MARCOS ANTÔNIO VARRIANO

O Estresse Agudo e a Asma Alérgica Em Ratos.

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada à de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia do Farmacêutico Marcos Antônio Varriano.

Campinas, 23 de fevereiro de 2001.

Nancy Airoldi Teixeira

Profa. Dra. Nancy Airoldi Teixeira
- Orientadora -

Campinas

2001

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

MARCOS ANTÔNIO VARRIANO

O Estresse Agudo e a Asma Alérgica Em Ratos.

Dissertação de Mestrado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Farmacologia

Orientadora: Profa. Dra. Nancy Airoldi Teixeira

Co-Orientador: Prof. Dr. Edson Antunes

Campinas

2001

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

V435e
V436e

Varriano, Marcos Antônio
O Estresse agudo e a asma alérgica em ratos / Marcos Antônio Varriano. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

Orientadores: Nancy Airoldi Teixeira, Edson Antunes
Tese (Mestrado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Inflamação . 2. Imunidade. 3. Psicofarmacologia. I. Nancy Airoldi Teixeira. II. Edson Antunes. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. IV. Título.

UNICAMP

Banca Examinadora da Dissertação de Mestrado

Orientador:
Profa. Dra. Nancy Airoldi Teixeira

Membros:

1. Profa. Dra. Nancy Airoldi Teixeira
2. Profa. Dra. Marilda Emmanuel Novaes Lipp
3. Profa. Dra. Leonilda M. B. Santos

Programa de Pós-Graduação em Farmacologia da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 23/02/01

DEDICO ESTE TRABALHO

Aos meus queridos pais, Sebastião e Neide, pelo amor, ânimo e coragem para crescer. Obrigado por serem exatamente como são.

À Daniza, minha companheira, inspiração e força-motriz.

Às minhas irmãs, Ana, Márcia e Andressa, pelo companheirismo e apoio de todos os momentos

Aos meus amigos que sempre estiveram juntos, não importando o momento

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter-me dado força e serenidade para realização deste trabalho.

À minha orientadora Profa. Dra. Nancy Airoldi Teixeira, meu especial agradecimento. Obrigado pela sua amizade sincera, colaboração e apoio, preciosos ensinamentos e experiências. Jamais vou esquecer.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Edson Antunes, pela confiança, seriedade, organização e constante colaboração.

Aos amigos do Laboratório de Psicofarmacologia e companheiros de jornada - Marcelo, Fernanda, Negão, Cris, Jaqueline, e minha irmã Ana - pelo respeito, companheirismo e troca de experiências que fizeram-me sentir a alegria de estar vivendo um pouco mais.

À Dra. Marta Medeiros, pelos preciosos ensinamentos e ajuda na parte prática deste trabalho.

Ao Sr. Miguel Borges da Silva, pelo zelo, especial cuidado e amor com os animais do Biotério.

Aos secretários da Pós-Graduação – Wanderley e Eduardo - pela paciência, respeito e agradável convivência.

Ao CAPES, pela concessão de bolsa de mestrado.

Meras palavras jamais agradecerão aos animais pelo valioso auxílio; a eles ficam aqui minha eterna gratidão.

Ao Departamento de Farmacologia da UNICAMP, funcionários e professores, muito obrigado.

À minha família que através de seu incentivo, confiança, paciência e amizade verdadeira, deu-me forças para crescer e superar todos os momentos difíceis durante esta jornada.

"O HOMEM PASSA, DESAPARECE NA MORTE. TENDO, PORÉM, DEIXADO UMA IDÉIA NUM LIVRO, O SEU RASTRO BRILHARÁ NO TEMPO COMO BRILHA NO FUNDO DA NOITE A ALMA RADIOSA DOS ASTROS".

COELHO NETO

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas

Procedência das Drogas

Lista de Figuras e Tabelas

Resumo

1. INTRODUÇÃO 26

1.1 Considerações gerais 26

1.2 O Estresse como agente neuro-imunomodulador 28

1.3 A Asma Alérgica e a Reação Imune 31

1.4 Objetivo 37

2. MATERIAIS E MÉTODOS 38

2.1 Animais 38

2.2 Procedimento Experimental 38

2.2.1 Caixa de choques inescapáveis 39

2.2.2 Estresse Agudo Experimental 39

2.2.3 Modelo de Asma Alérgica 40

2.2.3.1 Sensibilização com OVA 40

2.2.3.2 Desafio Antigênico e coleta do LBA 41

2.3 Análise Estatística 42

3. RESULTADOS 43

3.1 Infiltrado celular no LBA para o estresse aplicado no dia ZERO 43

3.2 Infiltrado celular no LBA para o estresse aplicado no dia SETE 47

3.3 Infiltrado celular no LBA para o estresse aplicado no dia TREZE..... 50

4. DISCUSSÃO..... 53

5. CONCLUSÕES..... 64

6. SUMMARY..... 65

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 66

8. ANEXOS..... 77

8.1 Protocolos do Estresse..... 77

8.2 Caixa de Choques Inescapáveis..... 78

Lista de Abreviaturas

ACTH - Hormônio adrenocorticotrófico

CORT - Corticosterona

CRH - Hormônio liberador de corticotrofina

HPA - Hipotálamo-Pituitário-Adrenal

IgE - Imunoglobulina E

δ-IFN - Gama-interferon

IL-1∝ - Interleucina 1-alfa

IL-1β - Interleucina 1-beta

IL-5 - Interleucina-5

IL-6 - Interleucina-6

IL-8 - Interleucina-8

LBA - Lavado broncoalveolar

LPS - Lipopolissacarídeos

NO - Óxido nítrico

OVA - Ovoalbumina

PAF - Fator de ativação plaquetário

TNF-α - Fator alfa de necrose tumoral

TNP-KLH - trinitrophenyl conjugated keyhole limpet hemocyanin

Procedência das Drogas

Ácido Acético - Merck (Alemanha)

Albumina Bovina - Sigma (St. Louis, MO, EUA)

Azul de Metileno - Sigma (St. Louis, MO, EUA)

Corante May-Grunwhald-Giemsa - Merck (Alemanha)

Heparina - Eurofarma (Brasil)

Hidrato de Cloral - Reagen (RJ, Brasil)

Hidróxido de Alumínio Coloidal - Sanofi (RJ, Brasil)

KCl - Merck (RJ, Brasil)

KH_2PO_4 - Merck (RJ, Brasil)

Metanol - Merck (RJ, Brasil)

$Na_2HPO_4.12H_20$ - Nuclear (Brasil)

NaCl - Merck (RJ, Brasil)

NaCl 0,9% estéril - Fresenius (SP, Brasil)

Ovoalbumina , grau III - Sigma (St. Louis, MO, EUA)

Lista de Tabelas e Figuras

Figura 1: Leucócitos totais (A), neutrófilos (B), eosinófilos (C), ... 45
mononucleares (D) no LBA dos Quatro grupos experimentais (7-8 ratos cada)
submetidos ao estresse agudo 15 dias (dia 0) antes do desafio com OVA

Tabela 1: contagem dos leucócitos totais (LT), neutrófilos (NEU), eosinófilos 46
(EOS) e mononucleares (MON) no LBA dos quatro grupos experimentais
submetidos ao estresse agudo 15 dias antes do desafio com OVA

Figura 2: Leucócitos totais (A), neutrófilos (B), eosinófilos (C), ... 48
mononucleares (D) no LBA dos Quatro grupos experimentais (7-8 ratos cada)
submetidos ao estresse agudo 7 dias (dia 7) antes do desafio com OVA.

Tabela 2: contagem dos leucócitos totais (LT), neutrófilos (NEU), eosinófilos 49
(EOS) e mononucleares (MON) no LBA dos quatro grupos experimentais
submetidos ao estresse agudo 07 dias antes do desafio com OVA

Figura 3: Leucócitos totais (A), neutrófilos (B), eosinófilos (C), ... 51
mononucleares (D) no LBA dos Quatro grupos experimentais (7-8 ratos cada)
submetidos ao estresse agudo 1 dia (dia 13) antes do desafio com OVA.

Tabela 3: contagem dos leucócitos totais (LT), neutrófilos (NEU), eosinófilos 52
(EOS) e mononucleares (MON) no LBA dos quatro grupos experimentais
submetidos ao estresse agudo 01 dia antes do desafio com OVA

Resumo

Neste estudo ratas da linhagem Wistar foram expostas ao modelo do estresse agudo emocional (choques elétricos inescapáveis), e a resposta inflamatória induzida por antígeno foi avaliada através da contagem total e diferencial de leucócitos no lavado broncoalveolar (LBA). Os animais foram sensibilizados através de injeção subcutânea de 0,15 mL de ovoalbumina (OVA) contendo 200 μg de OVA e 8 mg $Al(OH)_3$ preparada em salina. Animais controles receberam apenas $Al(OH)_3$. Metade dos animais foi submetida ao estresse agudo (uma sessão de 60 choques inescapáveis de 1 mA nas patas), realizado 15 dias, 7 dias ou 1 dia antes do desafio com OVA (14° dia após a sensibilização). O protocolo acima resultou em quatro grupos experimentais (7-8 ratos cada): 1) **NE-NS**, não estressados e não sensibilizados 2) **NE-S**, não estressados e sensibilizados, 3) **E-NS**, estressados e não sensibilizados e 4) **E-S**, estressados e sensibilizados. Em todos os casos, a contagem total e diferencial de leucócitos foi feita no LBA, coletado 48 h após o desafio com OVA. Em ratos sensibilizados (NE-S and E-S), o desafio intratraqueal com OVA aumentou significativamente ($p<0,05$) o influxo de leucócitos totais e eosinófilos comparado aos ratos controles (NE-NS and E-NS) nos três períodos estudados. Entretanto, não houve diferenças significativas no número de leucócitos totais, neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares entre ratos não estressados e estressados. Estes resultados sugerem que o estresse agudo não influencia a infiltração de leucócitos para as vias aéreas de ratos sensibilizados com OVA.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Considerações gerais

Novos campos da Medicina, como a psiconeuroimunologia, têm mudado a visão sobre muitas doenças. A expressão "psiconeuroimunologia" indica a função do psíquico, sua relação direta sobre o cérebro e o sistema imune. Explanações multifatoriais como hereditariedade, condições ambientais, classe social, estresse, sistema endócrino, cérebro, neurohormônios e mecanismos imunológicos são as novas áreas de pesquisa (MURRAY, 1977).

A conexão entre sistema nervoso central, sistema endócrino e sistema imune permite considerá-los um sistema único integrado mais do que um sistema em separado: o estresse psicológico e doenças psiquiátricas podem comprometer o funcionamento normal do sistema imune. Do mesmo modo, sabe-se que mediadores solúveis liberados pelas células imunes podem afetar o funcionamento saudável do SNC e produzir alterações no comportamento (CONNOR & LEONARD, 1998), estimular o eixo hipotálamo-hipofisário-adrenal (HPA) e ativar as respostas ao estresse.

Inúmeros estudos têm demonstrado que condições de vida estressante, tais como exames acadêmicos, desemprego, luto ou divórcio, causam prejuízos em vários aspectos da função imune celular, e a severidade das mudanças imunológicas observadas em um indivíduo guarda relação inversa com sua habilidade de arcar com tal evento (DORIAN

et al., 1982; IRWIN et al., 1987; LINN, LINN, JENSEN, 1984). Pesquisas indicam que as pessoas mais resistentes ao estresse são aquelas que apresentam determinadas atitudes específicas quanto à vida, tais como: abertura e tolerância à mudanças, tendência de estar sempre muito envolvido com o que faz e um sentimento de controle sobre os acontecimentos da vida; pessoas com essas características têm chances reduzidas em 50% de vir a sofrer seriamente de estresse (LIPP et al., 1990).

É bem conhecido que estresse e depressão estão associados a supressão da reatividade imune e ao aumento da susceptibilidade às infecções e doenças neoplásicas, sendo o aumento de glicocorticóides considerado o fator causal da imunossupressão. Glicocorticóides representam o maior produto da ativação do sistema de resposta ao estresse, suprimindo respostas imunes e inflamatórias. Entretanto, estudos recentes sugerem que estresse e desordens do humor podem estar igualmente correlacionados a sinais de ativação imunológica com aumento da secreção de citocinas - tais como IL-1β (Interleucina 1-beta), IL-6 (Interleucina-6) e δ-IFN (Gama-Interferon) - e hiperatividade do eixo HPA (SMITH, 1991a, 1991b). É possível que um defeito no mecanismo *feedback* inibitório de corticosterona (CORT) sobre receptores de glicocorticóides no SNC (para prevenir a liberação excessiva de CRH (hormônio liberador de corticotrofina) e sobre receptores de glicocorticóides nas células imunes (para diminuir a secreção de citocinas), deva estar envolvido na etiologia das desordens depressivas. Tem sido relatada alta incidência de desordens depressivas em indivíduos que sofrem de doenças autoimunes, tais como, lupus eritematoso sistêmico (SAKIC et al., 1994), alergias, artrite reumatóide

(KATZ & YELIN, 1993), esclerose múltipla (MINDEN & SCHIFFER, 1990), como também tem-se encontrado nas doenças autoimunes, hipersecreção de citocinas.

