.; IVANOVA, S.; ZHANG, M.; YANG, H.; BOTCHKINA, G. L.; WATKINS, L. R.; WANG, H.; ABUMRAD, N.; EATON, J. W.; TRACEY, K. J. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. **Nature**, v. 405, n. 6785, p. 458-462, 2000.

CAO, L.; LAWRENCE, D. A. Supression of host resistence to *Listeria monocytogenes* by acute cold/restrain stress. **Journal of Neuroimmunology**, v, 133, n.1-2, p. 132-143, 2002.

CAVAILLON, J. M. Cytokines and macrophages. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 48, p. 445-453, 1994.

CLEMENT, Y.; CALATAYUD, F.; BELZUNG, C. Genetic basis of anxiety-like behavior: a critical review. **Brain Research Bulletin**, v. 57, p. 57-71, 2002.

COE, C. L.; LUBACH, G. R. Mother-infant interactions and the development of immunity from conception through weaning In: ADER, R. **Psychoneuroimmunology: Fourth Edition**, Elsevier Academic Press, p. 455-474, 2007.

COHEN, S.; HERBERT, T. B. Health psychology: Psychological factors and physical disease from the perspective of human psychoneuroimmunology. **Annual Reviews of Psychology**, v. 47, p. 113-142, 1996.

COHN, D. W.; DE SÁ-ROCHA, L. C. Differential effects of lipopolysaccharide in the social behavior of dominant and submissive mice. **Physiological Behavior,** v. 87, n. 5, p. 932-937, 2006.

COSTA, E. C. R. **Neuroimunomodulação: efeitos da morfina sobre o comportamento e a atividade de macrófagos.** 2004. f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

COSTA-PINTO, F. A.; BASSO, A. S.; BRITTO, L. R.; MALUCELLI, B. E.; RUSSO, M. Avoidance behavior and neural correlates of allergen exposure in a murine model of asthma. **Brain Behavior and Immunity**, v. 19, n. 1, p. 52-60, 2005.

CONTI, A. Oncology in neuroimmunomodulation: what progress has been made? **Annals New York Academy of Science**, v. 917, p. 68-83, 2000.

DANTZER, R. Cytokine, sickness behavior, and depression. **Neurologic Clinics**, v. 24, n. 3, p. 441-460, 2006.

DHABHAR, F. S.; McEWEN, B. S. Acute stress enhances while cronic stress suppresses cell-mediated immunity *in vivo*: a potential role for leukocyte trafficking. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 11, p. 286-306, 1997.

DHABHAR, F. S.; MILLER, A. H.; McEWEN, B. S.; SPENCER, R. L. Differential activation of adrenal steroid receptors in neural and immune tissues of Sprague

dawley, Fischer 344, and Lewis rats. **Journal of Neuroimmunology**, v. 56, p. 77-90, 1995.

DHABHAR, F. S.; MILLER, A. H.; McEWEN, B. S.; SPENCER, R. L. Stress-induced changes in blood leukocyte distribution: role of adrenal steroid hormones. **Journal of Neuroimmunology,** v. 157, p. 1638-1644, 1996.

DIRKS, A.; FISH, E. W.; KIKUSUI, T.; van der GUGTEN, J.; GROENINK, L.; OLIVIER, B.; MICZEK, K. A. Effects of corticotropin-releasing hormone on distress vocalizations and locomotion in maternally separated mouse pups. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 72, p. 993-999, 2002.

DONG, Q.; SALVA, A.; SOTTAS, C. M.; NIU, E.; HOLMES, M.; HARDY, M. P. Rapid glucocorticoid mediation of suppressed testosterone biosynthesys in male mice subjected to immobilization stress. **Journal of Andrology**, v. 25, n. 6, 973-981, 2004.

DUNN, A. J. Interactions between the nervous system and the immune system: implications for psychopharmacology. In: BLOOM, F. E.; KUPFER, D. J. (Ed.). **Psychopharmacology: The Fourth Generation of Progress**. New York: Raven-Press, 1995. p. 719-731.

EKLUND, M. B.; ARBORELIUS, L. Twice daily long maternal separations in Wistar rats decreases anxiety-like behaviour in females but does not affect males. **Behavioural Brain Research**, v. 172, p. 278-285, 2006.