Estressores psicológicos e fisiológicos produzem alterações em função noradrenérgica, serotonérgica e dopaminérgica em roedores (ANISMAN, ZALCMAN, ZACHARKO, 1993) levando à diminuição do apetite e libido, alterações comportamentais e diminuição em alguns tipos de memória. CONNOR & LEONARD (1998) verificaram que a ativação imunológica experimental induz a mudanças comportamentais e neuroquímicas semelhantes às alterações provocadas pelo estresse em animais de laboratório. A ativação do eixo HPA seria a via por onde o estresse e a secreção aumentada de citocinas poderiam atuar sinergicamente.

A psiconeuroimunologia sugere uma forte influência das emoções sobre a resposta alérgica. Novos antígenos presentes nos alimentos e poluentes atmosféricos juntamente com o estresse prevalente na sociedade civilizada moderna têm sido relacionados ao rápido aumento do número de pacientes alérgicos, representando sério problema social (TESHIMA et al., 1991).

1.2. O Estresse como agente neuro-imunomodulador

O estresse pode ser definido como um conjunto de alterações físicas e químicas desencadeadas pelo cérebro para tornar o indivíduo apto a enfrentar uma situação nova, que exige adaptação. A finalidade do estresse consiste em restabelecer a homeostase do

organismo. O termo estresse psicológico é usado para denotar situações que, embora não prejudiquem fisicamente o organismo levando à danos teciduais, evoca respostas comportamentais e fisiológicas características do estresse (SELYE, 1936).

A antiga noção que o estresse sempre exacerba a progressão de doenças físicas via seus efeitos imunossupressivos mediados por corticosteróides deve ser revisada, uma vez que, conforme já relatamos, o estresse nem sempre é imunossupressivo. Estudos clínicos e experimentais demonstraram alteração da atividade de linfócitos e macrófagos por estressores ambientais ou de laboratório, de um modo complexo que depende não somente das características do estressor (como natureza, freqüência e duração), mas também do tempo em que o estressor é aplicado em relação ao curso da resposta imune (KELLEY, 1980; SKLAR, BRUTO, ANISMAN, 1981).

Estudos clínicos conduzidos em populações de estudantes universitários e pacientes deprimidos têm mostrado a relação estresse e sistema imune. Períodos de pressão acadêmica para estudantes, como exames, são acompanhados por respostas linfoproliferativas diminuídas à mitógenos, atividade de células Killer diminuídas, baixa produção de δ-IFN no sangue periférico e reativação de infecções herpéticas (DANTZER & KELLEY, 1989).

Um estudo longitudinal das funções imune em contabilistas (DANTZER & KELLEY, 1989) revelou um padrão de resposta bimodal, com resposta imunológica aumentada ao tempo do pico de estresse e redução da resposta imune durante o período pós-estresse.

VENTURA et. al. (1999) verificaram que a migração de neutrófilos induzida por lipopolissacarídeos (LPS) para a cavidade peritoneal e torácica de ratos submetidos à natação forçada era superior à observada para o grupo não deprimido, sugerindo que a depressão induzida pela natação forçada estimula a resposta inflamatória.

A influência do estresse sobre a imunidade é mediada não somente por glicocorticóides, mas também por catecolaminas, opióides endógenos e hormônios hipofisários tais como o hormônio do crescimento (KHANSARI, MURGO, FAITH, 1990). Assim, a sensibilidade do sistema imune ao estresse é conseqüência indireta de influências recíprocas que existem entre o sistema imune e o SNC. Alguns estressores podem aumentar a resistência do hospedeiro aos organismos patogênicos (GROSS & COLMANO, 1969; GROSS, 1972) e aumentar várias respostas imunes (BLECHA, BARRY, KELLEY, 1982; CROISET et al, 1987; MONJAN & COLLECTOR, 1977). A complexidade dos efeitos observados sobre a função imune/inflamatória dificulta a interpretação dos resultados tornando-se necessário, por exemplo, subdividir e detalhar as pesquisas sobre imunocompetência em órgãos-alvo específicos, como por exemplo, o trato respiratório (DANTZER & KELLEY, 1989).

Utilizando-se animais de laboratório, o estresse experimental propicia um controle sobre as situações aversivas variáveis. Dentre as formas de estresse experimental podemos citar: imobilização do animal por muito tempo, natação forçada (PORSOLT, LEPICHON, JALFRE,1977), choques elétricos escapáveis e inescapáveis (LAUDENSLAGER et al., 1983; AMAT et al., 1993) e ruídos de alta intensidade (LAUDENSLAGER et al., 1983).

A busca de modelos animais para um melhor entendimento inter-relação entre estresse e sistemas de defesa do organismo, tais como o sistema imune/inflamatório, tem sido intensa. Estudos com animais de laboratório têm demonstrado que o condicionamento clássico operante produz alterações na resposta imunológica e na progressão de doenças mediadas pelo sistema imune (ADER & COHEN, 1975; 1982; ADER, COHEN, GROTA, 1979; WAYNER et al., 1978).

Assim, as pesquisas com animais de laboratório têm contribuído para os conhecimentos mais atuais sobre a interação estresse-resposta imune/inflamatória, demonstrando ser o estresse um agente neuro-imuno-modulador.

1.3. A Asma Alérgica e A Reação Imune

A asma brônquica é a mais comum das doenças brônquicas pulmonares e atinge pacientes de todas as idades. Nas últimas décadas, aumentos dramáticos na sua prevalência têm sido reportados por todo o mundo. No Brasil, atinge 10% da população, é a quinta causa de internação pelo SUS, ocupando também a quinta colocação em relação aos gastos por doença. Um estudo de sua prevalência em cidades brasileiras revelou que as taxas mais altas eram associadas com maiores densidades populacionais, maior urbanização e industrialização, apoiando a associação entre asma e fatores ambientais (CAMARGOS, CASTRO, FELDMAN, 1999).

A asma caracteriza-se por hiperreatividade e processo inflamatório crônico da árvore brônquica, levando à obstrução das vias aéreas, reversível espontaneamente ou após tratamento. Há também edema de mucosa brônquica, alteração do movimento ciliar, descamação epitelial, grande quantidade de muco viscoso (NASPITZ & SOLÉ, 1997) e de células inflamatórias, sobretudo eosinófilos.

Tipicamente a asma ocorre em ataques espaçados intercalados com períodos ausentes de sintomas, mas pode ocorrer também numa base contínua (WEINSTEIN, 1987a). Os principais sintomas de asma são dispnéia, tosse e sibilância, os quais variam de leves, sendo quase imperceptíveis, até graves e irreversíveis (estado de mal asmático) (FERNANDES & CAETANO, 1997).

Embora a tendência para o desenvolvimento da asma tenha base genética, a causa exata desta doença permanece desconhecida. Entretanto, inúmeros fatores podem desencadear as crises de asma: alérgenos (hipersensibilidade do tipo I), infecções virais, exercício, inalantes, desgaste emocional, irritantes (poluição atmosférica), medicamentos (inibidores da prostaglandina sintetase), estímulos colinérgicos e mudanças bruscas de temperatura. O grau de hiperreatividade bronquial correlaciona-se com a sintomatologia (WEINSTEIN, 1987b).

A exposição experimental ou natural aos antígenos resulta na liberação de fatores quimiotáxicos, que constituem o passo inicial dentro de uma sequência de eventos resultando na presença de eosinófilos para as vias aéreas. Incluem-se dentre estes eventos a atração e migração de eosinófilos, sua adesão endotelial e epitelial, e ativação, síntese e liberação de substâncias pró–inflamatórias promovendo a obstrução, injúria e

hiperreatividade bronquial (BUSSE & SEDGWICK, 1992). Dentre as substâncias pró–inflamatórias incluem-se grânulos protéicos pré–formados, metabólitos tóxicos derivados do oxigênio, metabólitos do ácido araquidônico, fator de ativação plaquetário (PAF) e citocinas (KROEGEL et al., 1994).

O número de eosinófilos presentes em estudos de biopsia bronquial de indivíduos asmáticos guarda relação com a severidade da doença (AZZAWI et al., 1990; BOUSQUET et al., 1990; BRADLEY et al, 1991; BENTLEY et al, 1992) ou prejuízo epitelial (ROCHE et al., 1989), de modo a permitir especulações por parte dos investigadores de que estes elementos têm um papel central na patogênese da asma.

Em pacientes com asma alérgica, a inalação do antígeno provoca um quadro imediato de obstrução das vias aéreas (podendo surgir dentro de alguns poucos minutos ou até oito horas após a exposição ao alérgeno). Esta resposta é denominada reação asmática imediata, e constitui exemplo clássico da Reação de Hipersensibilidade do Tipo I, da "Classificação de Gell e Coombs". Ocorre em indivíduos geneticamente predispostos, é mediada por Imunoglobulina E (IgE) e caracterizada por contração dos músculos bronquiais. Indivíduos atópicos desenvolvem anticorpos específicos aos antígenos inalados, da classe IgE, que se fixam paulatinamente à superfície dos mastócitos e basófilos, aumentando o nível de resposta antigênica, ou seja, criando um estado de sensibilidade crescente. Após novas exposições ao alérgeno, o antígeno liga-se ao IgE do mastócito e/ou basófilo, promovendo a desgranulação dos mesmos com liberação de histamina e outros mediadores inflamatórios, gerando edema de mucosa (pela vasodilatação), aumento das secreções (pela estimulação das glândulas mucóides) e

broncoespasmo (SOCIEDADE PRÓ ALÉRGICO EM ESTUDOS, PESQUISAS E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO, 1996).

Em muitos pacientes (30-70%) um segundo episódio de obstrução das vias aéreas pode desenvolver-se após quatro (ou oito) horas do desafio antigênico. Esta resposta é conhecida por reação asmática tardia, tem duração mais longa, sendo caracterizada, sobretudo, por inflamação bronquial. Embora muitas células participem da resposta inflamatória, eosinófilos são os elementos celulares predominantes e provavelmente apresentam grande importância (BUSSE & SEDGWICK, 1992).

A asma pode ser considerada como uma desordem em que elementos imunológicos e neuronais estão integrados: a estimulação imunológica deve levar a um aumento na excitabilidade dos nervos aéreos; por outro lado, a estimulação desses, além de conduzir ao broncoespasmo, conduz à mudanças imunológicas e inflamatórias nas vias aéreas (BOCHNER, UNDEM, LICHTENSTEIN, 1994). Em virtude de possuírem receptores para mediadores inflamatórios, fibras aferentes primárias devem também servir para integrar o sistema nervoso e imune nas vias aéreas por responder a provocação imunológica (COLERIDGE & COLERIDGE, 1984; UNDEM & WEIREINCH, 1993; UNDEM, HUBBARD, WEIREINCH, 1993).

Estudos experimentais sugerem que o estresse emocional agudo pode contribuir para o surgimento ou agravamento da asma alérgica. A alteração comportamental de macrófagos alveolares de ratos submetidos à situação de estresse agudo laboratorial foi demonstrada (PERSOONS et al., 1995a) através do aumento marcante *in vitro*, após a estimulação com LPS, na produção de IL-1β e fator alfa de necrose tumoral (TNF-α) e

forte diminuição na produção de óxido nítrico (NO) por estas células. Isto sugere que esta alteração comportamental induzida pelo estresse emocional contribui para a asma, uma vez que macrófagos alveolares desempenham importante papel na resposta imune dos pulmões. BROUG-HOLUB et al. (1998) demonstraram que o bloqueio *in vivo* do sistema nervoso simpático por meio de injeção intraperitoneal do antagonista de receptores beta-adrenérgicos leva ao bloqueio da alteração no comportamento dos macrófagos induzida pelo estresse em ratos expostos a choques elétricos inescapáveis; porém o bloqueio dos receptores alfa-adrenérgicos pela injeção de fentolamina ou do sistema nervoso parasssimpático por metil-atropina não causou efeito semelhante. Postulou-se também que a modulação beta-adrenérgica da atividade dos macrófagos alveolares não deve-se provavelmente ao efeito direto das catecolaminas sobre estas células. PERSOONS et al (1997) demonstraram os efeitos de diferentes tipos de estressores e da intensidade destes sobre a reatividade imune nos pulmões: o aumento da produção de IL-1β e a diminuição de NO por macrófagos colhidos LBA de ratos imediatamente após a sessão de estresse e estimulados *in vitro* com LPS foi diretamente proporcional à intensidade de choques elétricos a que eram expostos os animais, sendo a atividade secretória similarmente afetada através da imobilização do animal (confinamento). Estes efeitos foram normalizados 03 dias após a indução pelo estresse e reapareceram quando as células foram isoladas 1-2 semanas após exposição ao estressor. A produção de anticorpos anti-TNP, 10 dias após a sessão de estresse e subseqüente imunização pulmonar foi dependente da intensidade do estímulo estressor, porém o aumento dos níveis de ACTH e CORT não apresentou correlação com a intensidade do estresse, sugerindo que o efeito

deste sobre a função imune pulmonar deve-se ao envolvimento direto do sistema nervoso autônomo, e não de ACTH ou CORT.

O trato respiratório contém várias barreiras de exclusão aos antígenos do ar, permitindo que respostas imunes locais sejam suprimidas sob condições normais, resultando em baixos títulos de anticorpos após imunização intratraqueal de roedores. Ratos sensibilizados e submetidos à condição de estresse agudo apresentaram aumento significativo na produção, pelos nódulos linfáticos paratraqueais, de anticorpos IgE antígeno-específicos (PERSOONS et al., 1995b). Isto indica que o estresse emocional contribui para o ataque ou severidade da asma alérgica, por onde o estresse reduziria o limiar de indução na produção de anticorpos nos pulmões. O impacto do estresse emocional sobre a função imunológica e asma em jovens acadêmicos foi estudado em estudantes saudáveis e estudantes asmáticos, e verificou-se que a resposta imune foi afetada pelo estresse igualmente nos dois grupos, mas a função pulmonar não foi prejudicada nos indivíduos asmáticos controlados (KANG, COE, MCCARTHY, 1996).

STOTT (1973) demonstrou a influência do estresse pré-natal sobre o desenvolvimento intrauterino e função pulmonar dos descendentes. Crianças, filhas de mães que durante a gestação, foram submetidas ao estresse por problemas familiares, mostraram uma correlação com a incidência de vários problemas respiratórios, retardo no crescimento e desenvolvimento, dificuldades de deglutição e defeitos de linguagem.

Em nossos laboratórios, NOGUEIRA et al. (1999) forneceram a primeira evidência experimental de que o estresse pré-natal brando crônico imprevisível exacerba a resposta inflamatória induzida por antígeno na prole de ratas submetidas aos eventos

estressantes durante a gravidez. O estresse crônico pré-natal consistiu de mudanças transitórias e variáveis nas condições de vida das ratas grávidas; e sua influência foi avaliada através da contagem total e diferencial de leucócitos colhidos no LBA da prole em idade adulta após sensibilização (dia 0) e desafio intratraqueal (dia 14) com ovoalbumina. Descendentes de mães estressadas no período pré-natal apresentaram um aumento significativo na infiltração de leucócitos totais associado com um grande recrutamento de eosinófilos para as vias aéreas, demonstrando que o estresse crônico pré-natal pode afetar a função pulmonar de seus descendentes tornando-os mais susceptíveis a doenças alérgicas. Este estudo suscitou o desenvolvimento deste trabalho que avalia o efeito direto do estresse agudo sobre a resposta alérgica em ratos adultos, quando submetidos a um modelo experimental de asma.

1.4. Objetivo

O objetivo deste estudo foi investigar a influência do estresse emocional agudo sobre a resposta inflamatória induzida por antígeno em ratos expostos a um modelo experimental de asma alérgica.

A influencia do estresse agudo sobre o curso da sensibilização também foi avaliada através da contagem total e diferencial de leucócitos no lavado broncoalveolar dos ratos submetidos ao estresse 1, 7 e 15 dias antes do desafio antigênico.

2. *MATERIAIS E MÉTODOS*

2.1. Animais

Foram utilizadas ratas Wistar (*Ratus novergicus*) adultas de três a cinco meses de idade, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Os animais foram inicialmente agrupados em gaiolas de polipropileno e tampa de metal, no Biotério do Laboratório de Psicofarmacologia do Departamento de Farmacologia da FCM - UNICAMP, onde se serviam *"ad libitum"* de água e ração. O ciclo de luz era automaticamente controlado (das 6:00h às 18:00h) e a temperatura da sala regulada para 26 ± 2°C. Os animais foram posteriormente colocados em gaiolas individuais três dias antes do experimento, onde permaneceram até o término do estudo.

2.2. Procedimento Experimental

O procedimento experimental está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo recebido aprovação pela Comissão de Ética na Experimentação Animal do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (CEEA-IB-UNICAMP).

2.2.1. Caixa de choques inescapáveis

Os choques inescapáveis (1,0 mA) foram ministrados na caixa de choques de 25x19,5x19,5 cm, tendo a parede frontal de acrílico transparente e as restantes de alumínio, com tampa no teto. O piso é composto de barras de latão de 0,3cm de diâmetro, distando 1,2cm entre si, através das quais os choques elétricos foram ministrados (choque *"scrambler"),* por meio do gerador de choques de 1 via, marca ALBARSCH.

Utilizou-se do programa controlador de choques descrito por HERMINI et al. (1994) para a execução automática dos choques. O programa está gravado em disquete e é acessado através do microcomputador XT 2002 da Microtec, que por sua vez está acoplado ao gerador de choques (ALBARSCH). O programa foi baseado na latência média de 199 animais sem nenhum tratamento que tinham a possibilidade de fuga na caixa de alternação. A duração dos choques é, portanto, variável de 0,58 para 18,18 segundos e o intervalo entre os choques, randômico, variando entre 5 e 25 segundos.

2.2.2. Estresse Agudo Experimental

O estresse agudo experimental foi aplicado a 15 dias, 7 dias ou 1 dia antes do desafio com OVA. Considerou-se o dia da sensibilização como o dia 1 do procedimento experimental. Desta forma, o estresse foi aplicado nos dias 0, 7 e 13; o desafio ocorreu no dia 14.

Para o protocolo do estresse, os animais foram confinados na caixa de choques e separados em dois grupos:

Estressados (E): Um rato por sessão foi colocado na caixa de choques. Após um minuto de adaptação, os animais foram expostos a 60 choques de 1,0mA, sempre no compartimento da caixa em que se encontrava o animal. O tempo de duração da sessão foi de 25 minutos e os animais viam-se impossibilitados de escapar destes choques (grupo inescapável);

Não estressados (NE): animais que permaneceram apenas confinados na caixa de choques.

2.2.3- Modelo de Asma Alérgica

2.2.3.1. Sensibilização com OVA

No dia da sensibilização (dia 1), metade dos animais foi *sensibilizada* através de injeção subcutânea dorsal (0,15 ml) de uma solução contendo 200 μg de OVA (grau III – Sigma), adsorvida em 8 mg de $Al(OH)_3$ e preparada em solução fisiológica. A outra metade dos animais recebeu, por via subcutânea, apenas injeção de 8 mg de $Al(OH)_3$, usados como *controle*. O protocolo acima resultou em quatro grupos experimentais (7-8 ratos cada): 1) **NE-NS**, não estressados e não sensibilizados, 2) **NE-S**, não estressados e

sensibilizados, 3)**E-NS**, estressados e não sensibilizados, 4) **E-S**, estressados e sensibilizados.

2.2.3.2. Desafio Antigênico e coleta do LBA

No 14°dia, todos os animais foram anestesiados com hidrato de cloral (300 mg/Kg, i.p.) e a traquéia foi exposta através de incisão no pescoço de aproximadamente 0,5 cm de comprimento. Com ajuda de uma agulha medindo 26,5 gauge, foi injetado intratraquealmente 0,4 ml de OVA a 2,5 mg/ml, preparada em solução fisiológica. Imediatamente após este procedimento, os animais tiveram as incisões suturadas e foram recuperados da anestesia.

O sacrifício para realização do LBA deu-se em 48 horas após o procedimento anterior. Os animais foram novamente anestesiados com hidrato de cloral (300 mg/Kg, i.p.) e exsanguinados pela transecção da aorta abdominal. A região do pescoço foi reaberta e a traquéia canulada com auxílio de um tubo de polietileno de 1mm de diâmetro conectado a uma seringa. O LBA foi recolhido com 25 ml de tampão PBS heparinizado (20UI/ml) enriquecido com 0,03% de albumina bovina, instilado através da cânula traqueal e cuidadosamente aspirado em 4 alíquotas (a primeira alíquota com volume de10ml e as demais medindo 5ml). O LBA foi centrifugado a 2000 r.p.m., por 10 minutos a 20°C em centrífuga Hermle (modelo Z 360 K, Alemanha) e o resíduo celular suspenso em 2 mL de PBS. A contagem do número total de leucócitos foi feita na câmara de Newbauer, diluindo-se (1:20) o lavado em solução de Turk, enquanto que a análise

diferencial foi determinada em esfregaços preparados em citocentrífuga (REVAN - Instrumentos Científicos, Brasil) e corados com May-Grünwald-Giemsa. Um mínimo de 300 células foi contado em microscópio óptico (lente de imersão) e classificado como neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares, diferenciados segundo critérios morfológicos. Os resultados das contagens total e diferencial dos leucócitos são expressos como número de células x 10^6 por lavado broncoalveolar.

2.3. Análise Estatística

Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M). Diferenças estatisticamente significantes foram determinadas utilizando análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey-Kramer para comparações múltiplas. Valores de $p<0,05$ foram considerados significantes.

3. *RESULTADOS*

3.1. Infiltrado celular no LBA para o estresse aplicado no dia ZERO

Os animais sensibilizados - **NE-S** e **E-S** - apresentaram aumento significativo no influxo de leucócitos totais ($10,1 \pm 1,6 \times 10^6$ células/LBA e $9,9 \pm 1,6 \times 10^6$ células/LBA, respectivamente) no LBA colhido em 48 horas após o desafio com OVA em relação aos animais não sensibilizados - **NE-NS** e **E-NS** ($3,2 \pm 0,6 \times 10^6$ células/LBA e $4,1 \pm 0,5 \times 10^6$ células/LBA, respectivamente). O aumento de leucócitos totais foi acompanhado do aumento de neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares (tabela 1 e figura 1). O aumento do influxo de eosinófilos para os grupos sensibilizados - **NE-S** e **E-S** - ($3,5 \pm 0,7 \times 10^6$ células/LBA e $3,6 \pm 1,2 \times 10^6$ células/LBA) foi significativo ($p<0,01$), comprovando a eficiência do método de sensibilização.

O estresse aplicado no dia 0 não influenciou a infiltração celular para as vias aéreas de ratos sensibilizados com OVA: os animais **E-S** não apresentaram significantes diferenças no perfil do infiltrado celular (constituído de $9,9 \pm 1,6 \times 10^6$ leucócitos/LBA, e representado por 12,1% de neutrófilos, 36,4% de eosinófilos e 51,5% de mononucleares), quando comparado aos animais **NE-S** (que apresentaram o infiltrado celular constituído de $10,1 \pm 1,6 \times 10^6$ leucócitos/LBA e representado por 13,9% de neutrófilos, 34,6% de eosinófilos e 51,5% de mononucleares), no LBA colhido em 48 horas após o desafio com OVA (tabela 1 e figura 1- gráficos A, B, C e D). Estes resultados mostram claramente

que o estresse agudo não influenciou a infiltração celular para as vias aéreas de ratos sensibilizados com OVA.

Lavado Broncoalveolar – 48 h após o desafio com OVA

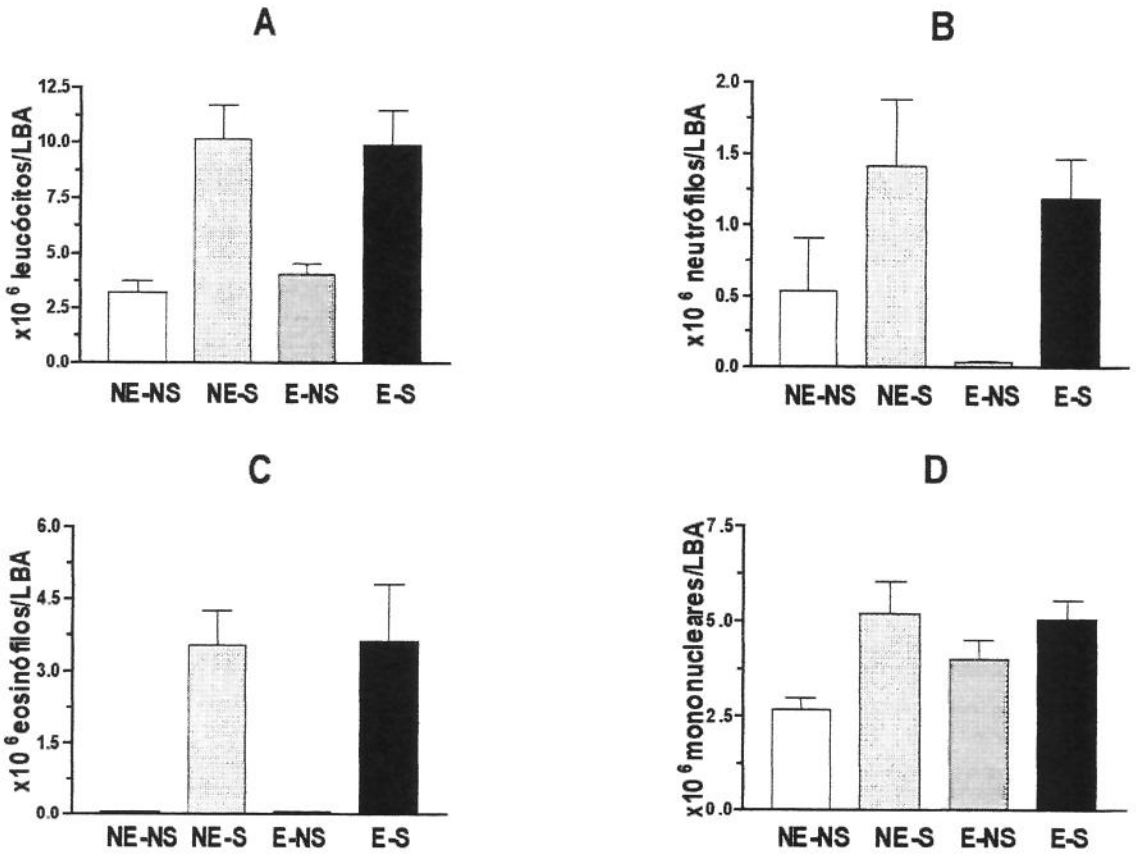


Figura 1: Leucócitos totais (A), neutrófilos (B), eosinófilos (C), mononucleares (D) no LBA dos quatro grupos experimentais (7-8 ratos cada) submetidos ao estresse agudo 15 dias (dia 0) antes do desafio com OVA. As colunas brancas, cinza claro, cinza escuro e preta representam respectivamente: grupo não estressado e não sensibilizado (**NE-NS**), grupo não estressado e sensibilizado (**NE-S**), grupo estressado e não sensibilizado (**E-NS**), grupo estressado e sensibilizado (**E-S**). Os resultados representam a média da contagem de células ± erro padrão da média (E.P.M). Análise Estatística dos dados (ANOVA e Tukey-Kramer) não revelou nenhuma diferença entre os grupos **NE-NS** x **E-NS** e **NE-S** x **E-S.**