ELENKOV, I.J. Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance. **Annals New York Academy of Science**, v. 1024, p. 138-146, 2004.

ELENKOV, I.J.; CHROUSOS, G.P.; VIZI, E.S. Stress hormones, proinflammtory and anti-inflammatory cytokines, and autoimmunity. **Annals New York Academy of Science**, v. 966, p. 290-303, 2002.

ELENKOV, I.J.; WILDER, R.L.; CHROUSOS, G.P.; VIZI, E.S. The sympathetic nerve--an integrative interface between two supersystems: the brain and the immune system. **Pharmacological Reviews,** v. 52, n. 4, p.595-638, 2000.

FAGGIN, B. M.; PALERMO-NETO, J. Differential alternations in brain sensitivity to amphetamine and pentylenetetrazol in socially deprived mice. **Genneral Pharmacology**, v. 16, p. 299-302, 1985.

FIDLER, I. Macrophages and metastasis-biological aproach to cancer therapy. **Cancer Research**, v. 45, p. 4714, 1985

FONSECA, E. S. M.; MASSOCO, C. O.; PALERMO-NETO, J. Effects of prenatal stress on stress-induced changes in behavior and macrophage of mice. **Physiology and Behavior**, v. 77, p. 205-215, 2002.

GALLOWITSCH-PUERTA, M.; PAVLOV, V. A. Neuro-immune interactions via the cholinergic anti-inflammatory pathaway. **Life Sciences**, v. 80, p. 2325-2329, 2007.

GARTSIDE, S. E.; JOHNSON, D. A.; LEITCH, M. M.; TROAKES, C.; INGRAM, C. D. Early life adversity programs changes in central 5-HT neural function in adulthood. **European Journal of Neuroscience**, v. 117, n. 11, p. 2401-2411, 2003.

GOMEZ, M.; SILVESTRI, G. A. Lung cancer screening. ***American Journal of Medicine Science****, v. 335, n. 1, p. 46-50, 2008.*

GOUD, S.N.; KAPLAN, A.M. Inhibition of natural killer cell activity in mice treated with tobacco specific carcinogen NNK. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 56, n. 2., p. 131-44,1999.

GRAEFF, F. G. Serotonina, material cinzenta periaquedutal e transtorno do pânico. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, v. 25, p. 42-45, 2003.

GRAEFF, F. G. DEAKIN, J. F. W. 5-HT and mechanisms of defense. **Journal of Psychopharmacology**, v. 5, p. 305-315, 1991.

GROSSEN, N.E.; KELLEY, M.J. Species-specific behavior and acquisition of avoidance behavior in rats. **Journal Comparative and Physiologycal Psychology.** v.81, p. 307-310, 1972.

HARLOW, H. F.; HARLOW, M. K. The affectional systems. In: HARLOW, H. F.; HARLOW, M. K. (Ed.) **Behavior of nonhuman primates.** London: Academic-Press, 1965. p. 287-334.

HASUI, M.; HIRABAYASHI, Y.; KOBAYASHI, Y. Simultaneous measurement by flow cytometry of phagocytosis and hydrogen peroxide production of neutrophils in whole blood. **Journal of Immunological Methods**, v. 117, p. 53-58, 1989.

HECHT, S. S. Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines. **Chemical Research in Toxicology**, v. 11, n. 6, p. 560-603, 1998.

HECHT, S. S. Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. **Journal of National Cancer Institute**, v. 91, p. 1194-1210, 1999.

HEINIGER H. J.; CHEN H. W.; MEIER H.; TAYLOR B. A.; COMMERFORD L. S. Studies on the genetic control of cell proliferation. 1. Clearance of DNA-bound radioactivity in 19 inbred strains and hybrid mice. **Life Science***,* v. 11, p. 87-98, 1972.

HEINIGER H. J.; TAYLOR B. A.; HARDS E. J.; MEIER H. Heritability of the phytohaemagglutinin responsiveness of lymphocytes and its relationship to leukemogenesis. **Cancer Research**, v. 35, p. 825-831, 1975.