Tabela 1: contagem dos leucócitos totais (LT), neutrófilos (NEU), eosinófilos (EOS) e mononucleares (MON) no LBA dos quatro grupos experimentais submetidos ao estresse agudo 15 dias antes do desafio com OVA

	LT	*NEU*	*EOS*	*MON*
NE-NS	3,2 ± 0,6 (8)	0,5 ± 0,4 (8)	0,0 ± 0,0 (8)	2,7 ± 0,3 (8)
NE-S	10,1± 1,6 (8) **	1,4 ± 0,5 (8)	3,5 ± 0,7 (8) **	5,2 ± 0,8 (8) *
E-NS	4,1 ± 0,5 (7)	0,1 ± 0,01 (7)	0,0 ± 0,0 (7)	4,0 ± 0,5 (7)
E-S	9,9 ± 1,6 (8) *	1,2 ± 0,3 (8)	3,6 ± 1,2 (8) **	5,1 ± 0,5 (8)

NE-NS = não estressado e não sensibilizado; **NE-S** = grupo não estressado e sensibilizado; **E-NS** = grupo estressado e não sensibilizado: **E-S** = grupo estressado e sensibilizado.

Os resultados representam a média da contagem de células x 10^6/LBA ± E.P.M. O número de animais por grupo está colocado em parênteses.

*$p<0,05$ e **$p<0,01$ quando comparado ao grupo correspondente não sensibilizado (ANOVA e Tukey-Kramer)

3.2. Infiltrado celular no LBA para o estresse aplicado no dia SETE

Também neste caso, a eficiência da Sensibilização foi comprovada: O LBA dos ratos sensibilizados - **NE-S** e **E-S** - colhido em 48 horas após o desafio com OVA apresentou aumento significativo no influxo de leucócitos totais ($7,5 \pm 2,8 \times 10^6$ células/LBA e $6,5 \pm 0,6 \times 10^6$ células/LBA, respectivamente), quando comparado aos animais não sensibilizados- **NE-NS** e **E-NS** ($0,5 \pm 0,1 \times 10^6$ células/LBA e $0,3 \pm 0,1 \times 10^6$ células/LBA, respectivamente), sendo acompanhado do aumento em neutrófilos, eosinófilos e mononucleares (tabela 2 e figura 2). O aumento do influxo de eosinófilos para os grupos sensibilizados - **NE-S** e **E-S** - ($4,0 \pm 2,6 \times 10^6$ células/LBA e $1,8 \pm 0,4 \times 10^6$ células/LBA) foi significativo ($p<0,05$).

Animais **E-S** no Dia 7 não apresentaram diferenças significativas no perfil do infiltrado celular (constituído de $6,5 \pm 0,6 \times 10^6$ leucócitos/LBA e representado por 3,1% de neutrófilos, 27,7% de eosinófilos e 69,2% de mononucleares), quando comparado aos animais **NE-S** (que apresentaram o infiltrado celular constituído de $7,5 \pm 2,8 \times 10^6$ leucócitos/LBA, e representado por 4,0% de neutrófilos, 53,3% de eosinófilos e 42,7% de mononucleares), no LBA colhido em 48 horas após o desafio com OVA (tabela 1 e figura 1- gráficos A, B, C e D). Portanto, o estresse agudo não influenciou a infiltração celular para as vias aéreas de ratos sensibilizados com OVA.

Lavado Broncoalveolar – 48 h após o desafio com OVA

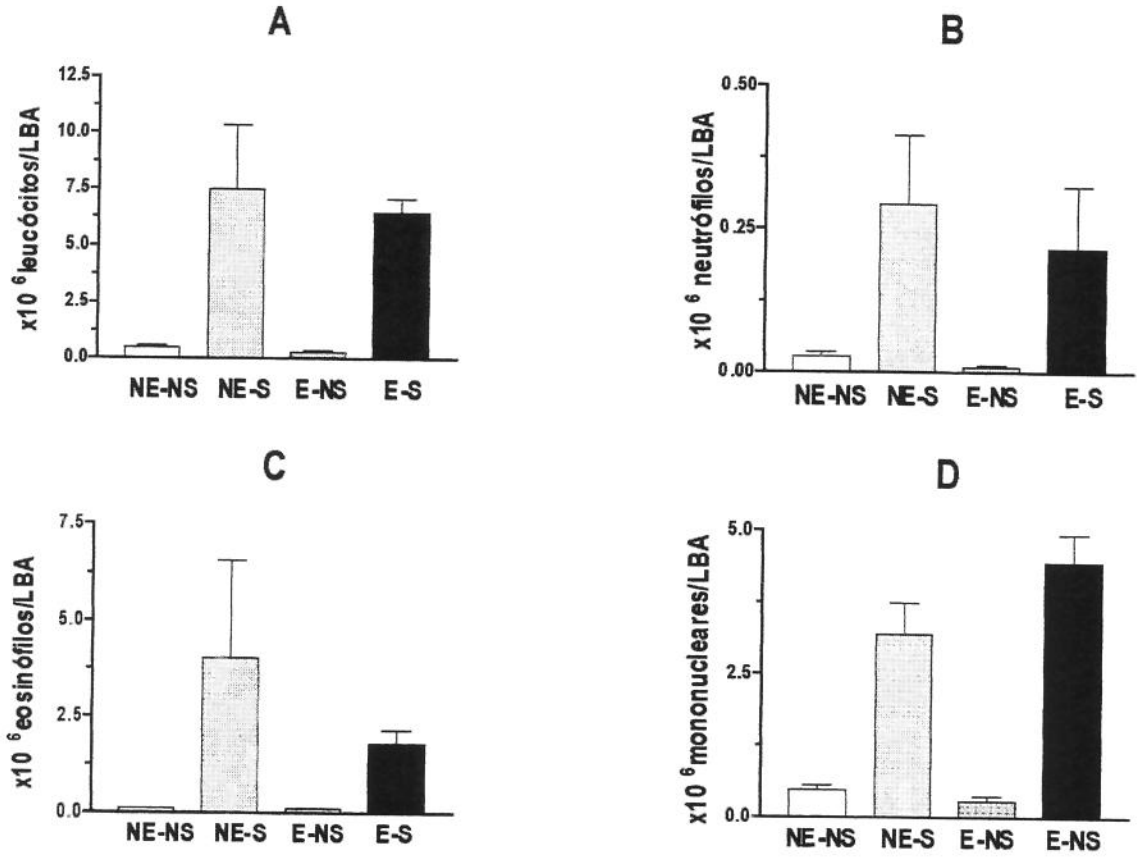


Figura 2: Leucócitos totais (A), neutrófilos (B), eosinófilos (C), mononucleares (D) no LBA dos quatro grupos experimentais (7-8 ratos cada) submetidos ao estresse agudo 7 dias (dia 7) antes do desafio com OVA. As colunas brancas, cinza claro, cinza escuro e preta representam respectivamente: grupo não estressado e não sensibilizado (**NE-NS**), grupo não estressado e sensibilizado (**NE-S**), grupo estressado e não sensibilizado (**E-NS**), grupo estressado e sensibilizado (**E-S**). Os resultados representam a média da contagem de células ± erro padrão da média (E.P.M). Análise Estatística dos dados (ANOVA e Tukey-Kramer) não revelou nenhuma diferença entre os grupos **NE-NS** x **E-NS** e **NE-S** x **E-S.**

Tabela 2: contagem dos leucócitos totais (LT), neutrófilos (NEU), eosinófilos (EOS) e mononucleares (MON) no LBA dos quatro grupos experimentais submetidos ao estresse agudo 07 dias antes do desafio com OVA

	LT	*NEU*	*EOS*	*MON*
NE-NS	0,5 ± 0,1 (7)	0,03 ± 0,01(7)	0,0 ± 0,0 (7)	0,5 ± 0,1 (7)
NE-S	7,5 ± 2,8 (8) *	0,3 ± 0,1 (8)	4,0 ± 2,6 (8)*	3,2 ± 0,5 (8) ***
E-NS	0,3 ± 0,1 (8)	0,01 ± 0,003 (8)	0,01 ± 0,01 (8)	0,3 ± 0,1 (8)
E-S	6,5 ± 0,6 (7) *	0,2 ± 0,1 (7)	1,8 ± 0,4 (7)*	4,5 ± 0,5 (7) ***

NE-NS = não estressado e não sensibilizado; **NE-S** = grupo não estressado e sensibilizado; **E-NS** = grupo estressado e não sensibilizado: **E-S** = grupo estressado e sensibilizado.

Os resultados representam a média da contagem de células x 10^6/LBA ± E.P.M. O número de animais por grupo está colocado em parênteses.

*p<0,05 e ***p<0,001 quando comparado ao grupo correspondente não sensibilizado (ANOVA e Tukey-Kramer)

3.3. Infiltrado celular no LBA para o estresse aplicado no Dia Treze

Ratos sensibilizados - **NE-S** e **E-S** - apresentaram aumento significativo no influxo de leucócitos totais no LBA colhido em 48 horas após o desafio antigênico ($11,0 \pm 2,2 \times 10^6$ células/LBA e $16,3 \pm 3,8 \times 10^6$ células/LBA, respectivamente), quando comparado aos animais não sensibilizados - **NE-NS** e **E-NS** ($2,8 \pm 0,2 \times 10^6$ células/LBA e $3,2 \pm 0,6 \times 10^6$ células/LBA, respectivamente), representado pelo aumento em neutrófilos, eosinófilos e mononucleares (tabela 3 e figura 3). O aumento do influxo de eosinófilos para os grupos sensibilizados - **NE-S** e **E-S** - ($4,4 \pm 1,6 \times 10^6$ células/LBA e $4,6 \pm 1,6 \times 10^6$ células/LBA) foi significativo ($p<0,05$), comprovando a eficiência do método de sensibilização.

O estresse aplicado no dia 13 também não influenciou a infiltração celular para as vias aéreas de ratos sensibilizados com OVA: animais **E-S** não apresentaram diferenças significativas no perfil do infiltrado celular (constituído de $16,3 \pm 3,8 \times 10^6$ leucócitos/LBA e representado por 1,9% de neutrófilos, 28,2% de eosinófilos e 69,9% de mononucleares), quando comparado aos animais **NE-S** (que apresentaram o infiltrado celular constituído de $11,0 \pm 2,2 \times 10^6$ leucócitos/LBA e representado por 1,8% de neutrófilos, 40% de eosinófilos e 58,2% de mononucleares), no LBA colhido em 48 horas após o desafio com OVA (tabela 1 e figura 1- gráficos A, B, C e D).

Lavado Broncoalveolar – 48 h após o desafio com OVA

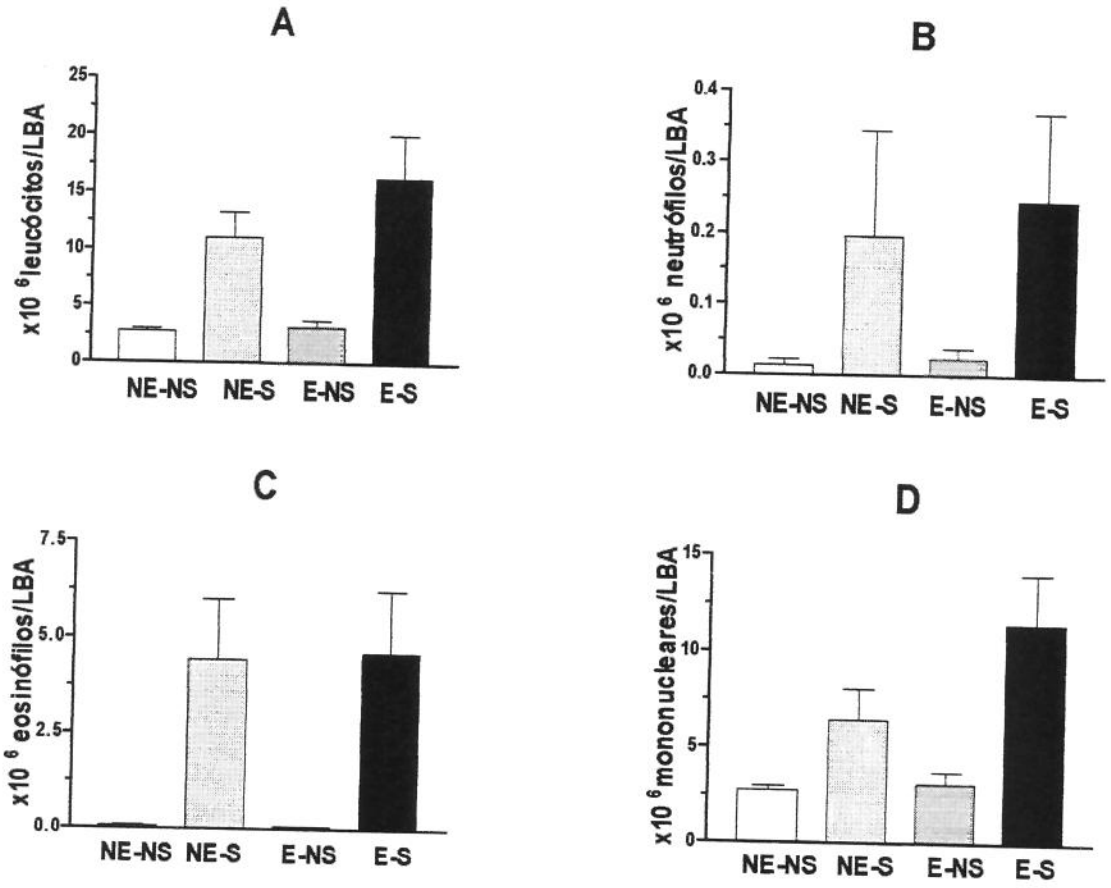


Figura 3: Leucócitos totais (A), neutrófilos (B), eosinófilos (C), mononucleares (D) no LBA dos quatro grupos experimentais (7-8 ratos cada) submetidos ao estresse agudo 1 dia (dia 13) antes do desafio com OVA. As colunas brancas, cinza claro, cinza escuro e preta representam respectivamente: grupo não estressado e não sensibilizado (**NE-NS**), grupo não estressado e sensibilizado (**NE-S**), grupo estressado e não sensibilizado (**E-NS**), grupo estressado e sensibilizado (**E-S**). Os resultados representam a média da contagem de células ± erro padrão da média (E.P.M). Análise Estatística dos dados (ANOVA e Tukey-Kramer) não revelou nenhuma diferença entre os grupos **NE-NS** x **E-NS** e **NE-S** x **E-S.**

Tabela 3: contagem dos leucócitos totais (LT), neutrófilos (NEU), eosinófilos (EOS) e mononucleares (MON) no LBA dos quatro grupos experimentais submetidos ao estresse agudo 01 dia antes do desafio com OVA

	LT	*NEU*	*EOS*	*MON*
NE-NS	2,8 ± 0,2 (8)	0,01 ± 0,01 (8)	0,01 ± 0,003 (8)	2,8 ± 0,2 (8)
NE-S	11,0 ± 2,2 (7)*	0,2 ± 0,2 (7)	4,4 ± 1,6 (7) *	6,4 ± 1,6 (7)
E-NS	3,2 ± 0,6 (8)	0,02 ± 0,01 (8)	0,0 ± 0,0 (8)	3,1 ± 0,6 (8)
E-S	16,3 ± 3,8 (8) *	0,3 ± 0,1 (8)	4,6 ± 1,6 (8) *	11,4 ± 2,6 (8) **

NE-NS = não estressado e não sensibilizado; **NE-S** = grupo não estressado e sensibilizado; **E-NS** = grupo estressado e não sensibilizado: **E-S** = grupo estressado e sensibilizado.

Os resultados representam a média da contagem de células x 10^6/LBA ± E.P.M. O número de animais por grupo está colocado em parênteses.

*p<0,05 e **p<0,01 quando comparado ao grupo correspondente não sensibilizado (ANOVA e Tukey-Kramer)

4. DISCUSSÃO

A noção empírica de que o estresse agudo emocional pode contribuir para o agravamento da asma alérgica tem sido investigada nos últimos anos. Os efeitos imunossupressivos/antiinflamatórios do estresse são conhecidos há mais de seis décadas; entretanto, atualmente tem-se tornado evidente que o estresse não suprime simplesmente todos os aspectos da imunidade, mas resulta em amplas mudanças na imunocompetência aguda e crônica e mesmo na hiperreatividade de em certos componentes da reação imune/inflamatória. Deste modo, é questionado se o estresse agudo poderia influenciar indivíduos asmáticos, através de suas ações sobre os sistemas imune e/ou neuroendócrino, de modo a contribuir para a severidade ou ataque de asma. Os mecanismos pelos quais o estresse age influenciando estes sistemas, ativando-os ou inibindo-os, não estão ainda completamente elucidados.

Estudos clínicos e experimentais têm indicado que o estresse influencia diferentemente os tecidos e células do organismo. Também, as respostas em órgãos-alvo são dependentes das características do estressor (tais como, natureza, freqüência, duração) e do tempo em que o elemento estressante é aplicado em relação ao curso da resposta imune (KELLEY, 1980; SKLAR et al., 1981), bem como da sensibilidade de cada organismo (DORIAN et al., 1982; IRWIN et al., 1987; LINN, LINN, JENSEN, 1984; LIPP et al, 1990). Nós poderíamos deste modo pressupor que o estresse poderia influenciar a resposta imune/inflamatória igualmente tanto em asmáticos quanto em

voluntários saudáveis; enquanto que outros parâmetros sofreriam interferência específica do estresse (sendo mais desregulados em asmáticos); e outros ainda não seriam afetados ou afetados em curto prazo e no decorrer de alguns dias retornado a seu curso normal. Isto está baseado em resultados mistos encontrados em diversos trabalhos que tratam da relação estresse e asma alérgica, onde o estresse parece ativar ou suprimir certos elementos imunes, sem afetar a função pulmonar (KANG et al., 1996).

Este trabalho procurou investigar o efeito do estresse agudo imprevisível e inescapável (por meio de choques elétricos) sobre a infiltração de leucócitos nas vias aéreas, em um modelo experimental de asma alérgica. Os resultados mostraram que a sensibilização com OVA aumentou significativamente o influxo de leucócitos totais e eosinófilos comparado aos ratos não sensibilizados em todos os tempos avaliados. No entanto, a contagem total e diferencial de glóbulos brancos colhidos no LBA de ratos estressados e não estressados foram similares em quaisquer dos tempos estudados. Concluímos que o estresse agudo emocional não afeta a resposta inflamatória do infiltrado celular, não contribuindo, deste modo, para o agravamento da inflamação pulmonar responsável pelos sinais e sintomas do quadro asmático.

A inflamação eosinofílica é característica patognomônica da asma alérgica, e o número de eosinófilos é geralmente diretamente proporcional a severidade da asma. Eosinófilos sintetizam e liberam substâncias pró-inflamatórias, incluindo grânulos protéicos pré-formados, radicais tóxicos de oxigênio, metabólitos do ácido araquidônico, fator de ativação plaquetária e citocinas (BUSSE et al., 1992; KROEGEL et al., 1994). Sendo a Interleucina-5 uma das principais citocinas envolvidas no recrutamento de

eosinófilos na reação inflamatória alérgica, poderíamos sugerir que o estresse agudo não influenciou o nível de IL-5. Também parece provável que o estresse não tenha influenciado mecanismos de recrutamento celulares comuns, já que o perfil leucocitário dos animais sensibilizados submetidos aos choques elétricos inescapáveis foi similar ao dos animais sensibilizados e não estressados. Isto não exclui a possibilidade de que o estresse agudo não deva influenciar outros mecanismos imunológicos.

Vários estudos (PERSOONS et al., 1995a; PERSOONS et al., 1997; BROUG-HOLUB et al., 1998) demonstraram que a exposição ao estresse agudo pode contribuir para a patogênese da asma, através de seus efeitos sobre o comportamento dos macrófagos alveolares, embora não tenha afetado o número ou viabilidade destas células. Macrófagos alveolares de animais estressados, colhidos imediatamente após a sessão de choques e estimulados *in vitro* com LPS, apresentaram mudanças na atividade funcional, com secreção aumentada de IL-1β e TNF-α e diminuição na secreção de NO, com nenhuma alteração na secreção de IL-6. Como os macrófagos (LEE et al., 1991; KAY, 1991), IL-1β (PUJOL et al., 1990; BORISH et al., 1992) e TNF-α (GOSSET et al., 1991; CEMBRZYNSKA-NOWAK et al., 1993) têm ido implicados na patogênese da asma, a alteração comportamental sobre macrófagos alveolares poderia sugerir o papel prejudicial do estresse emocional sobre a asma alérgica. IL-1β tem importante papel na ativação do eixo HPA e na indução da resposta imune (BESEDOVSKY et al, 1986) e seu aumento pelo estresse deve aumentar as respostas imunes pulmonares aos antígenos. O NO tem sido implicado como um dos elementos responsáveis pelas ações supressivas dos macrófagos sobre a proliferação de células T pulmonares (STRICKLAND et al., 1993); o

NO também afeta a broncodilatação por sua influência sobre as células do músculo liso (ELLIS & UNDEM, 1992); portanto níveis diminuídos de NO contribuiriam para a broncoconstrição dos asmáticos. A ação antimicrobiana do NO (JORENS, VERMEIRE, HERMAN, 1993) também tem sido demonstrada; a diminuição observada na formação de NO após exposição ao estresse deveria interferir com a eliminação de microorganismos patogênicos e contribuir para a ocorrência de infecções pulmonares recorrentes observados nos asmáticos (PERSOONS et al., 1995a).

PERSOONS et al. (1997) demonstraram que a atividade secretória de macrófagos alveolares estimulados *in vitro* com LPS é intensidade dependente do evento estressor: a exposição por 20 min, a choques elétricos randômicos inescapáveis na intensidade de 0,8mA nas patas de ratos alteraram mais efetivamente os níveis de IL-1β e NO (aumento e diminuição, respectivamente) do que choques com intensidade de 0,5 mA e 0,25 mA. A imobilização do animal também produziu alteração similar na produção de citocinas (com aumento de IL-1β e diminuição de NO) em relação aos animais controles não estressados. A alteração comportamental sobre macrófagos alveolares também foi dependente do curso do tempo, normalizando-se em 03 dias após o estresse e reaparecendo após 1-2 semanas. CORT e ACTH elevaram-se imediatamente após a sessão de choques, porém este aumento não foi observado nos demais dias testados, permanecendo similares aos valores mensurados nos animais controles. Níveis de ACTH e CORT aumentados em ratos após a sessão de choques também não foram dependentes da intensidade do estresse, sugerindo que a alteração comportamental vista nos

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

macrófagos alveolares não foi mediada pelo eixo HPA, mas sim pela ação direta do SNA (via inervação simpática) ou outros hormônios relacionados ao estresse.

BROUG-HOLUB et al. (1998) demonstraram que as alterações sobre macrófagos alveolares foram mediadas através da via simpática aferente beta - adrenérgica, uma vez que o bloqueio da via parassimpática ou da via simpática alfa-adrenérgica não conduziram a anulação dos efeitos vistos em macrófagos alveolares. A intensidade de receptores beta-adrenérgicos é elevada nos pulmões: cerca de 90% localizam-se na parede alveolar, estes receptores também estão localizados na superfície dos macrófagos alveolares em menor número; portanto as alterações comportamentais sobre macrófagos alveolares mostraram-se mediadas através da ativação destes receptores, possivelmente por meio da ativação dos receptores beta adrenérgicos das células pulmonares alveolares.