HOLMES, A. LeGUISQUET, A. M.; VOGEL, E.; MILLSTEIN, R. A.; LEMAN, S.; BELZUNG, C. Early life genetic, epigenetic and environmental factors shaping emotionality in rodents. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews,** v. 29, p. 1335-1346, 2005.

KANEKO, W. M.; RILEY, E. P.; ETHLERS, C. L. Behavioral and electrophysiological effects of early repeated maternal separation. **Depression**, v. 2, p. 43-53, 1994.

KANITZ, E.; TUCHSCHERER, M.; PUPPE, B.; TUCHSCHERER, A.; STABENOW, B. Consequences of repeated early isolation in domestic piglets (*Sus scrofa*) on their behavioural, neuroendocrine, and immunological responses. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 18, p. 35-45, 2004.

KELLER, R.; KEIST, R.; FREI, K. **European Journal of Immunology**, v.20, p. 695, 1990.

KELLEY, K. W.; BLUTHE, R. M.; DANTZER, R.; ZHOU, J. H.; SHEN, W. H.; JOHNSON, R. W. BROUSSARD, S. R. Cytokine-induced sickness behavior. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 17, p. S112-S118, 2003.

KIKUSUI, T.; FACCIDOMO, S.; MICZEK, K. A. Repeated maternal separation: differences in cocaine-induced behavioral sensitization in adult male and female mice. **Psychopharmacology**, v. 178, p. 202-210, 2005.

KRAAL, G.; BROUG, E.; THEPEN, T.; VAN IWAARDEN, J. F.; PERSOONS, J. H. A. The role of alveolar macrophages in pulmonary immune function. In: LIPSCOMB, M. F.; RUSSELL, S. W. (Eds). **Lung macrophages and dendrict cells in health disease**. New York: Marcel Dekker Inc. 1997, p. 203-220.

LAUDENSLAGER, M. L.; CAPITANIO, J. P.; REITE, M. Possible effects of early separation experiences on subsequent immune function in adult macaque monkeys. **American Journal of Psychiatry**, v. 142, p. 862-864, 1985.

LAUDENSLAGER, M. L.; REITE, M.; HARBECK, R. J. Suppressed immune response in infant monkeys associated with maternal separation. **Behavioral and Neural Biology**, v. 36, p. 40-48, 1982.

LAUDENSLAGER, M. L.; HELD, P. E.; BOCCIA, M. L.; REITE, M. L.; COHEN, J. J. Behavioral and immunological consequences of brief mother-infant separation: a species comparison. **Developmental and Psychobiology**, v. 23, n. 3, p. 247-264,1990.

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

LAZZARINI, R.; MAIORKA, P.C.; LIU, J.; PAPADOPOULOS, V.; PALERMO-NETO, J. Diazepam effects on carrageenan-induced inflammatory paw edema in rats: role of nitric oxide.**Life Science**, v. 78, n. 26, p. 3027-3034, 2006.

LAZZARINI, R.; MALUCELLI, B.E.; PALERMO-NETO, J. Reduction of acute inflammation in rats by diazepam: role of peripheral benzodiazepine receptors and corticosterone. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 23, n. 2, p. 253-265, 2001.

LEE, J.; KIM, H. J.; KIM, J. G.; RYU, V.; KIM, B.; KANG, D.; JAHNG, J. W. Depressive behaviors and decreased expression of serotonin reuptake transporter in rats that experienced neonatal maternal separation. **Neuroscience Research**, v. 58, p. 32-39, 2007.

LEHMANN, J.; PRYCE, C. R.; BETTSSCHEN, D.; FELDON, J. The maternal separation paradigm and adult emotionality and cognition in male and female wistar rats. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 64, n. 4., p. 705-715, 1999.

LEVINE, S. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the neonatal rat: the role of maternal behavior. **Neurotoxicology Resarch**, v. 4, n. 5-6, p. 557-564, 2002.

LEWIS, M. H.; GLUCK, J. P.; PETITTO, J. M.; HENSLEY, L. L.; OZER, H. Early social deprivation in nohuman primates: long-term effects on survival and cell-mediated immunity. **Biological Psychiatry**, v. 47, p. 119-126, 2000.