A influência do estresse agudo sobre a resposta imune humoral primária e secundária também foi estudada (PERSOONS et al., 1995b). Animais submetidos a choques elétricos inescapáveis (20 min, 4 choques/min; 5 segundos; 0,5 mA) e imunizados imediatamente aos a sessão de choques (com TNP-KLH) apresentaram aumento mais significativo no título de anticorpos específicos ao antígeno, produzidos localmente (pelos nódulos linfáticos paratraqueais) em relação aos animais sensibilizados e não estressados (controles). Este trabalho entra em concordância com os aqueles que apontam as alterações comportamentais sobre macrófagos alveolares (PERSOONS et al., 1995, PERSOONS et al., 1997, BROUG-HOLUB et al., 1998): o estresse agindo sobre a via autonômica simpática, debilitaria a ação defensiva dos macrófagos alveolares (através da produção alterada de citocinas), levando a broncoconstrição e ativação da resposta

imune. Ademais, animais imunizados previamente por via sistêmica e submetidos duas semanas após a metodologia do estresse e subseqüente desafio pulmonar, apresentaram proporção significativamente maior em todos os subtipos de imunoglobulinas; estes autores concluíram que o estresse emocional combinado à exposição ao antígeno deve baixar o limiar de indução da resposta imune, onde poderia contribuir para o ataque ou severidade da asma alérgica. A resposta imune primária mostrou ser também intensidade-dependente do evento estressor, sendo que aumentos mais significativos ocorreram na intensidade de 0,5 mA (PERSOONS et al., 1997).

A liberação induzida pelo estresse de CRH hipotalâmico leva a secreção sistêmica de glicocorticóides, adrenalina e noradrenalina, que influenciam reações imunes/inflamatórias. Também produtos imunes celulares, tais como TNF-α, IL-1-α, IL-1β e IL-6, estimulam a secreção de CRH e ativam o eixo durante o estresse, com aumento de ACTH e CORT (NAKAMURA, MOTOYOSHI, KADOKAWA, 1987; SHARP et al., 1989; NAITOH et al., 1988). Os corticosteróides exercem efeito down-regulatório sobre o eixo HPA e inibem a liberação e/ou ação de citocinas pró-inflamatórias, tais como, IL-1, IL-6, IL-8 e TNF (BLALOCK, SMITH, MEYER, 1985; WAAGE, SLUPPAUG, SHALABY, 1990). Essas citocinas estão envolvidas em várias etapas da reação inflamatória, incluindo alterações vasculares, quimiotaxia de leucócitos, febre, dor e síntese/liberação de proteínas de fase aguda (RIBEIRO et al., 1991; FERREIRA et al., 1993; BAUHMANN & GAULDIE, 1994; ZAMPRONIO et al, 1994).

Desta forma as alterações comportamentais apresentadas sobre macrófagos alveolares (PERSOONS et al., 1995a; PERSOONS et al., 1997; BROUG-HOLUB et al.,

1998) não causariam necessariamente prejuízo na função pulmonar, uma vez que esta ação regulatória entre citocinas e sistema neuroendócrino, através dos glicocorticóides, suprime a resposta inflamatória e imune.

A via autonômica simpática ativada durante o estresse, através de noradrenalina e adrenalina, se propõe em preparar o organismo para a luta e/ou fuga, defendendo-o do agente estressor. Simultaneamente, o cortisol liberado durante o estresse tem papel modulatório sobre o eixo HPA, contribuindo para restabelecer a homeostase do organismo, uma vez que a energia foi desviada para a luta e/ou fuga. Desta forma, podemos esperar que o estresse agudo poderia não influenciar a broncoconstrição nos asmáticos, desde que o eixo HPA não estivesse desregulado nestes indivíduos. O mesmo raciocínio pode ser ampliado para o controle da resposta imune/inflamatória. Glicocorticóides previnem a migração de leucócitos da circulação para os espaços extravasculares, reduzem o acúmulo de monócitos e granulócitos nos sítios da inflamação e suprimem a produção e /ou ações de muitas citocinas e mediadores inflamatórios pelas células do sistema imune (CHROUSOS, 1995).

O estresse agudo tem influência sobre os leucócitos sanguíneos, e estas mudanças podem ser explicadas através de respostas adrenocorticais ao estressor ambiental. BROHEE et al. (1990) verificaram o efeito agudo do estresse farmacológico (por administração intravenosa de adrenalina e hidrocortisona) sobre leucócitos em humanos saudáveis. Aos 10 min da administração de adrenalina e hidrocortisona, todos os subtipos de leucócitos estavam aumentados, especialmente mononucleares. Em 1 hora, ocorreram

1998) não causariam necessariamente prejuízo na função pulmonar, uma vez que esta ação regulatória entre citocinas e sistema neuroendócrino, através dos glicocorticóides, suprime a resposta inflamatória e imune.

A via autonômica simpática ativada durante o estresse, através de noradrenalina e adrenalina, se propõe em preparar o organismo para a luta e/ou fuga, defendendo-o do agente estressor. Simultaneamente, o cortisol liberado durante o estresse tem papel modulatório sobre o eixo HPA, contribuindo para restabelecer a homeostase do organismo, uma vez que a energia foi desviada para a luta e/ou fuga. Desta forma, podemos esperar que o estresse agudo poderia não influenciar a broncoconstrição nos asmáticos, desde que o eixo HPA não estivesse desregulado nestes indivíduos. O mesmo raciocínio pode ser ampliado para o controle da resposta imune/inflamatória. Glicocorticóides previnem a migração de leucócitos da circulação para os espaços extravasculares, reduzem o acúmulo de monócitos e granulócitos nos sítios da inflamação e suprimem a produção e /ou ações de muitas citocinas e mediadores inflamatórios pelas células do sistema imune (CHROUSOS, 1995).

O estresse agudo tem influência sobre os leucócitos sanguíneos, e estas mudanças podem ser explicadas através de respostas adrenocorticais ao estressor ambiental. BROHEE et al. (1990) verificaram o efeito agudo do estresse farmacológico (por administração intravenosa de adrenalina e hidrocortisona) sobre leucócitos em humanos saudáveis. Aos 10 min da administração de adrenalina e hidrocortisona, todos os subtipos de leucócitos estavam aumentados, especialmente mononucleares. Em 1 hora, ocorreram

linfopenia e monocitopenia moderadas e após 6h, neutrofilia e eosinopenia foram observadas. Todos as alterações foram normalizadas em 24 horas do estudo.

Nosso trabalho não encontrou alterações significativas em níveis de eosinófilos no LBA de animais estressados, quando comparado com o grupo sensibilizado não estressado. Desde que eosinófilos têm importante participação na severidade de asma, isto leva-nos a concluir que o estresse agudo não deve, por si só, prejudicar a função pulmonar. De fato, muitos trabalhos também não encontraram alterações na resposta pulmonar em asmáticos quando submetidos ao estresse emocional, conforme discutidos a seguir.

A influência dos exames acadêmicos sobre a imunidade e função pulmonar foi investigada em estudantes saudáveis e asmáticos (forma leve e severa, ambas controladas com medicação) em três ocasiões (antes, durante e após os exames; KANG et al, 1996). O estresse influenciou diferentemente a resposta imune nos três tempos, porém as mudanças imunológicas e a função pulmonar geralmente não diferiram entre controles e asmáticos, mostrando que os exames são causa importante de alteração nas respostas imunes/inflamatórias, embora não leve a um concomitante agravamento da doença inflamatória em asmáticos controlados. O número total de leucócitos e fagócitos não alterou ao longo do estudo; também não se observaram diferenças quanto ao número de eosinófilos e neutrófilos entre saudáveis e asmáticos durante o semestre. No entanto, exames finais afetaram linfócitos totais e seus subtipos, com aumento durante e após os exames finais. Eosinófilos têm estreita relação com a patogênese da asma, o estresse não afetou seu número diferentemente entre saudáveis e asmáticos, nem prejudicou a função

pulmonar. Isto está de acordo com nosso trabalho, uma vez que não observamos diferença significativa na resposta inflamatória entre estressados e não-estressados.

A exacerbação da sintomatologia da asma tem sido ligada previamente a estressores psicológicos e emocionais, postulando-se que caminhos neuroendócrinos e imunológicos/inflamatórios medeiam a broncoconstrição induzida pelo estresse. Embora, mudanças imunológicas tenham sido observadas durante exames acadêmicos (KANG et al., 1996), estas foram na maioria das vezes similares entre controles e asmáticos, e não contribuíram para agravar a reatividade pulmonar e desestabilizar o fluxo expiratório. No entanto, estes autores não descartaram a importância do estresse caso os indivíduos atópicos fossem expostos a um outro fator desencadeador, como por exemplo, um patógeno respiratório virulento.

A maioria dos pacientes com asma acredita que fatores psicológicos, particularmente o estresse, podem induzir a ataques de asma. RIETVELD, VAN BEEST, EVERAERD (1999) testaram a hipótese que o estresse induz a dispnéia, sem levar, no entanto à obstrução das vias aéreas. Estresse emocional foi induzido em adolescentes com asma e voluntários saudáveis por meio de tarefa mental frustrante; nenhum dos participantes desenvolveu obstrução das vias aéreas ou redução na função pulmonar. Entretanto, a dispnéia aumentou em muitos pacientes com asma em relação a indivíduos saudáveis.

RIETVELD & PRINS (1998) também compararam a relação entre emoções negativas aos sintomas objetivos (obstrução das vias aéreas) e subjetivos (dispnéia) da asma. Quarenta crianças asmáticas foram randomicamente divididas em quatro grupos:

aquelas submetidas a um estado anterior de ansiedade (por meio de visualização de um filme atemorizante), submetidas à tarefa física frustrante, as que assistiram ao filme antes de executar o exercício; aquelas que foram submetidas previamente ao exercício antes de visualizar o filme. Dispnéia e obstrução das vias aéreas aumentaram significativamente somente nos grupos que participaram do exercício físico. O estresse psicológico por si só não afetou os sintomas subjetivos e objetivos da asma. A dispnéia foi mais intensa no grupo submetido ao estresse emocional antes da tarefa física, e mostrou ser estatisticamente independente da função pulmonar e severidade da asma, ansiedade e idade. Estes autores concluíram que as emoções negativas afetam sintomas subjetivos da asma, sem afetar a função pulmonar. Isto sugere que as crianças com asma, quando submetidas a condições estressantes, estão inclinadas a interpretar sensações gerais relacionadas à ativação simpática decorrente da resposta estresse (fadiga, palpitação, falta de ar) aos sintomas de agravamento de asma.

KOTSES, HINDI-ALEXANDER, CREER (1989) demonstraram que indivíduos saudáveis e asmáticos exibem mudanças nas vias aéreas similares em resposta ao estresse emocional, significando que estas alterações representam uma resposta geral e fisiológica do organismo ao estresse, sem, contudo representar correlação com a severidade da asma.

Portanto, o estresse agudo emocional poderia não necessariamente contribuir para a severidade do quadro asmático, principalmente quando os asmáticos recebem adequada medicação e onde é feito controle ambiental. Parece certo que o estresse afeta o sistema imune de asmáticos e saudáveis de modo diferente, conforme o parâmetro celular observado e o tempo em que ocorre o evento estressante e são estudadas as respostas

imunes; enquanto que outras vias parecem ser igualmente afetadas tanto em asmáticos e controles. No entanto, a atividade broncoalveolar não é afetada, desde que exista regulação pela via hipotalâmica-pituitária-adrenal.

No entanto, o estresse crônico deve ser mais impactante em sua influência na resposta imune/inflamatória, de modo a contribuir com a severidade e ataque de asma, uma vez que pode estar relacionado ao desgaste do eixo HPA, com excesso de CRH e baixa disponibilidade de CORT, tornando o sistema imunológico do individuo mais susceptível ao desafio antigênico.

O fenômeno do hipocortisolismo tem sido achado em pacientes que desenvolveram desordem do estresse pós-traumático. Também é um fenômeno encontrado em indivíduos saudáveis vivendo sob estresse crônico e certas doenças como fibromialgia, artrite reumatóide e asma. Embora sendo freqüente, sua natureza parece ser complexa; o estresse crônico poderia levar ao desregulação do eixo hipotálamo-pituitário-adrenal e a menor disponibilidade de cortisol, deste modo contribuindo para vulnerabilidade aumentada ao desenvolvimento de doenças estresse-relacionadas (HEIM, EHLERT, HELLHAMMER, 2000). Sabe-se que filhos de pais estressados estão sujeitos a maior incidência de problemas respiratórios (STOTT, 1973), uma vez que o estresse crônico pré-natal exerceu influência sobre o eixo HPA e o aparato imunológico. Também poderíamos pressupor que o estresse agudo somado a poluição atmosférica exerceria efeito desencadeador nestes indivíduos mais susceptíveis, e também naqueles sujeitos aos diversos estressores crônicos presentes em nossa sociedade.

5. *CONCLUSÕES*

Este trabalho permite concluir que:

1. Em ratos sensibilizados (NE-S e E-S) o desafio intratraqueal com OVA aumentou significativamente o número de leucócitos totais e o influxo de eosinófilos comparados aos ratos controles (NE-NS e E-NS)
2. Não houve diferenças significativas quanto ao número de leucócitos totais, eosinófilos, neutrófilos e células mononucleares entre animais não estressados (NE-NS e NE-S) e estressados (E-NS e E-S).
3. O estresse agudo não influencia a infiltração de leucócitos para as vias aéreas de animais sensibilizados com OVA.

6. *SUMMARY*

In this study we exposed female Wistar rats to a acute emotional stress paradigm (inescapable foot-shock) and studied the allergen-induced airway inflammation by counting the total and differential leukocyte in the bronchoalveolar lavage fluid. Wistar rats sensitized with ovalbumin (OVA)- s.c. injection of 0.15 ml solution containing 200 μg of OVA and 8 mg $Al(OH)_3$ prepared in saline or $Al(OH)_3$ (controls). Sensitized and control rats underwent acute stress (one session of 60 1 mA inescapable foot-shocks) 15 days, 7 days or 1 day before an 0VA challenge on the 14^{th} day after sensitization. The above protocol resulted in four experimental groups (7-8 rats each): 1) NS-NS, non-stressed and non-sensitized, 2) NS-S, non-stressed but sensitized, 3) S-NS, stressed but non-sensitized and 4) S-S, stressed and sensitized. In all cases, total and differential cell counts were done on bronchoalveolar lavage (BAL) fluid collected 48 h after the OVA challenge. In sensitized rats (NS-S and S-S), intratracheal challenge with OVA significantly ($p<0,05$) increased the total leukocyte and eosinophil influx compared to control rats (NS-NS and S-NS) throughout the study. However, there were no significant differences in the numbers of circulating total leukocytes, eosinophils, neutrophils and mononuclear cells between control and stressed rats. These results show that acute stress does not influence leukocyte infiltration into the airways of OVA-sensitized rats.

7. *REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ADER, R.; COHEN, N.; GROTA, L.J. - Adrenal involvement in conditioned immunosupretion. **Int. J. Pharm. 1:**141-5, 1979.

ADER, R. & COHEN, N. - Behaviorally conditioned immunosuppression. **Psychosom. Med. 37:**333-40, 1975.

ADER, R. & COHEN, N. - Behaviorally conditioned immunosuppression and murine systemic lupus erythematosus. **Science. 215:** 534-6, 1982.

AMAT, J.; TORRES, R.A.; LECHIN, F. – Differential effect of footshock stress on humoral and cellular immune responses of the rat. **Life Sciences; 53:**315, 1993.

ANISMAN, H.; ZALCMAN, S.; ZACHARKO, R.M. - The impact of stressors on immune and central neurotransmitter activity: bidirectional communication. **Rev. Neurosci., 4:**147-80, 1993.

AZZAWI, M.; BRADLEY, B.; JEFFERY, P.K.; FREW, A.J.; WARDLAW, A.J., KNOWLES, G.; ASSOUFI, B.; COLLINS, J.V.; DURHAM, S; KAY, A.B. - Identification of activated T lymphocytes and eosinophils in bronchial biopsies in stable atopic asthma. **Am. Rev. Respir. Dis., 142:**1407-13, 1990.

BAUHMANN, H. & GALUKIE, J. – The acute phase response. **Immunology Today, 15:**74, 1994.

BENTLEY, A.M.; MENZ, G.; STORZ, C.; ROBINSON, D.S.; BRADLEY, B.; JEFFERY, P.K.; DURHAM, S.R.; KAY, A B. - Identification of T lymphocytes, macrophages, and activated eosinophils in the bronchial mucosa in intrinsic asthma. Relationship to symptoms and bronchial responsiveness. **Am. Rev. Respir. Dis., 146:**500-6, 1992.

BESEDOVSKY, H.O.; DEL REY, A.; SORKIN, E.; DINARELLO, C.A. – Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. **Science, 223:**652-4, 1986.

BLALOCK, J.E.; SMITH, E.M.; MEYER III, W. – The pituitary-adrenocortical axis and the immune system. **J. Clinical Endocrinology and Metabolism, 14:** 1021,1985.

BLECHA, F.; BARRY, R.A.; KELLEY, K.W. - Stress-induced alterations in delayed-type hypersensitivity to SRBC and contact sensitivity to DNFB in mice. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 169:**239-46, 1982.

BOCHNER, B.S.; UNDEM, B.J.; LICHTENSTEIN, L.M. - Immunological aspects of allergic asthma. **Annu. Rev. Immunol., 12:**295-335, 1994.

BORISH, L.; MASCALI, J.J.; DISHUCK, J.; BEAM, W.R.; MARTIN, R.J; ROSENWASSER, L.J. - Detection of alveolar macrophage-derived IL-1β in asthma. **J. Immunol., 149:** 3078-82, 1992.

BOUSQUET, J.; CHANEZ, P.; LACOSTE, J.Y.; BARNEON, G.; GHAVANIAN, N.; ENANDER, I.; VENGE, P.; AHLSTEDT, S.; SIMONY-LAFONTAINE, J.; GODARD, P. - Eosinophilic inflammation in asthma. **N. Engl. J. Med., 323:** 1033-9, 1990.

BRADLEY, B.L.; AZZAWI, M.; JACOBSON, M.; ASSOUFI, B.; COLLINS, J.V.; IRANI, A.M.; SCHWARTZ, L.B.; DURHAM, S.R.; JEFFERY, P.K.; KAY, A.B. - Eosinophils, T-lymphocytes, mast cells, neutrophils, and macrophages in bronchial biopsy specimens from atopic subjects with asthma: comparison with biopsy specimens from atopic subjects without asthma and normal control subjects and relationship to bronchial hyperresponsiveness. **J. Allergy Clin. Immunol., 88:** 661-74, 1991.

BROHEE, D.; VANHAEVERBEEK, M.; KENNES, B.; NEVE, P.- Leukocyte and lymphocyte subsets after a short pharmacological stress by intravenous epinephrine and hydrocortisone in healthy humans. **Int. J. Neurosci., 53:**53-62, 1990.

BROUG-HOLUB, E.; PERSOONS, J.H.; SCHORNAGEL, K.; MASTBERGEN, S.C.; KRAAL, G. - Effects of stress on alveolar macrophages: a role for the sympathetic nervous system. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 19:**842-8, 1998.

BUSSE, W.W. & SEDGWICK, J.B. - Eosinophils in asthma. **Ann. Alergy, 68:**286-90, 1992.

CAMARGOS, P.A.; CASTRO, R.M.; FELDMAN, J.S. - Prevalence of symptoms related to asthma in school children of Campos Gerais, Brazil. **Rev. Panam. Salud. Publica, 6:** 8-15, 1999.

CEMBRZNSKA-NOWAK, M.; SZKLARZ, E.; INGLOT, A.D.; TEODORCZYK-INJEYAN, J. A. - Elevated release of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma by bronchoalveolar leukocytes from patientes with bronchial asthma. **Am. Rev. Respir. Dis., 147:** 291-5, 1993.

CHROUSOS,G.P. - The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immune-mediated inflammation. **N. Engl. J. Med., 332:**1351-62, 1995.

COLERIDGE, JCG. & COLERIDGE, HM. – Afferent vagal C innervation of the lungs and airways and its functional significance. **Ver. Psycol. Biochem. Pharmacol., 99:** 1-110, 1984.

CONNOR, T.J. & LEONARD, B.E. - Depression, stress and immunological activation: the role of cytokines in depressive disorders. **Life Sci., 62:**583-606, 1998.

CROISET, G.; HEIJNEN, C.J.; VELDHUIS, H.D.; DE WIED, D.; BALLIEUX, R.E. - Modulation of the immune response by emotional stress. **Life Sci., 40:** 775-82, 1987.

DANTZER, R. & KELLEY, K.W. - Stress and immunity: an integrated view of relationships between the brain and the immune system. **Life Sci., 44:** 1995-2008, 1989.

DORIAN, B.J.; GARFINKEL, P..; BROWN, G.; SHORE, A.; GLADMAN, D.; KEYSTONE, E. - Aberrations in lymphocyte subpopulations and function during psychological stress. **Clin. Exp. Immunol., 50:**132-8, 1982.

ELLIS, J.L. & UNDEM, B.J. - Inhibition by L-NG-nitro-L-arginine of nonadrenergic-noncholinergic-mediated relaxations of human isolated central and peripheral airways. **Am. Rev. Respir. Dis., 146:**1543-7, 1992.

FERNANDES, A.L.G.; CAETANO, L.S.B. - Asma brônquica. In: PRADO, F. C.; RAMOS, J.; VALLE, J.R.; RAMOS, O.L.; ROTHSCHILD, H.A., ed.- **Atualização Terapêutica. Manual Prático de Diagnóstico e Tratamento.** 18 ed. São Paulo, livraria Editora Artes Médicas Ltda. 1997. p.90-4.

FERREIRA, S.H.; LORENZETTI, B.B.; CUNHA, F.Q.; POOLE, S. – Bradykinin release of TNF-α plays a key role in the development of inflammatory hyperalgesia. **Agents and Actions, 38:**C7, 1993

GOSSET, P.; TSICOPOULOS, A.; WALLAERT, B.; VANNIMENUS, C.; JOSEPH, M.; TONNEL, A. B.; CAPRON, A. - Increased secretion of tumor necrosis factor-α and interleukin-6 by alveolar macrophages consecutive to the development of the late asthmatic reaction. **J. Allergy Clin. Immunol., 88:**561-71, 1991.

GROSS, W.B. & COLMANO, G. – The effect of social isolation on resistance to some infectious diseases. **Poult Sci., 48:** 514-20, 1969.

GROSS, W.B. - Effect of social stress on occurence of Marek's disease in chickens. **Am. J. Vet. Res., 33:** 2275-9, 1972.

HEIM, C.; EHLERT, U.; HELLHAMMER, D.H. - The potential role of hypocortisolism in the pathophysiology of stress-related bodily disorders. **Psychoneuroendocrinology, 25:**1-35, 2000.

HERMINI, A.H.; TEIXEIRA, N.A.; MENDES, V.E.; PEREIRA, D.G. – Development of a software to control depression experiments through the "learned helplessness". **Physics in Medicine and Biology, 39a** (part 1):430, 1994.

IRWIN, M.; DANIELS, M.; SMITH, T.L.; BLOOM, E.; WEINER, H. – Impaired natural killer cell activity during bereavement. **Brain Behav. Immun., 1:**98-104, 1987.

JORENS, P.G.; VERMEIRE, P.A.; HERMAN, A.G. - L-arginine-dependent nitric oxide synthase: a new metabolic pathway in the lung and airways. **Eur. J. Immunol., 6:**258-66, 1993.

KANG, D.H.; COE, C.L.; McCARTHY, D.O. - Academic examinations significantly impact immune responses, but not lung function, in healthy and well-managed asthmatic adolescents. **Brain Behav. Immun., 10:**164-81, 1996.

KATZ, P.P. & YELIN, E.H. - Prevalence and correlates of depressive symptoms among persons with rheumatoid arthritis. **J. Rheumatol., 20:**790-6, 1993.

KAY, A. B. - Asthma and inflammation. **J. Allergy Clin. Immunol., 87:** 893-910, 1991.

KELLEY, K.W. – Stress and immune function: a bibliographic review. **Ann. Rech. Vet., 11:**445-78, 1980.

KHANSARI, D.N; MURGO, A.J.; FAITH, R.E. – Effects of stress on the immune system. **Immunol. Today, 11:**170-5, 1990.

KOTSES, H.; HINDI-ALEXANDER, M.; CREER, T.L. - A reinterpretation of psychologically induced airways changes. **J. Asthma, 26:**53-63, 1989.

KROEGEL, C.; VIRCHOW, J.C.Jr.; LUTTMANN, W.; WALKER, C.; WARNER, J.A.- Pulmonary immune cells in health and disease: the eosinophil leucocyte. **Eu. Resp. J., 7:**519-43, 1994

LANDENSLAGER, M.L.; RYAN, S.M.; DRUGAN, R.C.; HYSON, R.L.; MAIER, S.F. – Coping and Immunossuppression: inescapable but not escapable shock suppresses lymphocyte proliferation. **Science, 221:**568,1983.

LEE, T.H.; POSTON, R.; GODARD, P.; BOUSQUET, J. - Macrophages and allergic asthma. **Clin. Exp. Allergy, 21:**22-3, 1991.

LINN, M.W.; LINN, B.S.; JENSEN, J. - Stressful events, dysphoric mood,and immune responsiveness. **Psychol. Rep., 54:**219-22, 1984.

LIPP, M.N.; ROMANO, A.S.P.F.; COVOLAN, M.A.; NERY, M.J.G.S. – **Como enfrentar o stress.** 3. ed. Campinas, Ícone 1990. 91p (Coleção Como enfrentar...).

MINDEN, S.L. & SCHIFFER R.B. - Affective disorders in multiple sclerosis. **Arch. Neurol.., 47:**98-104, 1990.

MONJAN, A.A. & COLLECTOR, M.I. - Stress-induced modulation of the immune response. **Science, 196 :**307-8, 1977.

MURRAY, J.B. - New trends in psychosomatic research. **Genet Psychol Monogr., 96**:3-74, 1977.

NAIATOH, Y.; FUKATA, J.; TOMINIGA, T.; TAMAI, S.; MORI, K.; IMURA, H. – Interleukin-6 stimulates the secretion of adrenocorticotropic hormone in conscious, freely-moving rats. **Biochem. Biophys. Res. Commun., 155:**1459-63, 1988.