LIGEIRO-OLIVEIRA, A. P.; FIALHO DE ARAUJO, A. M.; LAZZARINI, R.; SILVA, Z. L.; DE NUCCI, G.; MUSCARA, M. N.; TAVARES DE LIMA, W.;

PALERMO-NETO, J. Effects of amphetamine on immune-mediated lung inflammatory response in rats. **Neuroimmunomodulation**, v. 11, n. 3, p. 181-190, 2004.

LISTER, R. G. The use of a plus-maze to measure anxiety in the mouse. **Psychopharmacology,** v. 92, p. 180-185, 1987.

LIU, D.; DIORIO, J.; DAY, J. C.; FRANCIS, D. D.; MEANEY, M. J. Maternal care, hippocampal synaptogenesis and cognitive development in rats. **Nature Neuroscience**, v. 3, n. 8, p. 799-806, 2000.

LIU, D.; DIORIO, J.; TANNENBAUM, B.; CALDJI, C.; FRANCIS, D. D.; FREEMAN, A.; SHARMA, S.; PEARSON, D.; PLOTSKY, P. M.; MEANEY, M. J. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. **Science**, v. 277, p. 1659-1662, 1997.

LUBACH, G. R.; COE, C. L.; ERSHLER, W. B. Effects of early rearing environment on immune responses of infant rhesus monkeys. **Brain, Behavior and Immunology**, v. 9, n. 1, p. 31-46, 1995.

MADEN, K. S.; LIVNAT, S. Catecholamine action and immuniologic reactivity In: ADER, R.; FELTEN, D. L.; COHEN, N. (Ed.). **Psyconeuroimmunology**. San Diego: Academic Press, 1991. p. 283-310.

MASSOCO, C.; PALERMO-NETO, J. Effects of midazolam on equine innate immune response: a flow cytometric study. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 95, p. 11-19, 2003.

MATTHEWS, K.; DALLEY, J. W.; MATTHEWS, C.; TSAI, T. H.; ROBBINS, T. W Periodic maternal separation of neonatal rats produces region- and gender-specific effects on biogenic amine content in postmortem adult brain. **Synapse**, v. 40, p. 1-10, 2001.

MATTHEWS, K.; WILKINSON, L.; ROBBINS, T. W. Repeated maternal separation of prewealing rats attenuates behavioral responses to primary and conditioned incentives in adulthood. **Physiology & Behavior**, v. 59, n. 1, p. 99-107, 1996.

McEWEN, B.S. Protective and damaging effects of stress mediators. **The New England Journal of Medicine**. V. 338, p. 171–179, 1998.

McEWEN, B.S. Effects of adverse experiences for brain structure and function. **Biological Psychiatry** v. 48, p. 721–731, 2000.

McEWEN, B.S. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. **Brain Research**. v. 886, p. 172–189, 2000.

MILLSTEIN, R. A.; HOLMES, A. Effects of repeated maternal separation on anxiety-and depression-related phenotypes in different mouse strains. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 31, p. 3-17, 2007.

MORGULIS, M. S.; STANKEVICIUS, D.; SA-ROCHA, L. C.; PALERMO-NETO, J. Cohabitation with a sick cage mate: consequences on behavior ando n ehrlich tumor growth. **Neuroimmunomodulation**, v. 11, n. 1, p. 49-57, 2004.

MUNEOKA, K.; MIKUNI, M.; OGAWA, T.; KITERA, K.; TAKAHASHI, K. Periodic maternal deprivation-induced potentiation of the negative feedback sensitivity to glucocorticoids to inhibit stress-induced adrenocortical response persists

throughout the animal's life-span. **Neuroscience Letters**, v. 168, p. 89-92, 1994.

MURAKAMI, S.; NOGUSHI, T.; TAKEDA, K.; ICHIJO, H. Stress signaling in cancer. **Cancer Science**, v. 98, n. 10, p. 1521-1527, 2007.

NEUMANN, I. D.; WIGGER, A.; KROMER, S.; FRANK, E.; LANDGRAF, R.; BOSCH, O. J. Differential effects of periodic maternal separation on adult stress coping in rat model of extremes in trait anxiety. **Neuroscience**, v. 132, p. 867-877, 2005.

PALERMO-NETO, J. **Influência da D1-dihidroxifenilalanina e da D1-clorofenilalanina sobre o comportamento agressivo induzido em ratos pela *Cannabis sativa L.*** 1971. 105 f. Dissertação. (Mestre em Farmacologia) – Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de São Paulo.

PALERMO-NETO, J.; MASSOCO, C. O.; FÁVARE, R. C. Effects of maternal stress on anxiety levels, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Neurotoxicology and Teratology**, v. 23, p. 497-507, 2001.

PALERMO-NETO, J.; MASSOCO, C. O.; SOUZA, W. R. Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 17, p. 43-54, 2003.

PARÉ. W. P.; GLAVIN, G.B. Animal models of stress in pharmacology. In: **Methods in Behavioral Pharmacology**, edited by: VAN HAAREN, F. Elsevier Science Publishers, p. 413-441, 1993.

PAVLOV, V. A.; OCHANI, M.; GALLOWITSCH-PUERTA, M.; OCHANI, K.; HUSTON, J. M.; CZURA, C. J.; AL-ABED, Y.; TRACEY, K. J. Central muscarinic cholinergic regulation of the systemic inflammatory response during endotoxemia. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 13, p. 5219-5223, 2006.

PAVLOV, V. A.; TRACEY, K. J. The cholinergic anti-inflammatory pathway. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 19, n. 6. p. 493-499, 2005.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open-closed arm entries in a elevated plus maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p. 149-167, 1985.

PENKE, Z.; FELSZEGHY, K.; FERNETTE, B.; SAGE, D.; NYAKAS, C.; BURLET, A. Postnatal maternal deprivation produces long-lasting modifications on stress response, feeding and stress-related behaviour in the rat. **European Journal of Neuroscience**, v. 14, p. 747-755, 2001.

POLTYREV, T.; WEINSTOCK, M. Effects of prenatal stress on opioid component of exploration in different experimental situations. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 58, n. 2, p. 387-393, 1997.

PORTELA, C. P.; MASSOCO, C. O.; DE LIMA, W. T.; PALERMO-NETO, J. Stress-induced increment on total bronchoalveolar cell count in OVA-sensitized rats.**Physiological Behavior**, v. 72, n. 3, p. 415-420, 2001.

QIU, Y.; CHENG, C.; DAI, L.; PEG, Y. Effects of endogenous catecholamines in lymphocytes on lymphocyte function. **Journal of Neuroimmunology,** v. 167, n. 1-2, p. 45-52, 2005.

REBAR, A. H.; MacWILLIANS, P. S.; FELDMAN, B. F.; METZGER, F. L.; POLLOCK, R. V. H.; ROCHE, J. **Guia de Hematologia para Cães e Gatos,** Roca Editora, 2003, 291p.

REES, S. L.; STEINER, M.; FLEMING, A. S. Early deprivation, but not maternal separation, attenuates rise in corticosterone levels after exposure to a novel environment in both juvenile and adult female rats. **Behavioural Brain Research**, v. 175, p. 383-391, 2006.

REICHE, E. M. V.; NUNES, S. O. V.; MORIMOTO, H. K. Stress, depression, the immune system and cancer. **Oncology**, v. 5, p. 617-625, 2004.

REICHLIN, S. Neuroendocrine-immune interactions. **The New England Journal of Medicine,** v. 329, n. 17, p.1246-1253, 1993.

RENOUX, G.; BIZIERE, K. Neocortex lateralization of immune function and of the activities of imuthiol, a T-cell-specific immunopotentiator. In: ADER, R.; FELTEN, D. L.; COHEN, N. (Ed.). **Psychopharmacology,** 2 ed. San Diego: Academic-Press, 1991. p.127-147.

RIGHI, D.A. & PALERMO-NETO, J. Effects of type II pyrethroid-cyhalothrin in rats. **Toxicology and Applied Pharmacology,** v. 191, n.2, p. 167-176, 2003.

RIOUX, N.; CASTONGUAY, A. Recovery from 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone induced immunosupression in A/J mice by treatment with nonsteroidal antiinflamatory drugs. **Journal of National Cancer Institute**, v. 89, p. 874-880, 1997.

ROMAN, E.; GUSTAFSSON, L.; BERG, M.; NYLANDER, I. Behavioral profiles and stress-induced corticosteroid secretion in male Wistar rats subjected to short and prolonged periods of maternal separation. **Hormones and Behavior**, v. 50, p. 736-747, 2006.

ROMEO, R. D.; MUELLER, A.; SISTI, H. M.; OGAWA, S.; McEWEN, B. S.; BRAKE, W. G. Anxiety and fear behaviors in adult male and female C57BL/6 mice are modulated by maternal separation. **Hormones and Behavior**, v. 43, p. 561-567, 2003.

SAPOLSKY, R. M.; MEANEY, M. J.; Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporresponsive period. **Brain Research**, v. 11, n. 65-76, 1986.

SANDERS, V. M.; KAVELAARS, A. Adrenergic regulation of immunity In: ADER, R. **Psychoneuroimmunology: Fourth Edition**, Elsevier Academic Press, p. 63-84, 2007

SAKAI, M.; FONSECA, E.S.; DAGLI M.L.; PALERMO-NETO, J. Diazepam effects on Ehrlich tumor growth and macrophage activity in mice. **Life Sciences**. v. 78, n. 16, p. 1777-1783, 2006.

SAKAI, M.; FONSECA, E. S.; OLORIS, S. C.; MATSUZAKI, P.; OTAKE, A. H.; LEITE, K. R.; MASSOCO, C. O.; DAGLI, M. L.; PALERMO-NETO, J. Effects of peripheral-type benzodiazepine receptor ligands on Ehrlich tumor cell proliferation. **European Journal of Pharmacology**, v. 550, p. 8-14, 2006.

SÁ-ROCHA, V. M.; SÁ-ROCHA, L. C.; PALERMO-NETO, J. Variations in behavior, innate immunity and host resistance to B16F10 melanoma growth in

mice that present social stable hierarchical ranks. **Physiology Behavior**, v. 88, n. 1-2, p. 108-15, 2006.

SCHIMIDT, M. V.; LEVINE, S.; ALAM, S.; HARBICH, D.; STERLEMANN, V.; GANEA, K.; De KLOET, E. R.; HOLSBOER, F.; MÜLLER, M. B. Metabolic signals modulate hypotalamic-pituitary-adrenal axis activation during maternal separation of neonatal mouse. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 18, p. 865-874, 2006.

SCHIMIDT, M. V.; OITZL, M. S.; LEVINE, S.; DeKLOET, E. R.; The HPA system during the postnatal development of CD1mice and the effects of maternal deprivation. **Brain Resarch of Developmental Brain**, v. 139, p. 39-49, 2002.

SCHONEVELD, O. J. L. M.; CIDLOWSKI, J. A. Glucocorticoids and immunity: mechanisms of regulation. In: ADER, R. **Psychoneuroimmunology: Fourth Edition**, Elsevier Academic Press, p. 45-62, 2007.

SLOTTEN, H. A.; KALINICHEV, M.; HAGAN, J. J.; MARSDEN, C. A.; FONE, K. C. F. Long-lasting changes in behavioral and neuroendocrine indices in the rat following neonatal maternal separation: gender-dependent effects. **Brain Research**, v. 1097, p. 123-132, 2006.

STANTON, M. E.; LEVINE, S. Inhibition of infant glucocorticoid stress response: especific role of maternal cues. **Developmental Psychobiology**, v. 23, p. 411-426, 1990.

TAHERA, Y.; MELTSER, I.; JOHANSSON, P.; HANSSON, A. C.; CANLON, B. Glucocorticoid receptor and NFkB interactions in restraint stress mediated protection agains acoustic trauma. **Endocrinology**, v. 147, n. 9, p. 4430-4437, 2006.

TEUNIS, M. A. T.; HEIJNEM, C. J.; SLUYTER, F.; BAKKER, J. M.; VAM DAM, A. M. W.; HOJ, M.; COOLS, A. R.; KAVELAARS, A. Maternal deprivation of rat pups increases clinical symptoms of experimental autoimmune ancephalomyelitis at adult age. **Journal of Neuroimmunology**, v. 133, p. 30-38, 2002.

THERRIAULT, M. J.; PROULX, L. I.; CASTONGUAY, A.; BISSONNETTE, É. Y. Immunomodulatory effects of the tobacco-specific carcinogen, NNK, on alveolar macrophages. **Clinical and Experimmental Immunology**, v. 132, p. 232-238, 2003.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, n. 420, p. 853-859, 2002.

TUCHSCHERER, M.; KANITZ, E.; PUPPE, B.; TUCHSCHERER, A.; STABENOW, B. Effects of postnatal social isolation on hormonal and immune responses of pigs to an acute endetoxin challenge. **Physiology & Behavior**, v. 82, p. 503-511, 2004.

TURUSOV, V. S.; MOHR, U. Tumors of the mouse. In: International Agency for Research on Cancer (Eds.). **IARC: Pathology of tumors in laboratory animals.** v. 2. Lyon: IARC: Science Publications. 1994. p.111.

Van GAALEN, M. M.; STECKLER, T. Behavioural analysis of four mouse strains in an anxiety test battery. **Behavioural Brain Research**, v. 115, p. 95-106, 2000.

VISSER, J.; BOXEL-DEZAIRE, A.; METHORST, D.; BRUNT, T.; KLOET, R.; NAGELKERKEN, L. Differential regulation of interleukin-10 (IL-10) and IL-12 by glucocorticoids in vivo. **Blood**, v. 91, n. 11, p. 4255-4264, 1998.

VIVEROS-PAREDES, J. M.; PUEBLA-PÉREZ, A. M.; GUTIÉRREZ-CORONATO, O.; SANDOVAL-RAMIREZ, L.; VILLASEÑOR-GARCIA, M. M. Dysregulation of the Th1/Th2 cytokine profile is assaciated with immunossupression induced by hypotalamic-pituitary-adrenal axis activation in mice. **International Immunopharmacology**, v.6, p. 774-781, 2006.

WALKER, C. D.; SAPOLSKY, R. M.; PERRIN, M.; VALE, W. W.; RIVIER, C. L. Ontogeny of the response in the rat: role of the pituitary and the hypothalamus. **Endocrinology**, v. 118, p. 1445-1451, 1986.

WEINSTOCK, M.; POLTYREV, T.; SCHORER-ATELBAUM, D.; MEN, D; McCARTY, R. Effect of prenatal stress on plasma corticosterone and catecholamines in response to footshock in rats. **Physiology and Behavior**, v. 64, p. 439-444, 1998.

WIGGER, A.; NEUMANN, I. Periodic maternal deprivation induces gender-dependent alterations in behavioral and neuroendocrine responses to emotional stress in adult rats. **Phisiology & Behavior**, v. 66, n. 2, p. 293-302, 1999.

WILLIAMS, M. D.; SANDLER, A. B. The epidemiology of lung cancer. **Cancer Treat Research**, v. 105, p. 31-52, 2001.

WYNDER, E. L. Tobacco as a cause of lung cancer: some reflections. **American Journal of Epidemiology**, v. 146, p. 687-694, 1997.

YAP, J. J.; TAKASE, L. F.; KOCHMAN, L. J.; FORNAL, C. A.; MICZEK, K. A.; JACOBS, B. L. Repeated brief social defeat episodes in mice: effects on cell proliferation in the dentate gyrus. **Behavioural Brain Research**, v. 172, p. 344-350, 2006.

ZHOU, D.; KUSNEKOV, A. W.; SHURIN, M. R.; DePOULI, M. Expousure to physical and psycological stressors elevates plasma interleukin-6: relationship to the activation of hypothalamic-pituitary-adrenal-axis. **Endocrinology**, v. 133, n. 6, p. 2523-2530, 1993.

ZIMMERBERG, B.; SHARTRAND, A. M. Temperature dependent effect of maternal separation on growth, activity, and amphetamine sensitivity in the rat. **Developmental Psychobiology**, v. 25, p. 213-223, 1992.

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