NAKAMURA, H.; MOTOYOSHI, S; KADOKAWA, T. - Anti-inflammatory action of interleukin-1 through the pituitary-adrenal axis in rats. **Eur. J. Pharmacol., 151:**67-73, 1989.

NASPITZ, C.K. & SOLÉ, D. – Asma brônquica. In: PRADO, F. C.; RAMOS, J.; VALLE, J.R.; RAMOS, O.L.; ROTHSCHILD, H.A., ed.- **Atualização Terapêutica. Manual Prático de Diagnóstico e Tratamento.** 18 ed. São Paulo, livraria Editora Artes Médicas Ltda. 1997. p.618-21

NOGUEIRA, P.J.; FERREIRA, H.H.; ANTUNES, E.; TEIXEIRA, N.A. -Chronic mild prenatal stress exacerbates the allergen-induced airway inflammation in rats. **Mediators Inflamm., 8:**119-22, 1999.

PERSOONS, J.H.; BERKENBOSCH, F.; SCHORNAGEL, K.; THEPEN, T.; KRAAL, G. – Increased specific IgE production in lungs after the induction of acute stress in rats. **J. Allergy Clin. Immunol., 95:**765-70, 1995b.

PERSOONS, J.H.; MOES, N.M.; BROUG-HOLUB, E.; SCHORNAGEL, K.; TILDERS, F.J.; KRAAL, G. - Acute and long-term effects of stressors on pulmonary immune functions. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 17:** 03-8, 1997.

PERSOONS, J.H.; SCHORNAGEL, K.; BREVE, J.; BERKENBOSCH, F.; KRAAL, G. - Acute stress affects cytokines and nitric oxide production by alveolar macrophages differently. **Am. J. Respir. Crit. Care Med., 152:**619-24, 1995b.

PORSOLT, R.D.; LEPICHON, M.; JALFRE, M. - Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatment. **Nature, 226:**730-2, 1977.

PUJOL, J.; COSSO, B.; DAURES, J.; CLOT, J.; MICHEL, F.; GODARD, P. - Interleukin-1 release by alveolar macrophages in asthmatic patients and healthy subjects. **Int. Arch. Allergy Appl. Immun., 91:**207-10, 1990.

RIBEIRO, R.A.; FLORES, C.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. – IL-8 causes *in vivo* neutrophil migration by a cell-dependent mechanism. **Immunol.,73:**472, 1991

RIETVELD, S. & PRINS, P.J. – The relationship between negative emotions and acute subjective and objective symptoms of childhood asthma. **Psychol. Med.,28:**407-15, 1998.

RIETVELD, S.; VAN BEEST, I.; EVERAERD, W. - Stress-induced breathlessness in asthma. **Psychol Med., 29:**1359-66, 1999.

ROCHE, W.R.; BEASLEY, R.; WILLIAMS, J.H.; HOLGATE, S.T. - Subepithelial fibrosis in the bronchi of asthmatics. **Lancet, 1:** 520-4, 1989.

SAKIC, B.; SZECHTMAN, H.; TALANGBAYAN, H.; DENBURG, S.D.; CARBOTTE, R.M.; DENBURG, J.A. - Disturbed emotionality in autoimmune MRL-lpr mice. **Physiol. Behav., 56:**609-17, 1994.

SELYE, H. - A syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature, 138:**32, 1936.

SHARP, B.M.; MATTA, S.G.; PETERSON, P.K.; NEWTON, R.; CHAO, C.; McALLEN, K. – Tumor necrosis factor-α is a potent ACTH secretagogue: comparison to interleukin-1β. **Endocrinology, 124:**3131-3, 1989.

SKLAR, LS.; BRUTO, V.; ANISMAM, H. - Adaptation to the tumor-enhancing effects of stress. **Psychosom. Med., 43:**331-42, 1981.

SMITH, R.S. – The immune system is a key factor in the etiology of psychosocial disease. **Medical Hypotheses, 34:**49, 1991a

SMITH R.S. – The macrophage theory of depression. **Medical Hypotheses, 35:**298, 1991b.

SOCIEDADE PRÓ ALÉRGICO EM ESTUDOS, PESQUISAS E DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO. – **Avanços no diagnóstico e tratamento das alergias**. Rio de Janeiro, 1996. 109p.

STOTT, D.F. - Follow-up study from birth of the effects of prenatal stress. **Dev. Med. Child. Neurol. 15:**770-87, 1973.

STRICKLAND, D.H.; THEPEN, T.; KEES, U.R.; KRAAL, G.; HOLT, P.G. - Regulation of T-cell function in lung tissue by pulmonary alveolar macrophages. **Immunology, 80:**266-72, 1993.

TESHIMA, H.; IRIE, M.; SOGAWA, H.; NAKAGAWA, T. - Long-term follow-up investigation of the effects of the biopsychosocial approach (BPSA) to bronchial asthma. **Fukuoka Igaku Zasshi, 82:**609-17, 1991.

UNDEM, B.J.; HUBBARD, W.; WEINREICH, D. – Immunological induced neuromodulation of guinea pig nodose ganglion neurons. **J. Auton. Nerv. Syst., 44:** 35-44, 1993.

UNDEM, B.J. & WEINREICH, D. – Electrophsiological properties and chemosensitivity of guinea pig nodose ganglion neurons in vitro. **J. Auton. Nerv. Syst., 44:**17-33, 1993.

VENTURA, D.G.; PAIXÃO E SILVA, S.; DA-SILVA, V.A.; TEIXEIRA, N.A.; CASTRO-FARIA-NETO, H.C., ALTENBURG, S.P. - Avaliação da migração de neutrófilos induzida pelo LPS em ratos submetidos à natação forçada. In: Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental, XIV, Caxambu-MG/BrasiL, 1999. **Abstract 14.134, p.404**.

WAAGE, A.; SLUPPAUG, G.; SHALABY, R. - Glucocorticoids inhibit the production of IL-6 from monocytes, endothelial cells and fribroblasts. **Eur. J. Immunol.,20:**2439;1990.

WAYNER, E.A.; FLANNERY, G.R.; SINGER, G. - Effect of taste aversion conditioning on the primary antibody response to sheep red blood cells and Brucela abortus in the albino rat. **Physiol. Begav. 21:**995-1000, 1978.

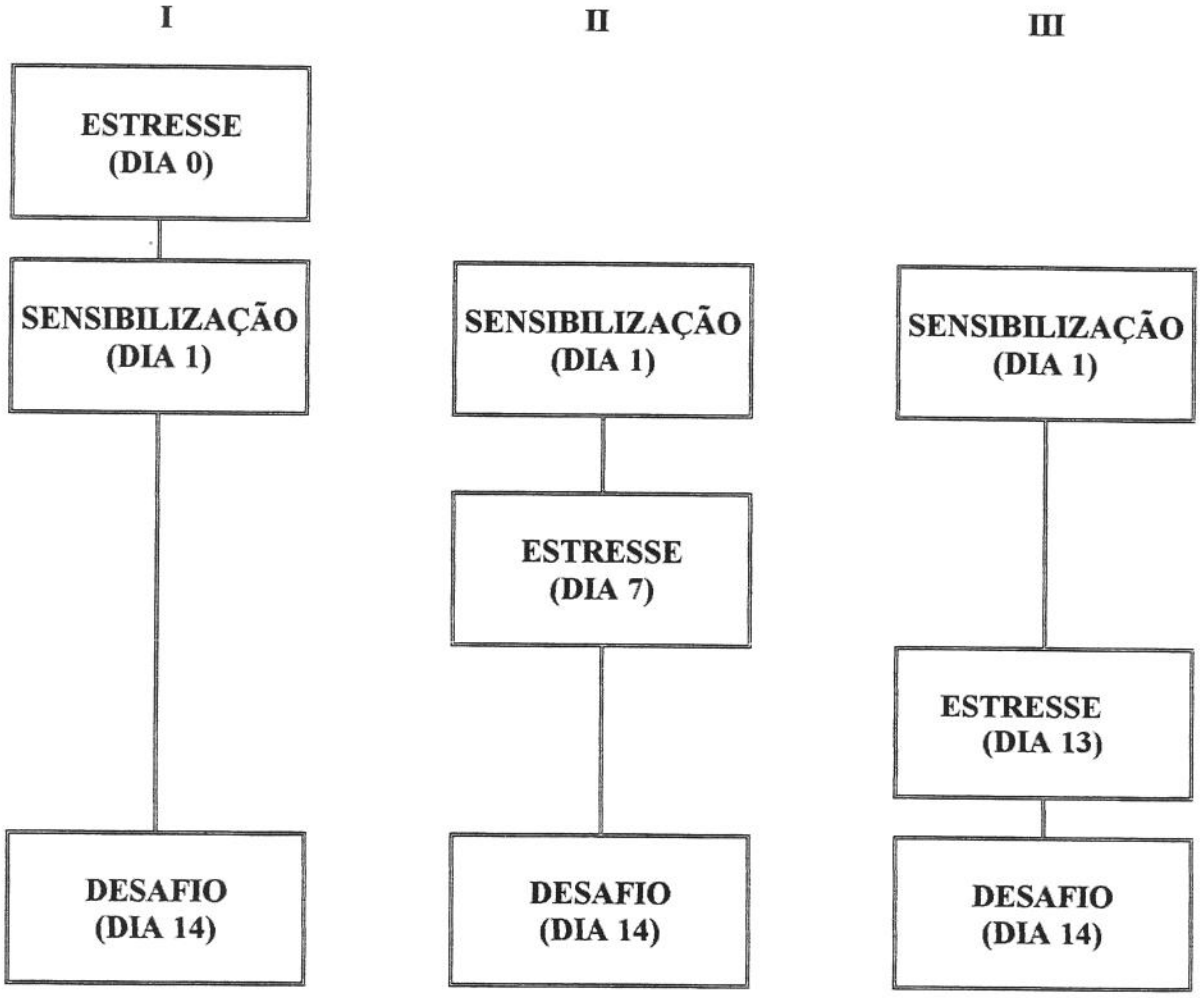
WEINSTEIN, A.M. – What is asthma?. In: _____ - **Asthma**. New York, McGraw-Hill book Company , 1987a. p.3-15.

WEINSTEIN, A.M. – Factors that can trigger asthma symptoms. In: _____ - **Asthma**. New York, McGraw-Hill book Company , 1987b. p.16-51.

ZAMPRONIO, A.R.; SOUZA, G.E.P.; SILVA, C. A.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S. H. – Interleukin-8 induces fever by a prostaglandin-independent mechanism. **Am. J. Physiol., 266:** 1670, 1994.

8. *ANEXOS*

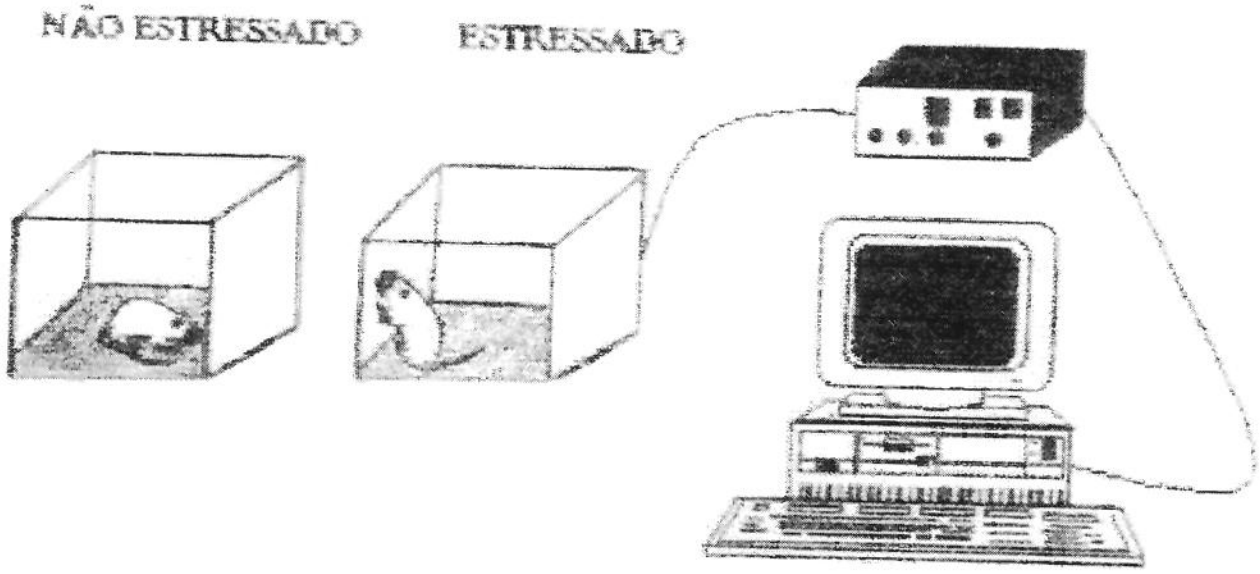
8.1 Protocolos do Estresse



I - Estresse aplicado no dia ZERO;

II - Estresse aplicado no dia SETE;

III- Estresse aplicado no dia TREZE

8.2. Caixa de Choques Inescapáveis

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE