

MARCELO DATTI

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL
SEÇÃO CIRCULANTE

Efeitos do estresse crônico pré-natal sobre a resposta
inflamatória em ratos

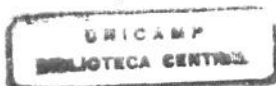
Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação de Mestrado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas - UNICAMP, para obtenção do Título de Mestre em Farmacologia do Farmacêutico Marcelo Datti.

Campinas, 25 de maio de 2001.

Nancy Airolde Teixeira
Profª. Dra. Nancy Airolde Teixeira
- Orientadora -

CAMPINAS

2001



MARCELO DATTI

Efeitos do estresse crônico pré-natal sobre a resposta
inflamatória 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 Airoidi Teixeira

Co-orientador: Prof. Dr. Edson Antunes

CAMPINAS

2001

001155 84

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

D262e Datti, Marcelo
 Efeitos do estresse crônico pré-natal sobre a resposta inflamatória
 em ratos / Marcelo Datti. Campinas, SP : [s.n.], 2001.

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

 1. Pleurisia. 2. Inflamação. 3. Psicofarmacologia. 4.
 Neuroendocrinologia. I. Nancy Airoidi 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 Airoidi Teixeira

Membros:

1. Profª. Drª. Nancy Airoidi Teixeira

Nancy Airoidi Teixeira

2. Profª. Drª. Marilda Emmanuel Novaes Lipp

Marilda Emmanuel Novaes Lipp

3. Profª. Drª. Sônia Pereira Altenburg

Sônia T. Altenburg

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

Data: 25/05/2001

À Deus.

*Aos meus familiares, em
especial à minha tia Zalfa
e avó Mary pelo exemplo
de amor e dedicação.*

*À minha esposa Fernanda,
por cada dia que passamos
juntos, pelo amor que temos
um pelo outro e pelo nosso
bebê.*

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Nancy Airoidi Teixeira, orientadora deste trabalho, pela oportunidade, pelos grandes ensinamentos, pela paciência e acima de tudo pela grande amizade.

Ao Prof. Dr. Edson Antunes também pela oportunidade, pela colaboração com a realização deste trabalho e pela disposição em ajudar, sempre com grande paciência.

Aos colegas de laboratório Fernanda Datti, Marcos Antônio Varriano, Ana Augusta Varriano, Marcia Cristina Nogueira Guimarães, Jaqueline Borges Rocha Santos e Cristian César Carrari.

À Marta Valéria Medeiros, Laura Cristina Marreto Esquisatto e Enilton Camargo pelo auxílio na aprendizagem técnica e pela grande amizade.

Ao Sr. Miguel Borges da Silva pela seriedade e respeito com que executa seu trabalho, permitindo que nosso trabalho seja realizado sem interferências.

Aos funcionários Gislaine Elias Alípio, Maria Rita de Lima, Maria das Dores Ponciano (Dora), Wanderlei da Cunha Claro, Luiz Eduardo Odoni pela colaboração.

Aos colegas e funcionários do Departamento de Farmacologia.

Aos animais, que com a vida colaboraram para a realização deste trabalho.

Ao CNPq pelo apoio financeiro concedido.

“Nunca ande pelo caminho traçado, pois ele conduz somente até onde os outros já foram”.

Alexandre Graham Bell

SUMÁRIO

Lista de abreviações.....	xix
Lista de materiais.....	xxi
Lista de figuras e tabelas.....	xxv
Resumo.....	xxvii
1. INTRODUÇÃO.....	30
1.1 O estresse pré-natal.....	31
1.2 A resposta inflamatória aguda.....	36
1.3 O estresse pré-natal e a resposta inflamatória.....	40
1.4 Objetivo.....	44
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
2.1 Animais.....	46
2.2 Procedimento experimental.....	46
2.2.1 Procedimento de estresse crônico brando imprevisível.....	46
2.2.2 Edema de pele.....	48
2.2.3 Edema de pata.....	48
2.2.4 Pleurisia não alérgica.....	49
2.2.5 Pleurisia alérgica.....	50
2.3 Análise estatística.....	51

3. RESULTADOS.....	52
3.1 Tamanho das ninhadas.....	53
3.2 Edema de pele.....	54
3.3 Edema de pata.....	56
3.4 Pleurisia não alérgica.....	59
3.5 Pleurisia alérgica.....	62
 4. DISCUSSÃO.....	 65
 5. CONCLUSÕES.....	 72
 6. SUMMARY.....	 74
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 76
 ANEXO.....	 93

LISTA DE ABREVIações

AA	Ácido araquidônico
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ANOVA	Análise de variância
C 48/80	Composto 48/80
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CRH	Hormônio liberador de corticotrofina
E	Estressado
E.P.M.	Erro padrão da média
HPA	Hipotálamo-pituitário-adrenal
Ig	Imunoglobulina
LPS	Lipopolissacarídeos
N.S.	Não significativa
NE	Não estressado
NK	Natural killer
NO	Óxido nítrico
NS	Não sensibilizado
OVA	Ovoalbumina
PAF	Fator ativador de plaquetas
PBS	Tampão fosfato salina
S	Sensibilizado
SNC	Sistema nervoso central
TNF	Fator de necrose tumoral

LISTA DE MATERIAS

SUBSTÂNCIA	PROCEDÊNCIA
Ácido Acético	Merck (Alemanha)
Albumina Bovina	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Albumina marcada com ^{125}I	Cedida pela Dra. Maria Tereza P. Ribela (CIPEN/CENEN) SP, Brasil
Azul de Metileno	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
C48/80	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Carbonato de sódio	Reagem (Brasil)
Carragenina	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Corante May-Grunwald-Giemsa	Merck (Alemanha)
Etanol	Chemco (SP, Brasil)
Fosfato de sódio	J. T. Baker (USA)
Glucose	Nuclear (Brasil)
Halotano	Cristália (SP, Brasil)
Heparina	Eurofarma (Brasil)
Hidróxido de Alumínio Coloidal	Sanofi (RJ, Brasil)
KCl	Merck (RJ, Brasil)
KH_2PO_4	Merck (RJ, Brasil)
LPS	Sigma (St. Louis, MO, EUA)
Metanol	Merck (RJ, Brasil)

Na₂HPO₄.12H₂O

NaCl 0.9% Estéril

NaCl

Ovoalbumina (OVA, grau III)

PAF

Pentobarbital

Nuclear (Brasil)

Fresenius (SP, Brasil)

Merck (RJ, Brasil)

Sigma (St. Louis, MO, EUA)

Sigma (St. Louis, MO, EUA)

Cristália (SP, Brasil)

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Tabela I. Contagem do número de filhotes e a predominância de sexo por ninhada.....	53
Figura 1. Edema de pele de ratos induzido por diversos estímulos inflamatórios.....	55
Figura 2. Edema de pata em ratos induzido por C48/80 (5µg/pata).....	57
Figura 3. Edema de pata em ratos induzido por carragenina (1mg/pata).....	58
Figura 4. Número de leucócitos totais e diferenciais em pleura de ratos induzido por carragenina (1mg/cavidade).....	61
Figura 5. Número de leucócitos totais e diferenciais em pleurisia de ratos não estressados-não sensibilizados (NE-NS), não estressados-sensibilizados (NE-S), estressados-não sensibilizados (E-NS) e estressados-sensibilizados (E-S).....	64

RESUMO

Neste trabalho investigamos o efeito do estresse crônico pré-natal sobre a resposta inflamatória em ratos. Ratas Wistar prenhes foram submetidas ao modelo de estresse proposto por WILLNER et al. (1987), que consistia de alterações variadas e transitórias no ambiente de criação dos animais durante as duas últimas semanas de gravidez, o grupo controle permaneceu sem qualquer manipulação, exceto os cuidados rotineiros. Os descendentes, entre 75 e 90 dias, foram submetidos aos seguintes testes: edema de pele, edema de pata, pleurisia não alérgica e pleurisia alérgica. Para o protocolo de pleurisia alérgica, os animais foram sensibilizados no primeiro dia do protocolo de estresse com uma injeção subcutânea de ovoalbumina (OVA), após o último dia do protocolo de estresse os animais eram desafiados com OVA na cavidade pleural. A pleurisia não alérgica foi induzida com carragenina, o edema de pata foi induzido com carragenina ou C48/80 e o edema de pele foi induzido com PAF, LPS, carragenina e C48/80.

Na pleurisia alérgica o lavado pleural foi coletado 24h após o desafio antigênico com OVA, no procedimento de pleurisia não alérgica, o lavado pleural foi coletado 6, 24 e 48h após indução com carragenina. As medidas do volume das patas para o edema foram realizadas 60, 120, 180, 240 e 300min após a indução com carragenina e 15, 30, 60, 120 e 180min para o C48/80. Os resultados demonstraram que não houve diferença significativa entre os grupos estressados e não estressados no teste de edema de pele. No edema de pata induzido por C48/80, a resposta edematogênica foi diminuída, já quando o estímulo foi carragenina a resposta não foi alterada. Na pleurisia não alérgica, os animais prenatalmente estressados apresentaram um significativo aumento no influxo de eosinófilos em

comparação aos animais não estressados no tempo de 24h. Na pleurisia alérgica os ratos prenatalmente estressados exibiram uma exacerbação no infiltrado de leucócitos, esta ocorreu em todos os tipos celulares estudados: neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares.

1. Introdução

1.1 O estresse pré-natal

O estresse e a resposta ao estresse são elementos essenciais para a discussão das interações neuroendocrinoimune. O estresse é um estado de tensão que causa uma ruptura no equilíbrio homeostático do organismo (LIPPI, 1999). O estado de perturbação pode ser induzido por inúmeros estressores, físicos ou psicológicos, que desencadeiam um grupo coordenado de respostas adaptativas físicas, mentais e comportamentais que agem contra o efeito do estressor. Este complexo organizado das respostas adaptativas é usualmente chamado de sistema de estresse ou resposta ao estresse (CHROUSOS & GOLD, 1992). A idade, gênero, estado reprodutivo, outros fatores geneticamente determinados e de ambiente ordenam a intensidade e a qualidade destas respostas (STERNBERG et al., 1992).

Os componentes mentais e comportamentais da resposta ao estresse incluem o aumento dos processos do sistema nervoso central (SNC) que controlam a estimulação, o alerta, o humor, a vigilância, a atenção e a aquisição de conhecimentos, bem como a inibição dos sistemas que controlam as funções vegetativas, alimentação e reprodução (CHROUSOS & GOLD, 1992).

Os conceitos intrínsecos da resposta ao estresse são de grande importância para que a intensidade e qualidade de cada componente da resposta sejam apropriadas para a ameaça. Alterações na habilidade do organismo para responder aos estressores, com respostas excessivas ou inadequadas em duração e magnitude, podem desencadear doenças (GOLD et al., 1988; CHROUSOS & GOLD, 1992; STRATAKIS, 1992).

O hormônio liberador de corticotrofina (CRH), o eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (HPA) e o locus ceruleus – norepinefrina apresentam-se como sendo os maiores

mediadores do sistema de resposta ao estresse (CHROUSOS & GOLD, 1992; STERNBERG et al., 1992; MENZAGHI et al., 1993). O CRH exerce um papel principal na coordenação das respostas endócrinas autonômicas, comportamentais e imunes ao estresse, agindo diretamente no cérebro e periferia (DE SOUZA, 1995).

O CRH hipotalâmico modula o nível de excitação, controlando o humor, integrando o sistema de resposta ao estresse. A administração de CRH no SNC, em experimentos com animais, produz um complexo de respostas comportamentais e fisiológicas, que usualmente são adaptativas durante o estresse: ativação do eixo pituitário adrenal, principalmente a secreção pituitária de adrenocorticotrofina (ACTH) e corticosteróides adrenais; ativação direta do sistema nervoso simpático com a secreção de epinefrina e norepinefrina. Como consequência, ocorre o aumento dos níveis de glicose sanguínea, do débito cardíaco e da pressão arterial (CHROUSOS & GOLD, 1992; STERNBERG et al., 1992; VALENTINO et al., 1993).

A ativação do sistema nervoso simpático pelo CRH hipotalâmico é mediada pela inervação direta no locus ceruleus, este mecanismo conduz à liberação e difusão de norepinefrina através do cérebro e tecidos periféricos. A ativação do sistema nervoso simpático também estimula a liberação de CRH pelos neurônios paraventriculares hipotalâmicos, a liberação de CRH hipotalâmico também é facilitada pela projeção neuronal direta do locus ceruleus no hipotálamo. Desta forma, parece haver um feedback positivo e bidirecional, assim, a ativação de um componente do sistema tem como consequência a ativação de outro. Os corticosteróides, maior produto da ativação do sistema de resposta ao estresse, são inibitórios para os componentes da resposta ao estresse, inclusive para os sistemas imune e inflamatório (CHROUSOS & GOLD, 1992; STERNBERG et al., 1992; GROSSMAN & COSTA, 1993). Os receptores de

corticosteróides expressos no núcleo paraventricular e na pituitária anterior realizam um feedback negativo sobre a síntese de CRH, ACTH, secreções pituitárias, hipotalâmicas e do sistema límbico cerebral (KELLER-WOOD & DALLMAN, 1984), portanto o eixo HPA é um circuito fechado.

São grandes as evidências que o estresse, se aplicado prenatalmente pode influenciar profundamente o desenvolvimento dos filhos, provocando alterações tardias na idade adulta. Fatores ambientais aos quais a mãe é exposta durante a gravidez influenciam o comportamento dos descendentes (JOFFE, 1969), dentre os fatores de ambiente incluem-se consumo de drogas, certos estados nutricionais e eventos estressantes (STOTT, 1973; JOFFE, 1978; SWAAB & MIRMIRAN, 1984; WEINSTOCK, FRIDE, HERTZBERG, 1988).

Mulheres que experimentaram experiências estressantes durante a gravidez deram luz à filhos que vieram a demonstrar anormalidades como baixo peso no nascimento, padrão de sono alterado, neofobia, irritabilidade, pouca sociabilidade e ansiedade (KNIPSCHILD, MEIER, SALLE, 1981; SCHELL, 1981). Os filhos de mãe estressada também apresentam baixo ganho de peso e demora em aprender a andar e falar (STOTT, 1973; MEIER, 1985). Obviamente, existem limitações em trabalhos deste tipo no que se refere a humanos, porém, este fenômeno tem sido mais extensivamente estudado usando modelos animais.

Numerosos estudos em roedores têm examinado os efeitos do estresse induzido por choques elétricos, prolongada contenção física e exposição prolongada à luz, barulho ou calor intenso (WEINSTOCK et al., 1988). As mudanças comportamentais observadas em roedores prenatalmente estressados foram aumento da emocionalidade (THOMPSON, 1957; ARCHER & BLACKMAN, 1971; FRIDE et al., 1986; WEINSTOCK et al., 1988;

WAKSHLAK & WEINSTOCK, 1990), aumento do comportamento defensivo (TAKAHASHI et al., 1992), aumento da ansiedade (VALLÉE et al., 1997; WEINSTOCK, FRIDE, HERTZBERG, 1988) e aumento da tendência à auto-administração de drogas na idade adulta (DEMINIÈRE et al., 1992).

Além das mudanças comportamentais já citadas, os ratos prenatalmente estressados também apresentam a função sexual prejudicada com feminilização e desmasculinização dos machos (WARD, 1972; DAHLOF, HARD, LARSSON, 1977; MEISEL, DOHANICH, WARD, 1979), incluindo-se a diminuição da distância anogenital e do peso dos testículos no nascimento (DAHLOF, HARD, LARSSON, 1977; DAHLOF, HARD, LARSSON, 1978). As fêmeas apresentam, na vida adulta, mudanças no ciclo estro, redução na fertilidade e alterações comportamentais durante amamentação (HERRENKOHL & WHITNEY, 1976; HERRENKOHL & POLITICH, 1978; HERRENKOHL, 1979).

O estresse pré-natal também afeta vários neurotransmissores, incluindo a serotonina (PETERS, 1990) e catecolaminas (FRIDE & WEINSTOCK, 1989; TAKAHASHI et al., 1992; ALONSO et al., 1994).

Em conjunto com as alterações citadas, os ratos que foram submetidos ao estresse pré-natal, quando submetidos ao estresse na idade adulta, exibem uma prolongada secreção de corticosterona em relação a ratos que não foram prenatalmente estressados, demonstrando hiperatividade no eixo HPA (FRIDE et al., 1986; HENRY et al., 1994, MACCARI et al., 1995; VALLÉE et al., 1996). Isto parece estar associado com a diminuição de receptores hipocampais para corticosterona (MACCARI et al., 1995), o que indica uma redução na eficácia dos receptores hipocampais em produzir o feedback negativo que auto-regula a secreção de glicocorticóides produzida pela ativação do eixo HPA. Por outro lado, as alterações produzidas pelo estresse pré-natal são reduzidas pela

manipulação pós-natal (MEANEY et al., 1989), curtos e periódicos períodos de privação materna (OGAWA et al., 1994) e pela adoção precoce (MACCARI et al., 1995).

Embora vários tipos de estressores possam causar um grande número de alterações nos filhotes, já é estabelecido que os efeitos do estresse pré-natal dependem da natureza do estressor (VELAZQUEZ-MOCTEZUMA, SALAZAR, RUEDA, 1993). As alterações neuroendócrinas e comportamentais ocorrem quando ratas prenhas são expostas, durante a fase mais tardia da gestação, a estressores como manipulação diária (ADER & CONKIN, 1963; PETERS, 1982), choque elétrico (PFISTER & IVINSKIS, 1983; TAKAHASHI, BAKER, KALIN, 1990; SOBRIAN et al., 1992), barulho incontrolável (FRIDE & WEINSTOCK, 1984), aglomeração (HARVEY & CHEVIS, 1985) ou imobilização com luz forte e temperatura elevada (WARD, 1972; CHAPMAN & STERN, 1978; HERRENKOHL, 1979).

WILLNER et al. (1987), desenvolveram um modelo de estresse crônico brando imprevisível que consiste em alterações variáveis e transitórias no ambiente de criação dos animais, esse modelo foi capaz de produzir depressão comportamental em ratos, sendo que o estado normal foi restabelecido através do tratamento com uma grande variedade de antidepressivos (WILLNER, 1997). SECOLI & TEIXEIRA (1998) avaliaram o efeito deste modelo de estresse aplicado prenatalmente sobre o desenvolvimento da prole, os resultados demonstraram que o estresse pré-natal reduziu o número de machos por ninhada, diminuiu a distância anogenital, a abertura dos olhos e o despontar das orelhas foram precoces, além de aumentar a intensidade da depressão induzida na idade adulta.

1.2 A resposta inflamatória aguda

A inflamação aguda é a resposta imediata e inicial a um agente lesivo. Os leucócitos e os anticorpos são os dois principais componentes de defesa, desta forma, os fenômenos vasculares desempenham um importante papel na inflamação. Portanto, a inflamação aguda possui três componentes principais: (1) alterações do calibre vascular que levam a aumento do fluxo sanguíneo; (2) alterações estruturais na rede microvascular que permitem às proteínas plasmáticas e aos leucócitos deixarem a circulação e (3) migração e acúmulo dos leucócitos no local da lesão (KUMAR, COTRAN, ROBBINS, 1994).

A injeção intradérmica de mediadores inflamatórios como histamina, bradicinina (SPECTOR & WILLOUGHBY, 1968), fator ativador de plaquetas (PAF) (MORLEY, PAGE, PAUL, 1983), taquicininas (GAMSE & SARIA, 1985), leucotrienos (BRAY et al., 1981; PECK, PIPER, WILLIANS, 1981) provoca o aumento da permeabilidade vascular em animais. Este aumento é potencializado na presença de vasodilatadores como prostaglandinas (WILLIANS & MORLEY, 1973; WILLIANS & PECK, 1977), ácido araquidônico (AA) (WILLIANS & PECK, 1977), peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (BRAIN & WILLIANS, 1985), polipeptídeo vasoativo intestinal (WILLIANS, 1982) e óxido nítrico (NO) (MARIANI-PEDROSO et al., 1995). A potencialização do extravasamento de proteínas produzida por estes vasodilatadores é atribuída à dilatação arteriolar local que produz um aumento do fluxo sanguíneo e, conseqüentemente aumento no extravasamento de proteínas (WILLIANS & PECK, 1977).

A vasodilatação e o aumento do fluxo sanguíneo elevam a pressão hidrostática intravascular, resultando em maior filtração de líquidos dos capilares pobres em proteínas

(transudato). O aumento da permeabilidade vascular leva ao extravasamento de um líquido rico em proteínas (exsudato) para o interstício. A perda de exsudato promove uma redução na pressão osmótica intravascular e um aumento na pressão osmótica no líquido intersticial, estes processos associados levam a um acentuado acúmulo de líquido no tecido intersticial, este acúmulo de líquido é chamado de edema (KUMAR, COTRAN, ROBBINS, 1994).

Algumas células envolvidas na resposta inflamatória são pré-existentes nos tecidos, tais como os mastócitos, fagócitos mononucleares teciduais e células endoteliais vasculares (JOHNSTON, 1988; FAJARDO, 1989; GALLI, 1993). Outras células deslocam-se do sangue periférico para o sítio inflamatório, como os leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e células mononucleares (monócitos e linfócitos) (JOHNSTON, 1988; VALENT & BETTERLHEIN, 1992; KROEGEL et al., 1994). Os fibroblastos e as plaquetas têm participação importante tanto na inflamação como no processo de reparo tecidual (MONCADA, PALMER, RIGGS, 1991; PAGE, 1994).

No início das reações inflamatórias as células que aparecem em maior quantidade são os neutrófilos, no decorrer do processo inflamatório passam a surgir, progressivamente, outros tipos celulares (ISSEKUTZ & LOPES, 1993). Os neutrófilos podem produzir uma grande variedade de produtos incluindo leucotrienos, PAF, tromboxano, citocinas, proteases, produtos microbiais, metabólitos tóxicos derivados do oxigênio e NO (SAMPSON, 2000).

Os eosinófilos são células que também aparecem em grande quantidade na fase inicial da inflamação, apesar de chegarem após os neutrófilos, são importantes na defesa contra helmintos e outros organismos multicelulares, têm sido reconhecidos como potentes células pró-inflamatórias envolvidas no desenvolvimento da asma e doenças alérgicas (KROEGEL et al., 1994). Em numerosos estudos, envolvendo autópsia e caracterização

histológica de tecidos das vias aéreas de indivíduos que morreram de asma, foi verificado grande número de eosinófilos e produtos de seus grânulos (AZZAWI et al., 1992). Os eosinófilos possuem grânulos que contêm proteínas básicas como a proteína básica principal, proteína catiônica eosinofílica, peroxidase eosinofílica e neurotoxina (GLEICH & ADOLPHSON, 1986), além disso, é um potente produtor de metabólitos tóxicos derivados do oxigênio (KANOFISKY et al., 1988). Quando estimulado, o eosinófilo leva a formação de leucotrienos (BRUIJNZEEL et al., 1987), prostaglandinas (KROEGEL et al. 1994), tromboxano (GIEMBYCZ, KROEGEL, BARNES, 1990) e PAF (BURKE et al., 1990).

Dentre as células mononucleares encontram-se os monócitos, que são células diferenciadas dos promonócitos da medula óssea. Os monócitos encontram-se na circulação e migram para os tecidos onde se tornam macrófagos (ROITT, BROSTOFF, MALE, 1993).

Os macrófagos possuem papel bastante importante tanto na regulação da reação inflamatória crônica como também da resposta imunológica através da liberação de substâncias modulatórias, porém os macrófagos também participam de muitos fenômenos da fase aguda da resposta inflamatória (NATHAN, 1987; UNANUE & ALLEN, 1987). Os macrófagos são células da imunidade inespecífica, são células que possuem um alto poder secretório, liberando mais de uma centena de produtos entre enzimas, inibidores enzimáticos, proteínas do sistema complemento, citocinas, fatores de estimulação de colônia tanto para granulócitos e macrófagos, ACTH, além de derivados do AA (TAKEMURA & WERB, 1984; WERB et al., 1986; NATHAN, 1987).

Os linfócitos estão divididos em duas categorias principais: os linfócitos T e os linfócitos B, elas exercem diferentes funções e possuem receptores de membrana para o reconhecimento de antígenos. As células T se desenvolvem a partir de suas precursoras no

timo enquanto as células B dos mamíferos diferenciam-se no fígado fetal e na medula óssea nos adultos. Outra população de linfócitos é chamada de células natura killer (NK), elas não expressam receptores de antígenos na membrana, são derivadas da medula óssea e, diferentemente das células T e B, possuem a habilidade de lisar certas linhagens de células tumorais sem sensibilização prévia (ROITT, BROSTOFF, MALE, 1993).

Muitas substâncias podem induzir a migração de leucócitos, atraindo-os da microcirculação para o espaço extravascular através do aumento da adesão dos leucócitos à parede do endotélio. Depois de aderidos, os leucócitos atravessam a parede do vaso por entre as células endoteliais através da diapedese, deslocando-se da membrana basal do vaso até o local da inflamação (ROITT, BROSTOFF, MALE, 1993).

As substâncias que tem a capacidade de induzir o influxo de células para o local da inflamação recebem o nome de fatores quimiotáticos, as células da resposta se estimuladas podem liberá-los. Dentre os fatores quimiotáticos mais importantes pode-se destacar IL-1, TNF (FACCIOLI et al., 1990), IL-8 (RIBEIRO et al., 1991), leucotrienos (SMITH, FORD-HUTCHINSON, BRAY, 1980), NO (FERREIRA et al., 1996), entre outros.

Como já descrito, o recrutamento das células ocorre pelo aumento da adesão das células na parede do endotélio, esta adesão envolve uma série de processos complexos de interações específicas entre moléculas de adesão complementares presentes nos leucócitos e na superfície das células endoteliais (BEVILACQUA et al., 1989). As moléculas de adesão classificam-se conforme sua estrutura molecular e são divididas em 3 famílias: a família das selectinas, a família das integrinas e a superfamília das imunoglobulinas (CRONSTEIN & WEISSMAN, 1993).

Diversos eventos estão envolvidos na migração celular e parecem seguir basicamente as seguintes etapas: 1) deslizamento (rolling) do leucócito pela parede do vaso,

envolvendo a expressão de moléculas de adesão endotelial; 2) ativação dos leucócitos por ação de agentes quimiotáticos ou molécula de adesão; 3) adesão de alta afinidade devido à mudança conformacional do leucócito devido à ação de moléculas de adesão; 4) migração dos leucócitos do lúmen vascular para o espaço extravascular (SMITH et al., 1988; BEVILACQUA et al., 1989; SMITH et al., 1991; MAKAY & IMHOF, 1993).

1.3 O estresse pré-natal e a resposta inflamatória

Nas últimas décadas têm se estabelecido que sistema nervoso, endócrino, imune são anatomicamente e funcionalmente interconectados, expressando e respondendo a um grande número de moléculas regulatórias em comum, que suprem a base molecular para uma integração bidirecional (BLALOCK, 1989; WICK et al., 1993). Desta forma, situações estressantes e alterações no estado afetivo, tais como ansiedade e depressão, podem influenciar a imunocompetência (DANTZER & KELLY, 1989). Este fenômeno pode estar ocorrendo através da ativação do sistema neuroendócrino, ou pela influência direta do sistema nervoso sobre os órgãos linfóides (FELTEN et al. 1987).

Vários estudos atribuem ao estresse um papel pró-inflamatório causando aumento da hipersensibilidade cutânea (DHABAR & McEWEN, 1997), aumento do influxo de neutrófilos (VENTURA et al., 1999), piora no quadro de asma alérgica (PERSOONS et al., 1995; NOGUEIRA et al., 1999) e aumento na formação de edema (DATTI, ANTUNES, TEIXEIRA, 2000). Outros estudos demonstram que o estresse atenua a resposta imune/inflamatória como, por exemplo, estudos realizados em estudantes no período de

exames (DORIAN et al., 1982) e pessoas expostas a eventos estressantes com divórcio (KIECOLT-GLASER et al., 1987), luto (BARTROP et al., 1977) e desemprego (ARNETZ et al., 1987). Estudos com animais também apontam o caráter supressivo do estresse sobre a resposta imune/inflamatória provocando supressão do extravasamento plasmático em animais (STRAUSBAUGH, DALLMAN, LEVINE, 1999), e suprimindo diversos parâmetros da função imune (BORYSENKO & BORYSENKO, 1982; KHANSARI, MURGO, FAITH, 1990; KORT, 1994; MAIER, WATKINS, FLESHNER, 1994).

Deve-se considerar que o efeito do estresse sobre a resposta imune/inflamatória depende do tipo, do tempo e da intensidade do estressor, bem como sexo, idade e fatores relacionados à espécie dos animais. Outro fator importante é a natureza do estímulo inflamatório e o local estudado. Assim, o estresse pode ter um efeito bidirecional sobre a função imune/inflamatória, onde em algumas condições o estresse pode exacerbar a resposta e em outras ele pode ser supressivo (DHABHAR, 1998).

Apesar dos efeitos comportamentais e neuroendócrinos do estresse pré-natal serem bastante estudados, poucos são os trabalhos que relacionam o estresse pré-natal à resposta imune/inflamatória. Se considerarmos que o estresse afeta tanto o sistema nervoso quanto o sistema endócrino, e que a resposta imune/inflamatória é regulada por esses dois sistemas chegamos a conclusão que é bastante justificado que o estresse pré-natal possua um papel neuroimunomodulatório.

Alguns estudos têm avaliado os efeitos do estresse pré-natal sobre a resposta imune, SOBRIAN et al. (1992) examinaram o efeito do estresse pré-natal produzido por choques inescapáveis sobre a imunidade humoral dos descendentes em idade pré-pubertal, onde os filhotes apresentaram baixas taxas de imunoglobulina G (IgG). Resultados parecidos obtiveram COE, KEMNITZ, SCHNEIDER (1993), onde macacos rhesus jovens, filhos de

mães que foram expostas ao barulho incontrolável, tiveram diminuição nos níveis de IgG e também de certos componentes do sistema complemento como C3 e C4.

Está bem estabelecido que alguns dos efeitos do estresse pré-natal dependem, além da natureza do estressor e de componentes genéticos inerentes à espécie ou cepa, da idade e do sexo dos descendentes (PFISTER & IVINSKIS, 1983; WARD, 1984; WEINSTOCK et al., 1992).

Em ratos adultos, KLEIN & RANGER (1995) observaram aumento da citotoxicidade das células NK e aumento na produção de anticorpos, quando desafiados a antígenos específicos em ratos machos e fêmeas, filhos de mães estressadas por imobilização sob alta luminosidade, na última semana de gestação. Em outro estudo mais recente, utilizando ratas prenhes perturbadas com barulho e alta iluminação três vezes por semana durante toda a gestação, KAY et al. (1998) observaram que o estresse pré-natal diminuiu a proliferação de linfócitos.

A disparidade nos resultados desses trabalhos demonstra a complexidade pela qual o estresse pré-natal altera a imunidade, onde alterações no protocolo de estresse ou das substâncias utilizadas pra estimular a função imune podem proporcionar resultados diferentes.

São escassos os trabalhos que avaliam o efeito do estresse pré-natal sobre a resposta inflamatória. Em nosso laboratório NOGUEIRA et al. (1999) estudaram o efeito do estresse pré-natal sobre um modelo experimental de asma alérgica. O modelo de estresse utilizado neste protocolo foi o proposto por WILLNER et al. (1987) onde os ratos foram expostos a estressores como privação de comida, privação de água, barulho intermitente, luz estroboscópica, gaiola molhada e outros, durante a segunda e terceira semanas de gestação. Neste modelo, os estressores são dispostos de forma racional, de modo a evitar tanto a

adaptação do animal ao estresse, como também a previsibilidade do estressor. Os resultados do estudo, realizado somente em fêmeas, demonstraram que o estresse pré-natal exacerbou a asma alérgica, principalmente devido ao alto influxo de eosinófilos no pulmão, com relação aos animais controle.

Baseando-se nas evidências até aqui demonstradas, neste trabalho avaliamos o efeito do estresse crônico pré-natal sobre a resposta inflamatória celular induzida por estímulo alérgico e não alérgico e a resposta edematogênica induzida por diversos estímulos em ratos.

1.4 Objetivos

Com base em evidências de que o estresse pré-natal provoca alterações na resposta imune e inflamatória, buscamos avaliar o efeito de estresse crônico pré-natal sobre as respostas edematogênica e celular de ratos. Para esse propósito utilizamos o modelo de estresse brando crônico proposto por WILLNER et al. (1987) aplicado em ratas prenhas durante toda a gestação. Nos descendentes em idade adulta foram investigados os seguintes fenômenos:

- 1) A influência do estresse crônico pré-natal sobre a resposta edematogênica em testes de edema de pele e edema de pata, induzidos por diversos agentes inflamatórios.
- 2) A influência do estresse crônico pré-natal sobre a resposta inflamatória celular, em pleura de ratos (pleurisia), tanto por estímulo não alérgico (carragenina) como por estímulo alérgico (sensibilização e provocação antigênica com ovoalbumina).

2. Materiais e métodos

2.1 Animais

Foram utilizados ratos Wistar (*Ratus norvegicus*) fêmeas com três meses de idade fornecidos pelo Biotério Central da UNICAMP.

Os animais foram mantidos no Biotério do Laboratório de Psicofarmacologia do Departamento de Farmacologia da FCM – UNICAMP em gaiolas coletivas até que completassem a idade ideal para os testes com ração e água *ad libitum*, mantendo-se ciclo de 12h claro/ 12h escuro, e temperatura de 26 ± 3 graus Celsius.

2.2 Procedimento experimental

O procedimento experimental foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal - Instituto de Biologia - Universidade Estadual de Campinas - CEEA-IB-UNICAMP sob protocolo número 212-2 em 20/03/2001.

2.2.1 Procedimento de estresse crônico brando imprevisível

Fêmeas Wistar adultas nulíparas, pesando aproximadamente 200 gramas, foram cruzadas com adultos machos da mesma espécie e idade, durante três dias. Três dias antes do início do protocolo de estresse as fêmeas foram separadas em gaiolas individuais de polipropileno medindo 30x17x13cm e mantidas assim até o desmame.

Uma parte das fêmeas permaneceu sem qualquer manipulação, exceto cuidados rotineiros. A outra metade foi submetida ao modelo de estresse crônico proposto por WILLNER et al. (1987) que inclui períodos de privação de água e alimentação, iluminação ambiental contínua, inclinação da gaiola, agrupamento de animais, gaiola úmida, exposição à sala resfriada, barulho intermitente de 85 dB, luz estroboscópica, garrafas vazias após privação de água, acesso restrito a alimentação, odor novo e objetos estranhos na gaiola (pedaços de madeira/vidro) por um período de quatorze dias consecutivos (Anexo 1), na segunda e terceira semana de gestação.

Foram utilizados, assim, dois grupos experimentais:

- 1) Não estressado (NE): ratas mantidas sem qualquer manipulação durante o período gestacional, exceto cuidados rotineiros.
- 2) Estressado (E): ratas submetidas ao modelo de estresse crônico brando imprevisível durante a segunda e terceira semana de gestação.

Após o nascimento, houve redução das ninhadas ao número de 8 animais por mãe, sendo 4 machos e 4 fêmeas. Estes animais foram mantidos com as mães até o desmame (21 dias), sendo posteriormente separados por sexo. Foram mantidos sob os cuidados rotineiros até que completassem idade ideal para experimentação (entre 75 e 90 dias). Nos experimentos de inflamação, utilizamos apenas as ratas fêmeas descendentes de mães estressadas, chamadas de E, e aquelas descendentes de mães que não sofreram manipulação durante a gravidez, chamados de NE.

2.2.2 Edema de pele

Fêmeas Wistar NE e E foram inicialmente anestesiadas com dióxido de carbono (CO₂) e, em seguida, profundamente anestesiadas com pentobarbital sódico (40 mg/kg) pela via intraperitoneal (i.p.). Os agentes utilizados para indução do edema foram: fator ativador de plaquetas (PAF); lipopolissacarídeo (LPS); carragenina; e C48/80, administrados intradermicamente. O extravasamento de proteínas plasmáticas foi avaliado em função do acúmulo local da mistura de albumina bovina marcada com ¹²⁵I (2.5 µ Ci/kg) e azul de Evans (0.3 ml/kg, 2.5% w/v), previamente administrada pela via endovenosa femural. Em seguida, a pele dorsal dos animais foi depilada, e os agentes previamente dissolvidos em solução Tyrode foram administrados em sítios randomizados, sempre em volume de 100 µl. Após 30 minutos, uma amostra de 5 ml de sangue foi coletada desses animais, através de punção cardíaca. Em seguida, os animais foram sacrificados por superdosagem anestésica, e a pele dorsal removida. Os sítios injetados foram recortados (15 mm de diâmetro) e a radioatividade presente em cada amostra de tecido e no sangue foi quantificada em contador gama. O edema formado em cada sítio foi expresso como volume de plasma extravasado em função da contagem obtida em 1 ml de plasma.

2.2.3 Edema de pata

Utilizamos fêmeas Wistar NE e E superficialmente anestesiadas com halotano e submetidas a injeção subplantar de carragenina (1mg) ou C48/80 (5µg) na pata posterior esquerda. O volume da pata foi medido através de um hidropletismômetro (modelo 7150,

Ugo Basile, Itália), imediatamente antes da injeção e, em intervalos regulares após a injeção. O volume final injetado na pata foi sempre de 0.1 ml. Os resultados foram expressos como aumento do volume da pata (ml) em relação ao valor basal.

2.2.4 Pleurisia não alérgica

Fêmeas Wistar NE e E foram anestesiadas superficialmente com halotano. Em seguida, foi feita uma incisão ao nível do sexto espaço intercostal esquerdo, os músculos adjacentes foram dissecados e a carragenina (200 µl; 125 µg/cavidade) injetada na cavidade pleural. As incisões foram suturadas e os animais recuperados da anestesia. Nos períodos de 6 e 24 e 48 horas após a injeção intrapleural, os animais foram exsanguinados sob anestesia. O tórax foi cuidadosamente aberto e a cavidade pleural lavada com 5 ml de tampão PBS (pH 7.4) heparinizado (5 U/ml). O tampão injetado foi aspirado juntamente com o exsudato, e o volume total mensurado. Exsudatos contaminados com sangue foram desprezados. No lavado pleural foram realizadas as contagens total e diferencial de leucócitos. A contagem do número total de leucócitos foi feita em câmara de Neubauer. A análise diferencial dos tipos celulares foi realizada em microscópio óptico (lente de imersão), pela contagem de no mínimo 300 células em esfregaço preparado em citocentrífuga (Revan – Instrumentos Científicos, Brasil), e corado com May-Grunwald-Giemsa. Os resultados das contagens total e diferencial dos leucócitos são mostrados como número de células $\times 10^6$ /lavado pleural.

2.2.5 Pleurisia alérgica

Sensibilização com ovoalbumina (OVA)

Os grupos sensibilizados receberam injeção subcutânea no dorso (0.15ml) de uma solução contendo 12mg de ovoalbumina (OVA - grau III, Sigma) adsorvida em 7.8ml de hidróxido de alumínio (solução a 6%, Pepsamar®) e 1.2ml de solução fisiológica.

Os grupos não sensibilizados receberam apenas injeção subcutânea no dorso de 0.15ml de uma solução de 7.8ml de hidróxido de alumínio (solução a 6%) e 1.2ml de solução fisiológica. Formaram-se 4 subgrupos experimentais: NE-NS, NE-S, E-NS, E-S onde, NS não sensibilizado e S sensibilizado.

Provocação antigênica

Quatorze dias após a sensibilização todos subgrupos foram anestesiados superficialmente com halotano. Em seguida, foi feita uma incisão ao nível do sexto espaço intercostal esquerdo, os músculos adjacentes foram dissecados e a ovoalbumina (200µl; 125µg/cavidade) injetada na cavidade pleural. As incisões foram suturadas e os animais recuperados da anestesia. No período de 24 horas após a injeção intrapleural os animais foram exsanguinados sob anestesia. O tórax foi cuidadosamente aberto e a cavidade pleural lavada com 5ml de tampão PBS (pH 7.4) heparinizado (5U/ml). O tampão injetado foi aspirado juntamente com o exsudato, e o volume total mensurado. Exsudatos contaminados com sangue foram desprezados. No lavado pleural foram realizadas as contagens totais e diferenciais de leucócitos. A contagem do número total de leucócitos foi feita em câmara de Neubauer, através da diluição de uma alíquota de 20µl do lavado em solução de Turk

(1:20). A análise diferencial dos tipos celulares foi realizada em microscópio óptico (lente de imersão), pela contagem de no mínimo 300 células em esfregaço preparado em citocentrífuga (Revan – Instrumentos Científicos, Brasil), e corado com May-Grunwald-Giemsa. Os resultados das contagens total e diferencial dos leucócitos são mostrados como número de células $\times 10^6$ /lavado pleural.

2.3 Análise estatística

Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.). Diferenças estatisticamente significantes foram determinadas utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguida de Student-Newman-Keuls para comparações múltiplas e teste t não pareado para comparações simples. Valores de $p < 0.05$ foram considerados significantes.

3. Resultados

3.1 Tamanho das ninhadas

Avaliamos se o estresse afeta o número de filhotes e a predominância de sexo por ninhada (Tabela 1). O grupo não estressado (NE) apresentou uma média de 10.7 filhotes por ninhada, enquanto o grupo estressado (E) teve uma média de 8.1 filhotes por ninhada. O estresse provocou uma significativa redução de 24.3% do número de filhotes por ninhada. O número de machos também teve uma significativa redução no grupo E (3.4) em comparação ao grupo NE (5.4), representando uma redução de 37% no grupo E.

Tabela I. Contagem do número de filhotes e a predominância de sexo por ninhada.

GRUPO	TOTAL	MACHOS	FÊMEAS	NATIMORTOS
Não estressado (NE)	10.7 ± 1.6	5.4 ± 2.3	5.1 ± 1.7	4
Estressado (E)	8.1 ± 1.8*	3.4 ± 0.9*	4.6 ± 1.6	6

Os resultados representam a média ± E.P.M., teste t não pareado, *p<0.05 comparado ao grupo não estressado (N=22 ninhadas).

3.2 Edema de pele

No teste de edema de pele (Figura 1), avaliou-se a resposta edematogênica ao PAF, LPS, carragenina e composto 48/80. O Tyrode foi utilizado como controle para avaliar a eficiência dos agentes, já que o mesmo é utilizado como veículo.

Para o PAF 10ng o extravasamento plasmático foi de $59.2 \pm 6.3 \mu\text{l}$ no grupo não estressado (NE) contra $50.9 \pm 10.7 \mu\text{l}$ do grupo estressado (E). O agente LPS 30 μg apresentou um extravasamento de $36.5 \pm 9.8 \mu\text{l}$ para o grupo NE e $56.0 \pm 18.8 \mu\text{l}$ para o grupo E. A carragenina 1mg produziu um extravasamento de $39.3 \pm 13.1 \mu\text{l}$ para o grupo NE e $43.2 \pm 8.8 \mu\text{l}$ para o grupo E. Já o composto 48/80 (500ng) provocou um extravasamento plasmático de $65.5 \pm 18.1 \mu\text{l}$ para o grupo NE contra um extravasamento de $83.1 \pm 18.8 \mu\text{l}$ do grupo E.

Os agentes mostraram-se eficientes, já que o extravasamento plasmático produzido pelo Tyrode ficou em $22.8 \pm 3.0 \mu\text{l}$ para o grupo NE e $11.9 \pm 18.8 \mu\text{l}$ para o grupo E.

Pequenas variações foram observadas entre os grupos NE e E, porém não houve nenhuma diferença estatisticamente significativa entre esses grupos, que pudesse ser detectada pelo teste t não pareado.

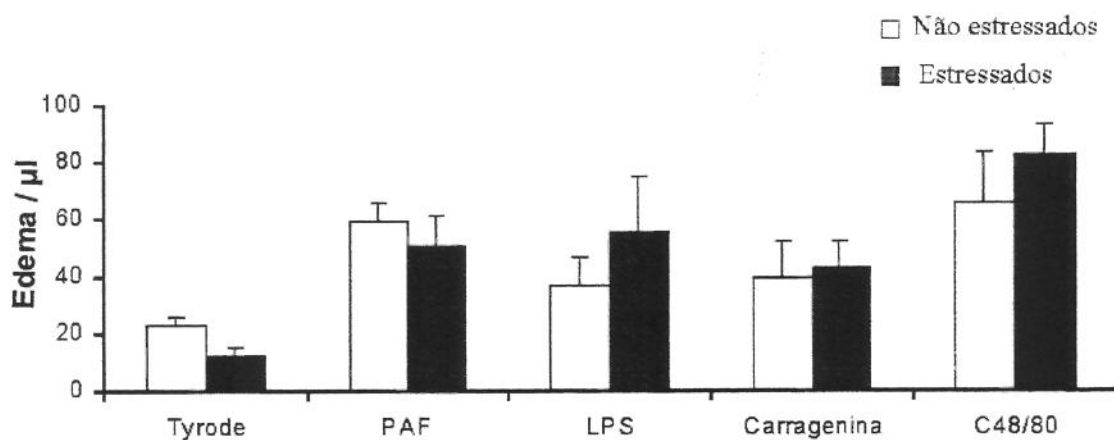


Figura 1. Edema de pele de ratos induzido por diversos estímulos inflamatórios. As colunas abertas representam o grupo não estressado (NE) e as colunas fechadas representam o grupo prenatalmente estressado (E). Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M, teste t não pareado demonstrou não haver diferença significativa (N.S.) entre os grupos não estressados e estressados (N=4 cada).

3.3 Edema de pata

Os testes de edema de pata quantificaram o efeito do estresse pré-natal sobre a formação de edema induzido pelo composto 48/80 e carragenina.

Para o composto 48/80 5 μ g (Figura 2) os tempos avaliados foram 15', 30', 60' 120' e 180'. As médias das medidas para o grupo NE foram 0.50 $\pm$ 0.04ml, 0.52 $\pm$ 0.04ml, 0.48 $\pm$ 0.02ml, 0.41 $\pm$ 0.04ml e 0,36 $\pm$ 0.02ml, respectivamente. Já para o grupo E as médias dos volumes de edema foram, respectivamente, 0.36 $\pm$ 0.04ml, 0.37 $\pm$ 0.03ml, 0.34 $\pm$ 0.04ml, 0.27 $\pm$ 0.03ml e 0.27 $\pm$ 0.04ml.

Foram calculadas as áreas sob as curvas das respostas de todos os animais, tivemos para o grupo NE uma área de 76.4 $\pm$ 4.2 e para o grupo E uma área de 53.6 $\pm$ 4.7 representando uma diminuição de 29.8%, que foi detectado pelo teste t não pareado como sendo muito significativo.

Nos grupos desafiados com carragenina 1mg (Figura 3) os tempos observados foram 60', 120', 180', 240', 300'. As médias das medidas realizadas no grupo NE apresentaram os seguintes resultados 0.25 $\pm$ 0.03ml, 0.51 $\pm$ 0.05ml, 0.56 $\pm$ 0.07ml, 0.74 $\pm$ 0.07ml e 0.77 $\pm$ 0.08ml. No grupo E as médias dos volumes de edema foram, respectivamente, 0.15 $\pm$ 0.04ml, 0.40 $\pm$ 0.04ml, 0.51 $\pm$ 0.05ml, 0.61 $\pm$ 0.06ml e 0.58 $\pm$ 0.04ml.

Nas áreas calculadas sob as curvas das respostas de todos os animais, tivemos para o grupo NE uma área média de 102.2 $\pm$ 9.7 e para o grupo E uma área média de 82.2 $\pm$ 8.4, a diferença existente entre os dois grupos foi considerada não significativa pelo teste t não pareado aplicado nas áreas sob as curvas.

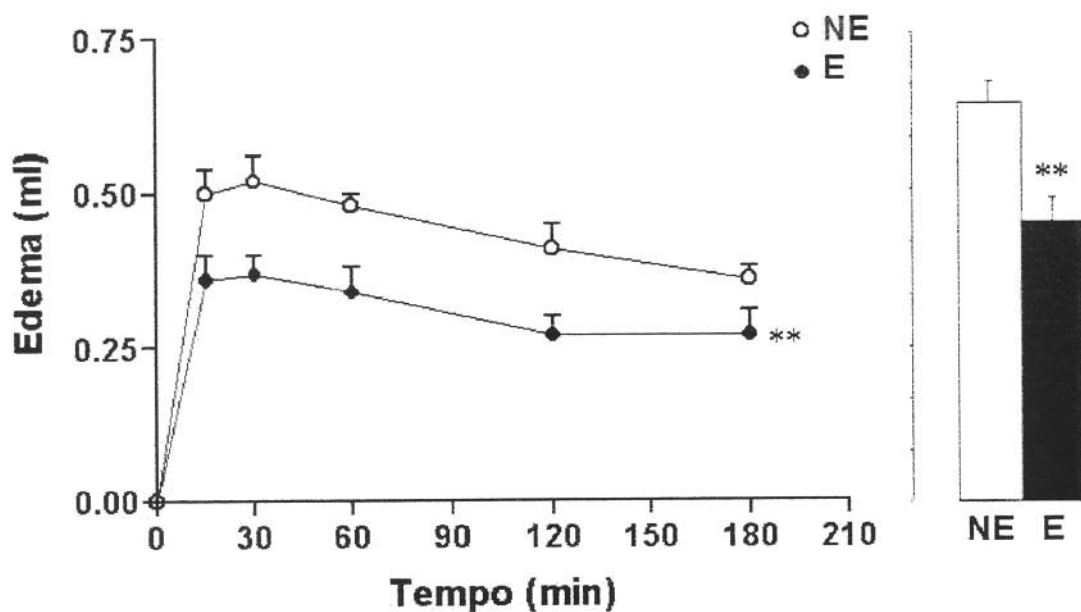


Figura 2. Edema de pata em ratos induzido por C48/80 (5µg/pata). Os círculos abertos representam o grupo não estressado (NE) e os círculos fechados representam o grupo prenatalmente estressado (E). O histograma à direita representa a área sob a curva, sendo a barra aberta o grupo NE e a barra fechada o grupo E. Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M, $** < 0.01$, teste t não pareado aplicado na área sob curva, (N=5 cada).

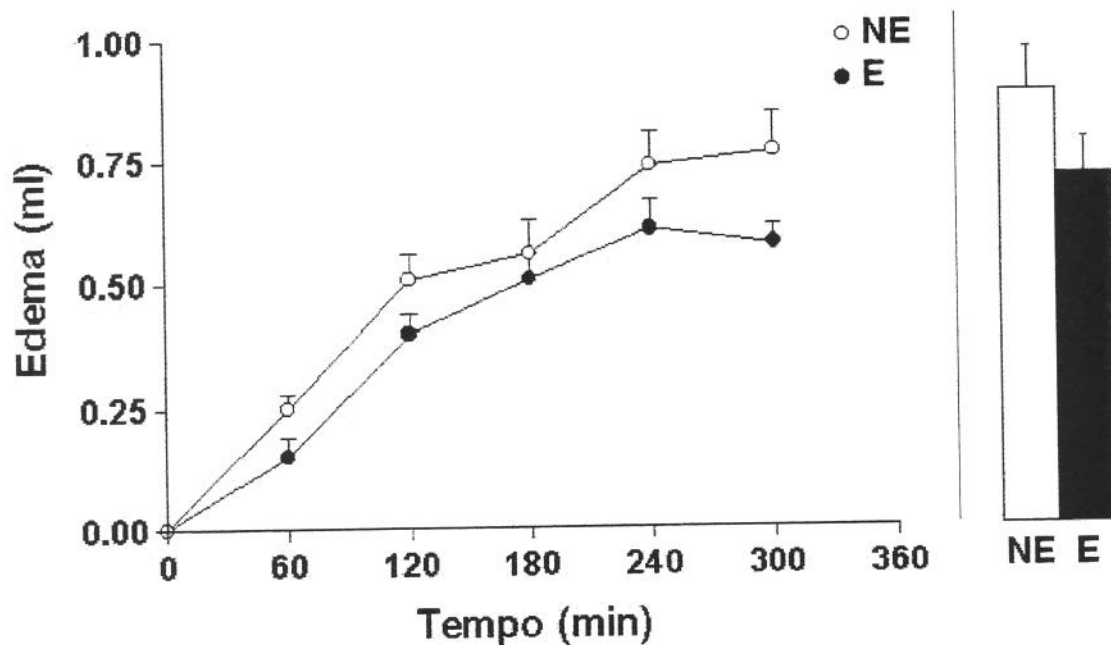


Figura 3. Edema de pata em ratos induzido por carragenina (1mg/pata). Os círculos abertos representam o grupo não estressado (NE) e os círculos fechados representam o grupo prenatalmente estressado (E). O histograma à direita representa a área sob a curva, sendo a barra aberta o grupo NE e a barra fechada o grupo E. Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M, teste t não pareado aplicado na área sob curva demonstrou não haver diferença entre os grupos estudados, (N=5 cada).

3.4 Pleurisia não alérgica

A pleurisia não alérgica utilizou carragenina 125 µg/cavidade como estímulo, os tempos avaliados fora de 6h, 24h e 48h. Foram avaliadas as quantidades do total de leucócitos (Figura 4A) e as contagens diferenciais de neutrófilos (Figura 4B), eosinófilos (Figura 4C) e células mononucleares (Figura 4D).

A contagem total de leucócitos (Figura 4A) apresentou, para o grupo NE, os seguintes resultados: 61.3 ± 3.6 , 46.1 ± 6.2 e 22.7 ± 4.7 leucócitos/lavado $\times 10^6$, respectivamente nos tempos estudados. O grupo E apresentou, respectivamente, um influxo de 59.4 ± 5.2 , 51.1 ± 3.4 e 20.6 ± 3.8 leucócitos/lavado $\times 10^6$.

Os neutrófilos (Figura 4B) tiveram, para o grupo NE, um influxo de 46.4 ± 3.6 , 31.6 ± 4.2 e 3.1 ± 1.2 neutrófilos/lavado $\times 10^6$, respectivamente e para o grupo E a quantidade de neutrófilos foi, respectivamente, 41.9 ± 3.4 , 29.0 ± 2.6 e 1.7 ± 0.4 neutrófilos/lavado $\times 10^6$.

Na contagem diferencial de eosinófilos (Figura 4C) ocorreu, para o grupo NE, um influxo de 0.5 ± 0.24 , 1.7 ± 0.5 e 1.4 ± 0.5 eosinófilos/lavado $\times 10^6$, respectivamente nos tempos estudados. No grupo E o infiltrado foi de 0.6 ± 0.2 , 4.0 ± 0.3 e 1.5 ± 0.3 eosinófilos/lavado $\times 10^6$, respectivamente.

O infiltrado de células mononucleares (Figura 4D), para o grupo NE, foi de 14.3 ± 1.0 , 12.8 ± 2.2 e 18.3 ± 3.3 células mononucleares/lavado $\times 10^6$, respectivamente, e para o grupo E foi de 16.9 ± 2.4 , 18.0 ± 2.5 e 17.4 ± 3.3 células mononucleares/lavado $\times 10^6$, respectivamente, nos tempos estudados.

ANOVA seguida de Student-Newman-Keuls detectou um aumento significativo de eosinófilos para o grupo E no tempo de 24h, o aumento foi de 142.17% com relação ao grupo NE. Não houve diferença significativa em outros tempos ou tipos celulares.

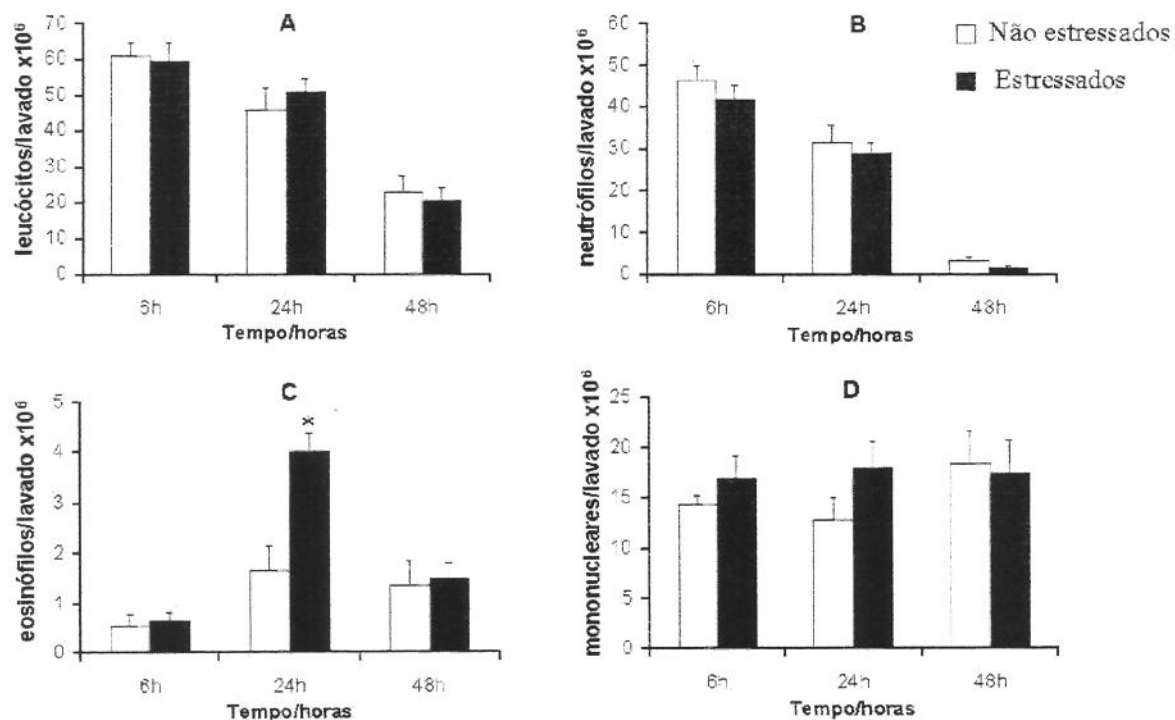


Figura 4. Número de leucócitos totais e diferenciais em pleura de ratos induzido por carragenina (1mg/cavidade). O número total de leucócitos (A), neutrófilos (B), eosinófilos (C) e células mononucleares (D) foram expressos 6, 24 e 48 horas após a injeção intrapleural. As barras abertas representam os grupo não estressados e as barras fechadas representam os grupos prenatalmente estressados. Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. * $p < 0.05$ ANOVA seguida de Student-Newman-Keuls (N=7-8 cada).

3.5 Pleurisia alérgica

A pleurisia alérgica foi realizada com sensibilização e provocação antigênica com ovoalbumina (OVA), para avaliar a eficiência da sensibilização os animais NE ou E receberam OVA ou apenas veículo, tendo-se 4 grupos experimentais: não estressado-não sensibilizado (NE-NS), não estressado-sensibilizado (NE-S), estressado-não sensibilizado (E-NS) e estressado-sensibilizado (E-S). As contagens foram feitas 24h após a provocação antigênica.

Na contagem total de leucócitos (Figura 5A) tivemos um influxo de 4.5 ± 0.6 leucócitos/lavado $\times 10^6$ para o grupo NE-NS, 10.2 ± 0.4 leucócitos/lavado $\times 10^6$ para o grupo NE-S, 6.1 ± 0.6 leucócitos/lavado $\times 10^6$ para o grupo E-NS e 17.6 ± 2.7 leucócitos/lavado $\times 10^6$ para o grupo E-S. ANOVA seguida de Student-Newman-Keuls demonstrou significativa diferença entre os grupos NE-NS e o grupo NE-S, onde o grupo NE-S apresentou um aumento significativo de 125.5% no total de leucócitos em relação ao grupo NE-NS demonstrando a eficiência do método de sensibilização. O grupo E-S teve um influxo de leucócitos 72.9% maior que do grupo NE-S, considerado estatisticamente muito significativo.

A contagem diferencial de neutrófilos apresentou um infiltrado de 0.4 ± 0.1 neutrófilos/lavado $\times 10^6$ para o grupo NE-NS, 0.7 ± 0.1 neutrófilos/lavado $\times 10^6$ para o grupo NE-S, 0.5 ± 0.1 neutrófilos/lavado $\times 10^6$ para o grupo E-NS e 1.4 ± 0.4 neutrófilos/lavado $\times 10^6$ para o grupo E-S. O grupo E-S apresentou um aumento estatisticamente muito significativo de 105.7%, quando comparado ao grupo NE-S.

O infiltrado de eosinófilos foi de 1.3 ± 0.1 eosinófilos/lavado $\times 10^6$ para o grupo NE-NS, 3.0 ± 0.2 eosinófilos/lavado $\times 10^6$ para o grupo NE-S, 1.7 ± 0.1 eosinófilos/lavado $\times 10^6$ para o grupo E-NS e 6.1 ± 0.7 eosinófilos/lavado $\times 10^6$ para o grupo E-S. O grupo NE-S teve um aumento estatisticamente significativo de 136.8% com relação ao grupo NE-NS, demonstrando a eficiência do protocolo de sensibilização. O grupo E-S teve um aumento considerado pela ANOVA seguida de Student-Newman-Keuls como extremamente significativo de 106.7% quando comparado ao grupo NE-S.

O infiltrado de células mononucleares foi de 2.6 ± 0.3 células mononucleares/lavado $\times 10^6$ para o grupo NE-NS, 6.4 ± 0.2 células mononucleares/lavado $\times 10^6$ para o grupo NE-S, 3.9 ± 0.5 células mononucleares/lavado $\times 10^6$ para o grupo E-NS e 10.0 ± 1.8 células mononucleares/lavado $\times 10^6$ para o grupo E-S. O grupo NE-S teve um aumento estatisticamente significativo de 153.5% com relação ao grupo NE-NS, demonstrando a eficiência do protocolo de sensibilização também neste tipo celular. Com relação à influência do estresse, o grupo E-S teve um aumento de 53.8%, considerado significativo pela ANOVA, seguida de Student-Newman-Keuls quando comparado ao grupo NE-S.

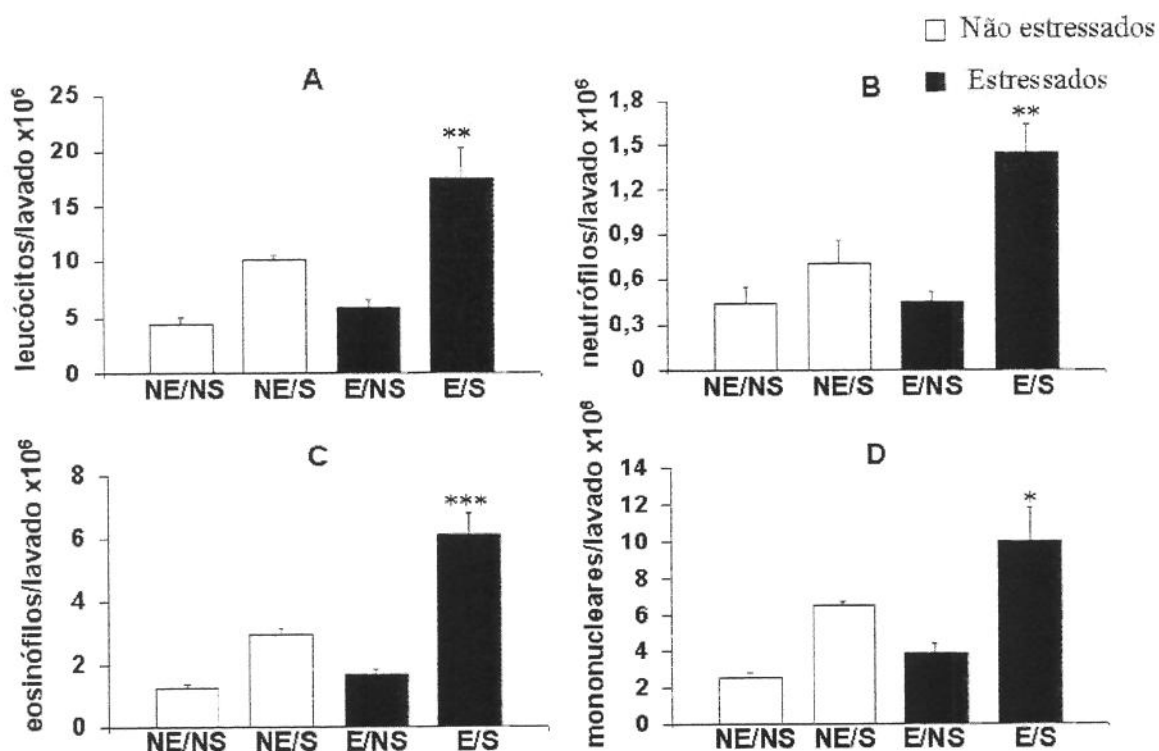


Figura 5 Número de leucócitos totais e diferenciais em pleurisia de ratos não estressados-não sensibilizados (NE-NS), não estressados-sensibilizados (NE-S), estressados-não sensibilizados (E-NS) e estressados-sensibilizados (E-S). O número total de leucócitos totais (A), neutrófilos (B), eosinófilos (C) e células mononucleares (D) foram expressos 24 horas após a injeção intrapleural de OVA. Os resultados representam a média $\pm$ E.P.M. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$, ANOVA seguida de Student-Newman-Keuls comparado ao grupo NE-S. (N=5 cada).

4. Discussão

Vários estudos já estabeleceram que a aplicação de estressores durante a fase intra-uterina provoca diversas alterações morfológicas, comportamentais e fisiológicas durante o desenvolvimento e na vida adulta em roedores (WARD, 1972; DAHLOF, HARD, LARSSON, 1977, MEISEL, DOHANICH, WARD, 1979; WEINSTOCK, FRIDE, HERTZBERG, 1988; SECOLI & TEIXEIRA, 1998). As alterações causadas pelo estresse pré-natal já aparecem no nascimento com a diminuição no tamanho da ninhada (FRIDE & WEINSTOCK, 1984), esta diminuição parece estar associada à diminuição no nascimento de filhotes macho (TEIXEIRA, LOPES, SECOLI, 1995; SECOLI & TEIXEIRA, 1998). Outra alteração observada é a diminuição da distância ano-genital nos filhotes machos (DAHLOF, HARD, LARSSON, 1977; DAHLOF, HARD, LARSSON, 1978).

Neste estudo aplicamos o esquema de estresse proposto por WILLNER et al. (1987) e observamos a diminuição do número de filhotes por ninhada e também no nascimento de machos. Estes dados são consistentes com os de SECOLI & TEIXEIRA (1998), que utilizaram o mesmo de estresse e obtiveram o mesmo resultado.

São muito escassos os trabalhos que estudam o efeito de estressores no período pré-natal sobre a resposta inflamatória dos descendentes, sendo mais fácil encontrar estudos que avaliam a resposta imunológica. KLEIN & RANGER (1995) avaliaram o efeito do estresse sobre a função imune dos descendentes tanto em idade juvenil, como em ratos adultos. As ratas prenhas foram expostas à imobilização sob alta luminosidade três vezes ao dia durante a última semana de gestação. A proliferação estimulada por concanavalin-A não foi alterada, a citotoxicidade das células natural killer (NK) foi brandamente diminuída em machos jovens, mas não em fêmeas, porém nos adultos a citotoxicidade de NK foi brandamente aumentada para ambos os sexos. Outro dado importante foi da resposta imune humoral específica, onde todos os descendentes apresentaram altos níveis de anticorpos

quando desafiados com o antígeno keyhole limpet hemocyanin (KLH) quando comparados aos controles.

O estudo realizado por KAY et al. (1998), em ratos adultos, apresentou como resultado alguns parâmetros imunes diferentes dos obtidos por KLEIN & RANGER. Ratas prenhas foram perturbadas com barulho e alta iluminação três vezes por semana durante toda a gestação. Nestas condições, o estresse pré-natal diminuiu a proliferação de linfócitos do baço para os mitógenos pokeweed (PWM) e fitohemaglutinina (PHA) e diminuiu a citotoxicidade das células NK.

Este trabalho é o primeiro a avaliar os efeitos do estresse pré-natal sobre a resposta inflamatória edematogênica. O edema induzido na pele por PAF, LPS, carragenina e C48/80 não foi alterado pelo estresse pré-natal, assim como o edema induzido em pata por carragenina, porém quando o edema de pata foi induzido com C48/80, houve uma significativa diminuição da formação de edema.

Para analisar os resultados dos testes de edema de pele e edema de pata deve-se considerar, em primeiro lugar, as diferenças existentes entre os leitos vasculares estudados e as características de cada método utilizado.

Ratos que foram submetidos ao estresse pré-natal, quando submetidos ao estresse na idade adulta, exibem uma prolongada secreção de corticosterona em relação a ratos que não foram prenatalmente estressados, demonstrando hiperatividade no eixo HPA (FRIDE et al., 1986; HENRY et al., 1994; MACCARI et al., 1995; VALLÉE et al., 1996).

No teste de edema de pele os animais são profundamente anestesiados e, durante as etapas do experimento eles estão desacordados, desta forma a manipulação requerida para execução do experimento não afetaria os animais emocionalmente.

Já no teste de edema de pata, os animais são manipulados durante todo o experimento, sentindo todo desconforto do inchaço nas patas e da manipulação, visto que estão superficialmente anestesiados apenas quando recebem o indutor na pata. Estes eventos podem induzir a um maior aumento nos níveis de corticosterona nos animais prenatalmente estressados do que nos ratos não estressados, isto explicaria um menor volume de edema nas patas dos ratos filhos de mães estressadas quando estimuladas com C48/80.

Outra explicação seria uma maior produção de catecolaminas pelos ratos prenatalmente estressados (FRIDE & WEINSTOCK, 1989; TAKAHASHI et al., 1992; ALONSO et al., 1994), com uma maior produção de neurotransmissores adrenérgicos ocorreria uma vasoconstrição, que poderia diminuir a formação do edema induzido pelo C48/80.

O composto 48/80 age ativando os mastócitos a desgranularem histamina e serotonina (SLORACH & UVNAS, 1968; GARLAND & PAYNE, 1979). A carragenina age de maneira mais generalizada, ativando diversos mediadores na resposta inflamatória aguda, os principais são o sistema complemento, histamina, serotonina, cininas e prostaglandinas (DI ROSA, GIROUD, WILLOUGHBY, 1971).

Seria natural, que a diminuição do edema ocorrido no C48/80 também aparecesse quando o estímulo fosse a carragenina, já que a serotonina e a histamina também participam do edema provocado por este agente (DI ROSA, GIROUD, WILLOUGHBY, 1971). Uma explicação para o estresse pré-natal não ter afetado o edema induzido pela carragenina seria a alteração na produção de algum mediador específico, reagente à carragenina, que pode alterar a resposta vascular, contrabalançando a diminuição que apareceu somente quando os mediadores ativos eram a histamina e serotonina.

Poderíamos especular que o óxido nítrico (NO), pode ser a molécula responsável por esse. Animais expostos ao estresse pré-natal apresentam ansiedade como uma característica comportamental (VALLÉE et al., 1997; WEINSTOCK, FRIDE, HERTZBERG, 1988), o NO tem papel ansiogênico no sistema nervoso central, esse papel foi observado pela ação ansiolítica do L-Name (FARIA et al., 1997), um composto inibidor da síntese do NO. A inibição da síntese do NO provoca também diminuição do edema de pata produzido pela carragenina, essa redução é atribuída à redução do fluxo sanguíneo (MEDEIROS et al, 1995). Desta forma, poderíamos imaginar, se o estresse pré-natal tiver efeito sobre a síntese de NO, este poderia estar produzindo alterações na formação do edema. Entretanto, futuros estudos complementares são necessários para fortalecer essa hipótese.

Com relação à resposta inflamatória celular, esta foi estudada sob estímulos não alérgico e alérgico.

O indutor não alérgico da migração celular foi a carragenina, os resultados demonstraram um significativo aumento no influxo de eosinófilos no tempo de 24h, sem alteração nos outros tempos e tipos celulares estudados.

A alteração neste único tipo celular, leva a acreditar que pode estar ocorrendo alteração na produção de um mediador específico da resposta inflamatória, que esteja relacionado com o tipo celular afetado, no caso, os eosinófilos. Dentre os fatores que podem induzir o influxo de eosinófilos pode-se destacar as citocinas (FACCIOLI et al., 1990; RIBEIRO et al., 1991), leucotrienos (SMITH, FORD-HUTCHINSON, BRAY, 1980) e o NO (FERREIRA et al., 1996).

Para o protocolo de pleurisia alérgica induzida com sensibilização e desafio com ovoalbumina (OVA), tanto a contagem do número total de leucócitos quanto as contagens

diferencias de neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares foram significativamente maiores nos ratos prenatalmente estressados. Estes resultados são compatíveis aos obtidos por NOGUEIRA et al. (1999), utilizando-se de um modelo experimental de asma alérgica.

A maneira como o estresse pré-natal afeta a resposta inflamatória é desconhecida. Porém, assim como descrito anteriormente, os animais estressados prenatalmente possuem menor habilidade de retornar a homeostase após sua exposição a um estressor, exibindo uma prolongada secreção de corticosterona e hiperatividade do eixo HPA (FRIDE et al., 1986; HENRY et al., 1994; MACCARI et al., 1995; VALLÉE et al., 1996), devido à diminuição de receptores hipocampais para corticosterona (MACCARI et al., 1995).

O eixo HPA também pode ser hiperativado através de sinais inflamatórios. As citocinas possuem papel fundamental neste processo, tanto a IL-1 α quanto a IL-1 β afetam a atividade pituitária-adrenal através do aumento da secreção de CRH (BERKENBOSCH et al. 1987; SAPOLSKY et al. 1987). Além dessas, receptores de TNF- α , IL- β e IL-6 já foram encontrados nos neurônios do núcleo paraventricular no hipotálamo (CUNNINGHAM & DE SOUZA, 1993; YABUCHI et al., 1994; ERICSSON et al., 1995; MARQUETTE et al., 1995; WONG et al., 1995; ROTHWELL, LUHESHI, TOULMOND, 1996).

Os corticosteróides, produto final da hiperativação do eixo HPA, possuem papel antiinflamatório, porém, em situações específicas, podem possuir um papel pró-inflamatório. Classicamente, um aumento na concentração de corticosteróides pode depletar os leucócitos circulantes, porém, muitas evidências sugerem que estes leucócitos são “seqüestrados” e inativados em tecidos imunes. Estes leucócitos podem, se necessário, migrar para áreas inflamadas (SAPOLSKY, ROMERO, MUNCK, 2000). DABHAR & McEWEN (1996) observaram que após a aplicação de estresse agudo, a aplicação de um

antígeno específico na pele produziu um aumento significativo na migração celular em resposta ao antígeno.

Sendo assim, as citocinas podem agir como estressores, ativando o eixo HPA, entre as fases do desafio antigênico e do sacrifício dos animais, provocando altas concentrações de corticosteróides que podem, nesta situação, ter uma ação pró-inflamatória para a migração celular.

É interessante destacar que a disfunção do eixo HPA que ocorre nos filhos de mãe estressada também é observada na depressão endógena (GOLD, GOODWIN, CHROUSOS, 1988), sugerindo uma correlação entre a resposta imune ou inflamatória e a depressão (CONNOR & LEONARD, 1998), já que o estresse pré-natal agrava a depressão produzida pelo modelo de desamparo aprendido (SECOLI & TEIXEIRA, 1998).

Este estudo demonstrou, também, que o estresse pré-natal altera a resposta inflamatória, principalmente se esta for produzida em resposta a um estímulo alérgico e vem a contribuir com o entendimento das interações neuroendocrinoimune.

5. Conclusões

O estresse crônico pré-natal:

- 1) Diminuiu o tamanho das ninhadas pela diminuição na quantidade de descendentes macho.
- 2) Não alterou, o edema produzido por PAF, LPS, carragenina e composto 48/80 em pele de ratos.
- 3) Diminuiu, de maneira muito significativa, o edema produzido pelo composto 48/80 e não produziu efeito quando o estímulo foi carragenina em pata de ratos.
- 4) Aumentou significativamente o número de eosinófilos em pleurisia induzida por carragenina.
- 4) Exacerbou de maneira generalizada (leucócitos totais, neutrófilos, eosinófilos e células mononucleares) a resposta inflamatória celular quando induzida por sensibilização e desafio antigênico com ovoalbumina, sugerindo que a inflamação alérgica é bem mais afetada que a não alérgica.

6. Summary

In this work we investigated the chronic mild prenatal stress effect on the vascular and cellular inflammatory response in rats.

Pregnant female Wistar rats were submitted to the stress model proposed by WILLNER et al., 1987, that consisted of varied and transitory alterations of the environment of creation of the animals in the last 2 weeks of gestation, the control group stayed without any manipulation, except routine cares.

The adults offspring were submitted to the following tests: skin oedema, paw oedema, non allergic pleurisy, allergic pleurisy. To the allergic pleurisy protocol, the animals were sensitized in the first day of stress protocol with a subcutaneous injection of ovalbumin (OVA), after the last day of the stress protocol the animals were challenged with OVA in the pleural cavity. The non-allergic pleurisy was induced by carrageenan, the oedema was induced by carrageenan or C48/80 and the skin oedema with PAF, LPS, carrageenan and C48/80.

In the allergic pleurisy de pleural lavage was collected 24h after the antigenic challenge with OVA, in the non-allergic pleurisy procedure the pleural lavage was collected 6, 24 and 48h after induction by carrageenan. The volume of paws measure to non-allergic paw oedema was performed 60, 120, 180, 240 and 300min after induction by carrageenan and 15, 30, 60, 120 and 180min for C48/80.

The results showed not significant difference between the stressed and non-stressed groups in the skin oedema to all stimulus. Already, the edematogenic response was

diminished to the prenatally stressed rats in comparison to the non-stressed in the paw oedema induced C48/80, but not in the rats were stimulated with carrageenan.

The non-allergic pleurisy showed a significant enhancement in the eosinophils infiltration 24h challenge with carrageenan in prenatally stressed rats. In the allergic pleurisy the prenatally stressed rats exhibited a significant exacerbation in the leukocytes influx, differentially this exacerbation occurred to all cellular types studied: neutrophils, eosinophils and mononuclear cells.

Referências

Bibliográficas

- ADER, R. & CONKIN, P.M. - Handling of pregnant rats: effect on emotionality of their offspring. **Science**, **142**: 411-2, 1963.
- ALONSO, S.J.; NAVARRO, E; RODRIGUEZ, M. - Permanent dopaminergic alterations in the n. accubens after prenatal stress. **Pharmacol Biochem Behav**, **49**: 353-8, 1994.
- ARCHER, J.E. & BLACKMAN, D.E. - Prenatal psychological stress and offspring behavior in rats and mice. **Dev Psychobiol**, **4**: 193-248, 1971.
- ARNETZ, B.B.; WASSERMAN, J.; PETRINI, B.; BRENNER, S.O.; LEVI, L.; ENEROTH, P.; SALOVAARA, H.; HJELM, R.; SALOVAARA, L.; THEORELL, T.; PETTERSON, I.L. - Immune function in unemployed women. **Psychosom Med** **49**: 3-12, 1987.
- AZZAWI, M.; JOHNSTON, P.W.; MAJUDAR, S.; KAY, A.B.; JEFFERY, P.K. - T-lymphocyte and activated eosinophils in airway mucosa in fatal asthma and cystic fibrosis. **Am Rev Respir Dis**, **145**: 1477-88, 1992.
- BARTROP, R.W.; LUCKHURST, E.; LAZARUS, L.; KILOH, L.G.; PENNY, R. - Depressed lymphocyte function after bereavement. **Lancet**, **1**: 834-6, 1977.
- BESEDOVSKY, H.O.; DEL REY, A.; SORKIN, E.; DINARELLO, C.A. - Immunoregulatory feedback between interleukin-1 and glucocorticoid hormones. **Science**, **223**: 652-4, 1986.
- BEVILACQUA, M.P.; STENGELIN, S.; GIMBRONE, M.A. Jr.; SEED, B. - Endothelial leukocyte adhesion molecule 1: an inducible receptor for neutrophils related to complement regulatory proteins and lectins. **Science**, **243**: 1160-5, 1989.
- BLALOCK, J.E. - A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. **Physiol Rev**, **69**: 1-32, 1989.

- BORYSENKO, M. & BORYSENKO, J. - Stress, behavior, and immunity: animal models and mediating mechanisms. **Gen Hosp Psychiatry**, **4**: 59-67, 1982.
- BRAIN, S.D. & WILLIAMS, T.J. - Inflammatory edema induced by synergism between calcitonin gene-related peptide (CGRP) and mediators of increased vascular permeability. **Br J Pharmacol**, **86**: 855-60, 1985.
- BRAY, M.A.; CUNNINGHAM, F.M.; FORD-HUTCHINSON, A.W.; SMITH, M.J.H. - Leukotriene B₄: a mediator of vascular permeability. **Br J Pharmacol**, **72**: 486-6, 1981.
- BRUIJNZEEL, P.L.; KOK, P.T.; HAMELINK, M.L.; KIJNE, A.M.; VERHAGEN, J. - Platelet-activating factor induces leukotriene C₄ synthesis by purified human eosinophils. **Prostaglandins**, **34**: 205-14, 1987.
- BURKE, L.A.; CREA, A.E.G.; WIKINSON, J.R.W.; ARM, J.P.; SPUR, B.W.; LEE, T.H. - Comparison of the generation of platelet activating factor and leukotriene C₄ in human eosinophil stimulated by unopsonized zymosan and by calcium ionophore A23187: the effect of nedocromil sodium. **J Allergy Clin Immunol**, **85**: 26-35, 1990.
- CHAPMAN, R.H. & STERN, J.M. - Maternal stress and pituitary-adrenal manipulations during pregnancy in rats: effects on morphology and sexual behavior of male offspring. **J Comp Physiol Psychol**, **92**: 1074-83, 1978.
- CHROUSOS, G.P. & GOLD, P.W. - The concepts of stress and stress system disorders: overview of behavioral and physical homeostasis. **J Am Med Assoc**, **267**: 1244-52, 1992.
- COE, C.L.; KEMNITZ, J.W.; SCHNEIDER, M.L. - Vulnerability of placental antibody transfer and fetal complement synthesis to disturbance of the pregnant monkey. **J Med Primatol**, **22**: 294-300, 1993.

- CONNOR, T.J. & LEONARD, B.E. - Depression, stress and immunological activation: the role of cytokines in depressive disorders. **Life Sci**, **62**: 583-606, 1998.
- CRONSTEIN, B.N. & WEISSMANN, G. - The adhesion molecules of inflammation. **Arthritis Rheum**, **36**: 147-57, 1993.
- CUNNINGHAM, E.T. & DE SOUZA, E.B. - Interleukin 1 receptors in the brain and endocrine tissues. **Immunol Today**, **14**: 161-76, 1993.
- DAHLOF, L.G.; HARD, E.; LARSSON, K. - Influence of maternal stress on the development of the fetal genital system. **Physiol and Behav**, **20**: 193-5, 1978.
- DAHLOF, L.G.; HARD, E.; LARSSON, K. - Influence of maternal stress on offspring sexual behavior. **Animal Behav**, **25**: 958-63, 1977.
- DANTZER, R. & KELLY, K.W. - Stress and immunity: An integrated view of relationships between the brain and the immune system. **Life Sci**, **44**: 1995-2000, 1989.
- DATTI, F.; ANTUNES, E.; TEIXEIRA, N.A. - O estresse crônico e a resposta inflamatória. In: XVI Latinamerican Congress of Pharmacology, Águas de Lindóia, 2000. **Resumos**. p.66. (Resumo, 01.010).
- DE SOUZA, E.B. - Corticotropin-releasing factor receptors: physiology, pharmacology, biochemistry and role in central nervous system and immune disorders. **Psychoneuroendocrinology**, **20**: 789-819, 1995.
- DEMNIÈRE, J.M.; PIAZZA, P.V.; GUEGAN, G.; ABROUS, N.; MACCARI, S.; LE MOAL, M.; SIMON, H. - Increased locomotor response to novelty and propensity to intravenous amphetamine self-administration in adult offspring of stressed mothers. **Brain Res**, **586**: 135-9, 1992.

- DHABHAR, F.S. - Stress-induced enhancement of cell-mediated immunity. **Ann N Y Acad Sci**, **840**: 359-372, 1998.
- DHABHAR, F.S. & McEWEN, B. - Stress-induced enhancement of antigen-specific cell-mediated immunity. **J Immunol**, **156**: 2608-15, 1996.
- DHABHAR, F.S. & McEWEN, B.S. - Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. **Brain Behav Immun**, **11**: 286-306, 1997.
- DI ROSA, M.; GIROUD, J.P.; WILLOUGHBY, D.A. - Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **J Pathol**, **104**: 15-29, 1971.
- DORIAN, B.; 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.
- FACCIOLI, L.H.; SOUZA, G.E.; CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H. - Recombinant interleukin-1 and tumor necrosis factor induce neutrophil migration "in vivo" by indirect mechanisms. **Agents Actions**, **30**: 344-9, 1990.
- FAJARDO, L. F. - The complexity of endothelial cells. **Am J Clin Pathol**, **92**: 241-50, 1989.
- FARIA, M.S.; MUSCARA, M.N.; TEIXEIRA, N.A.; DIAS, H.B.; DE OLIVEIRA, B.; GRAEFF, F.G.; DE NUCCI, G. - Acute inhibition of nitric oxide synthesis induces anxiolysis in the plus maze test. **Eur J Pharmacol**, **323**: 37-43, 1997.

- FELTEN, D.L.; FELTEN, S.Y.; BELLINGER, D.L.; CARLSON, S.L.; ACKERMAN, D.; MADDEN, K.S.; OLSCHOWKA, J.A.; LIVNAT, S. - Noradrenergic sympathetic neural interaction with the immune system: Structure and function. **Immunol Rev**, **100**: 225-60, 1987.
- FERREIRA, H.H.A.; MEDEIROS, M.V.; LIMA, C.S.P.; FLORES, C.A.; SANNOMIYA, P.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. - Inhibition of eosinophil chemotaxis by chronic blockade of nitric oxide biosynthesis. **Eur J Pharmacol**, **310**: 207-7, 1996.
- FRIDE, E. & WEINSTOCK, M. - Alterations in behavioral and striatal dopamine asymmetries induced by prenatal stress. **Pharmacol Biochem Behav**, **32**: 425-30, 1989.
- FRIDE, E. & WEINSTOCK, M. - The effect of prenatal exposure to predictable or unpredictable stress on early development in the rat. **Develop Psychobiol**, **17**: 651-60, 1984.
- FRIDE, E.; DAN, Y.; FELDON, J.; HALEVY, G.; WEINSTOCK, M. - Effects of prenatal stress on vulnerability to stress in prepubertal and adult rats. **Physiol & Behav**, **37**: 681-7, 1986.
- GALLI, S. J. - New concepts about the mast cells. **N Engl J Med**, **328**: 257-265, 1993.
- GAMSE, R.; SARIA, A. - Potentiation of tachykinin-induced plasma protein extravasation by calcitonin gene-related peptide. **Eur J Pharmacol**, **114**: 61-6, 1985.
- GARLAND, L.G. & PAYNE, A.N. - The role of cell-fixed calcium in histamine release by compound 48/80. **Br J Pharmacol**, **65**: 609-13, 1979.

- GIEMBYCZ, M.A.; KROEGEL, C.; BARNES, P.J. - Stimulation of the cyclooxygenase pathway in eosinophils by platelet-activating factor. Release of thromboxane-A₂ and prostaglandin E and their effects on eosinophil function. **J Immunol**, **144**: 3489-97, 1990.
- GLEICH, G. J. & ADOLPHSON, C. R. - The eosinophil leukocyte: structure and function. **Adv Immunol**, **39**: 177-253, 1986.
- GOLD, P.W.; GOODWIN, F.K.; CHROUSOS, G.P. - Clinical and biochemical manifestation of depression: relation to the neurobiology of stress (part 1 and 2). **N Engl J Med**, **319**: 348-420, 1988.
- GROSSAMN, A.; COSTA, A. - The regulation of hypothalamic CRH. Impact of in vitro studies on the central control of the stress response. **Funct Neurol**, **8**: 325-34, 1993.
- HARVEY, P.W. & CHEVINS, P.F. - Crowding of pregnant mice affects attack and threat behavior of male offspring. **Horm & Behav**, **19**: 86-97, 1985.]
- HENRY, C.; KABBAJ, M.; SIMON, H.; LE MOAL, M.; MACCARI, S. - Prenatal stress increases the hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses in young and adult rats, **J Neuroendocrinol**, **6**: 341-54, 1994.
- HERRENKOHL, L.R. - Prenatal stress reduces fertility and fecundity in female offspring. **Science**, **206**: 1097-99, 1979.
- HERRENKOHL, L.R. & POLITICH, J.A. - Effects of prenatal stress on the estrous cycle of female offspring as adults. **Experientia**, **23**: 1240-1, 1978.
- HERRENKOHL, L.R. & WHITNEY, J.B. - Effects of prepartal stress on postnatal nursing behavior litter development, and adult sexual behavior. **Physiol & Behav**, **17**: 1019-21, 1976.

- ISSEKUTZ, A.C. & LOPES, N. - Endotoxin activation of endothelium for polymorphonuclear leucocyte transendothelial migration and modulation by interferon-gamma. **Immunology**, **79**: 600-7, 1993.
- JOFFE, J.M. - Prenatal determinants of behavior. Oxford, Pergamon Press, 1969.
- JOFFE, J.M. - Hormonal mediation of the effects of prenatal stress on offspring behavior. In: GOTTLIEB, G. (Ed) - **Studies on the development of behavior and the nervous system: early influences**. Vol. 4 Academic Press, 1978. p. 108-44.
- JOHNSTON, R.B.Jr. - Current concepts in immunology: monocytes and macrophages. **N Engl J Med**, **318**: 747, 1988.
- KANOFSKY, J.R.; HOOGLAND, H.; WEVER, R.; WEISS, S.J. - Singlet oxygen production by human eosinophils. **J Biol Chem**, **263**: 9692-6, 1988.
- KAY, G.; TARCIC, N; POLTYREV, T; WEINSTOCK, M. - Prenatal stress depresses immune function in rats. **Physiol & Behav**, **63**: 397-402, 1998.
- KELLER-WOOD, M.; DALLMAN, M. - Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. **Endocr Rev**, **5**: 1-24, 1984.
- KHANSARI, D.N.; MURGO, A.J.; FAITH, R.E. - Effects of stress on the immune system. **Immunol Today**, **11**: 170-5, 1990.
- KIECOLT-GLASER, J.K.; FISHER, L.D.; OGROCKI, P.; STOUT, J.C.; SPEICHER, C.E.; GLASER, R. - Marital quality, marital disruption, and immune function. **Psychosom Med**, **49**: 13-34, 1987.
- KLEIN, S. L. & RAGER, D. R. - Prenatal stress alters immune function in the offspring of rats. **Dev Psychobiol**, **26**: 321-36, 1995.
- KNIPSCHILD, P.; MEIER, H.; SALLE, H. - Aircraft noise and birth weight. **Integ Arch Occup Envir Health**, **48**: 131-6, 1991.

- KORT, W.J. - The effect of chronic stress on the immune system. **Adv Neuroimmunol**, **4**: 1-11, 1994.
- KROEGEL, C.; VIRCHOW, J.R.; LUTTMANS, W.; WALKER, C.; WARNER, J. A. - Pulmonary immune cells in health and disease: the eosinophil leucocyte (Part I). **Eur Respir J**, **7**: 519-43, 1994.
- KUMAR, V.; COTRAN, R.S.; ROBBINS, S.L. - Inflamação aguda e crônica. In: _____ - **Patologia Básica**. 5 ed. Guanabara Koogan, 1992. p.21-39.
- LIPP, M. - **O stress está dentro de você**. São Paulo, Contexto, 1999. 199p.
- MACCARI, S.; PIAZZA, P.V.; KABBAJ, M.; BARBAZANGES, A.; SIMON, H.; LE MOAL, M. - Adoption reverses the long-term impairment in glucocorticoid feedback induced by prenatal stress. **J Neurosci**, **15**: 110-6, 1995.
- MACKAY, C.R. & IMHOF, B.A. - Cell adhesion in the immune system. **Immunol Today**, **14**: 99-102, 1993.
- MAIER, S.F.; WATKINS, L.R.; FLESHNER, M. - Psychoneuroimmunology - The interface between behavior, brain, and immunity. **Am Psycho**, **49**: 1004-17, 1994.
- MARIANI-PEDROSO, S.R.; BIZETO, L.; ANTUNES, E.; ZATZ, R.; DE NUCCI, G. - Dissimilarity between prostaglandin E1 and nitric oxide donors as potentiators of plasma exudation in the rabbit skin in vivo. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, **52**: 399-402, 1995.
- MARQUETTE, C.; VAN DAM, A-M.; BAN, E.; LANIÉCE, P.; CRUMEYROLLE-ARIAS, M.; FILLION, J.; BERKENBOSCH, F.; HAOUR, F. - Rat interleukin-1 β

- binding sites in rat hypothalamus and pituitary gland. **Neuroendocrinology**, **62**: 362-9, 1995.
- MEANEY, M.J.; AITKEN, D.H.; SHARMA, S.; VIAU, V.; SARRIAU, A. - Postnatal handling increases hippocampal type II, glucocorticoid receptors and enhances adrenocortical negative feedback efficacy in the rat. **Neuroendocrinology**, **50**: 597-604, 1989.
- MEDEIROS, M.V.; BINHARA, I.M.; MORENO JUNIOR, H.; ZATZ, R.; DE NUCCI, G.; ANTUNES, E. - Effect of chronic nitric oxide synthesis inhibition on the inflammatory responses induced by carrageenin in rats. **Eur J Pharmacol**, **285**: 109-14, 1995.
- MEIER, A. - Child psychiatric sequelae of maternal war stress. **Acta Psychiatr Scand**, **72**: 505-11, 1985.
- MEISEL, R.L.; DOHANICH, G.P.; WARD, I.L. - Effects of prenatal stress on avoidance acquisition in open-field performance and lordotic behavior in male rats. **Physiol & Behav**, **22**: 527-31, 1979.
- MENZAGHI, F.; HEINRICHS, S.C.; PICH, E.M.; WEISS, F.; KOOB, G.F. - The role of limbic and hypothalamic corticotropin-releasing factor in behavioral responses to stress. **Ann N Y Acad Sci**, **697**: 142-54, 1993.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M.J.; RIGGS, E.A. - Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Rev**, **43**: 109-42, 1991.
- MORLEY, J.; PAGE, C.P.; PAUL, W. - Inflammatory actions of platelet-activating factor (PAF-acether) in guinea-pig skin. **Br J Pharmacol**, **80**: 503-9, 1983.
- NATHAN, C.F. - Secretory products of macrophages. **J Clin Invest**, **79**: 319-26, 1987.

- NOGUEIRA P.J.; FERREIRA, H.H.A.; ANTUNES, E.; TEIXEIRA, N.A.- Chronic mild prenatal stress exacerbates the allergen-induced airway inflammation in rats. **Med Inflamm**, **8**: 119-22, 1999.
- OGAWA, T., MIKUNI, M.; KURODA, Y.; MUNEOKA, K.; JOHN MORI, K.; TAKAHASHI, K. - Periodic maternal deprivation alters stress responses in adult offspring: potentiates the negative feedback regulation of restraint stress-induced adrenocortical response and reduces the frequencies of open field-induced behaviors. **Pharmacol Biochem Behav**, **49**: 961-7, 1994.
- PAGE, C.P. - The platelet. In: DALE, M.M.; FOREMAN, J.C.; FAN, T.P.D. - **Textbook of Immunopharmacology**. Blackwell Scientific Publications, 49-54, 1994.
- PECK, M.J.; PIPER, P.J.; WILLIAMS, T.J. - The effect of leukotrienes C₄ and D₄ on the microvasculature of guinea-pig skin. **Prostaglandins**, **21**: 315-21, 1981.
- PERSOONS, J.H.A.; 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, 1995.
- PETERS, D.A.V. - Prenatal stress effects on brain biogenic amine and plasma corticosterone level. **Pharmacol Biochem Behav**, **17**: 721-5, 1982.
- PETERS, D.A.V. - Maternal stress increases fetal brain and neonatal cerebral cortex 5-hydroxytryptamine synthesis in rats: a possible mechanism by which stress influences brain development. **Pharmacol Biochem Behav**, **35**: 943-7, 1990.
- PFISTER, H.P. & IVINSKIS, A. - Prenatal psychological stress effects on offspring behavior in rats. **Australian J Psychol**, **35**: 21-36, 1983.
- RIBEIRO, R.A.; FLORES, C.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. - IL-8 causes in vivo neutrophil migration by a cell-dependent mechanism. **Immunology**, **73**: 472-7, 1991.

- ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. - Introdução ao sistema imune. In: _____ - **Imunologia**. 3 ed. Manole, 1993. p.1.1-1.12.
- ROTHWELL, N.J.; LUHESHI, G. TOULMOND, S. - Cytokines and their receptor in the central nervous system: Physiology, pharmacology, and pathology. **Pharmacol Ther**, **69**: 85-95, 1996.
- SAMPSON, A.P. - The role of eosinophils and neutrophils in inflammation. **Clin Exp Allergy**, **30** supp 1: 22-7, 2000.
- SAPOLSKY, R.M.; ROMERO, L.M.; MUNCK, A.U. - How do glucocorticoids influence stress response? Integrating permissive, supressivo, stimulatory, and preparative actions. **Endocrine Rev**, **21**: 55-89, 2000.
- SAPOLSKY, R.; RIVIER, C.; YAMAMOTO, G.; PLOTSKY, P.; VALE, W. - Interleukin-1 stimulates the secretion of hypothalamic corticotropin-releasing factor. **Science**, **238**: 522-4, 1987.
- SCHELL, L.M. - Environmental noise and human prenatal growth. **Am J Physiol**, **56**: 63-70, 1981.
- SECOLI, S.R. & TEIXEIRA, N.A. - Chronic prenatal stress affects development and behavioral depression in rats. **Stress**, **2**: 273-80, 1998.
- SLORACH, S.A. & UVNAS, B. - Dissociation of histamine release and ²²Na uptake in rat mast cells exposed to compound 48/80 *in vitro*. **Br J Pharmacol**, **34**: 194-5, 1968.
- SMITH, C.W.; KISHIMOTO, T.K.; ABBASSI, O.; HUGHES, B.; ROTHLEIN, R.; MCINTIRE, L.V.; BUTCHER, E.; ANDERSON, D.C. - Chemotactic factors regulate lectin adhesion molecule 1 (LECAM-1)-dependent neutrophil adhesion to cytokine-stimulated endothelial cells in vitro. **J Clin Invest**, **87**: 609-18, 1991.

- SMITH, C.W.; ROTHLEIN, R.; HUGHES, B.J.; MARISCALCO, M.M.; RUDLOFF, H.E.; SCHMALSTIEG, F.C.; ANDERSON, D.C. - Recognition of an endothelial determinant for CD 18-dependent human neutrophil adherence and transendothelial migration. **J Clin Invest**, **82**: 1746-56, 1988.
- SMITH, M.J.; FORD-HUTCHINSON, A.W.; BRAY, M.A. - Leukotriene B: a potential mediator of inflammation. **J Pharm Pharmacol**, **32**: 517-8, 1980.
- SOBRIAN, S.K.; VAUGHN, V.T.; BLOCH, E.F.; BURTON, L.E. - Influence of prenatal maternal stress on the immunocompetence of the offspring. **Pharmacol Biochem Behav**, **43**: 537-47, 1992.
- SPECTOR, W.G.; WILLOUGHBY, D.A. - Endogenous mediators of increased vascular permeability in inflammation. In: BUTLER & TANNER - **The pharmacology of inflammation**. The English Universities Press, 1968. p.22-54.
- STERNBERG, E.M.; CHROUSOS, G.P.; WILDER, R.L.; GOLD, P.W. - The stress response and the regulation of inflammatory disease. **Ann Intern Med**, **117**: 854-66, 1992.
- STOTT, D.N. - Follow-up study from birth of the effects of prenatal stresses. **Dev Med Child Neurol**, **15**: 70-787, 1973.
- STRATAKIS, C.A. - Greeks and nature, the "syndrome of just being sick," and the history of stress in health and disease. Washington Society for the History of Medicine. Washington, DC, 1992.
- STRAUSBAUGH, H.J.; DALLMAN, M.F.; LEVINE, I.D. - Repeated, but not acute, stress suppresses inflammatory plasma extravasation. **PNAS**, **96**: 14629-34, 1999.

- SWAAB, D.F. & MIRMIRAN, M. - Possible mechanisms underlying the teratogenic effects of medicines on the developing brain. In: YANAI, J. (ed) - **Neurobehavioral Toxicology**. Elsevier, 1984. p. 55-71.
- TAKAHASHI L.K.; TURNER, J.G.; KALIN, N.H. - Prenatal stress alters brain catecholaminergic activity and potentiates stress-induced behavior in adult rats. **Brain Res**, **574**: 131-7, 1992.
- TAKAHASHI, L.K.; BAKER, E.W.; KALIN, N.H. - Ontogeny of behavioral and hormonal responses to stress in prenatally stressed male rat pups. **Physiol & Behav**, **47**: 357-64, 1990.
- TAKEMURA, R. & WERB, Z. - Secretory products of macrophages and their physiological functions. **Am J Physiol**, **246**: C1-9, 1984.
- THOMPSON, W.R. - Influence of prenatal maternal anxiety on emotionality in young rats. **Science**, **125**: 698-9, 1957.
- UNANUE, E.R. & ALLEN, P.M. - The basis for the immunoregulatory role of macrophages and other accessory cells. **Science**, **236**: 551-7, 1987.
- VALENT, P. & BETTELHEIM, P. - Cell surface structures on human basophils and mast cell: biochemical and functional characterization. **Adv Immunol**, **52**: 333-423, 1992.
- VALENTINO, R.J.; FOOTE S.L.; PAGE, M.E. - The locus ceruleus as a site for integrating corticotropin-releasing factor and noradrenergic mediation of stress responses. **Ann N Y Acad Sci**, **697**: 173-88, 1993.
- VALLÉE, M.; MAYO, W.; DELLU, F.; LE MOAL, M.; SIMON, H.; MACCARI, S. - Prenatal stress induces high anxiety and postnatal handling induces low anxiety in adult offspring: correlation with stress-induced corticosterone secretion. **J Neurosci**, **17**: 2626-36, 1997.

- VALLÉE, M.; MAYO, W.; MACCARI, S.; LE MOAL, M.; SIMON, H. - Long-term effects of prenatal stress and handling on metabolic parameters: relationship to corticosterone secretion response. **Brain Res**, **712**: 287-92, 1996.
- VELAZQUEZ-MOCTEZUMA, J.; SALAZAR, E.D.; RUEDA, M.L.C. - The effect of prenatal stress on adult sexual behavior in rats depends on the nature of the stressor. **Physiol Behav**, **53**: 443-8, 1993.
- VENTURA, D.G.; PAIXÃO E SILVA JR., 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: XIV Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental – FeSBE, Caxambu, 1999. **Resumos**. São Paulo, 1999. p.404. (Resumo, 14.134).
- WAKSHLAK A.; WEINSTOCK, M. - Neonatal handling reverses behavioral abnormalities induced in rats by prenatal stress. **Physiol Behav**, **48**: 289-92, 1990.
- WARD, I. L. - The prenatal stress syndrome: Current status. **Psychoneuroendocrinol**, **9**: 3-11, 1994.
- WARD, I.L. - Prenatal stress feminizes and desmasculinizes the behavior of males. **Science**, **175**: 82, 1972.
- WEINSTOCK, M.; FRIDE, E.; HERTZBERG, R. - Prenatal stress effects on functional development on the offspring. **Prog Brain Res**, **73**: 319-331, 1988.
- WEINSTOCK, M.; MATLINA, E.; MAOR, G.I.; ROSEN, H.; McEWEN, B.S. - Prenatal stress selectively alters the reactivity of the hypothalamic-pituitary-adrenal system in the female rat. **Brain Res**, **595**: 195-200, 1992.

- WERB, Z.; CHIN, J.R.; TAKEMURA, R.; OROPEZA, R.L.; BAINTON, D.F.; STENBERG, P.; TAYLOR, J.M.; REARDON, C. - The cell and molecular biology of apolipoprotein E synthesis by macrophages. **Ciba Found Symp**, **118**: 155-71, 1986.
- WICK, G.; HU, Y; SCHWARZ, S. - Immunoenocrine communication via the hypothalamo-pituitary-adrenal axis in autoimmune diseases. **Endocrine Rev**, **14**: 539-63, 1993.
- WILLIAMS, T. J. - Vasoactive intestinal polypeptide is more potent than prostaglandin E₂ as a vasodilator and edema potentiator in rabbit skin. **Br J Pharmacol**, **77**: 505-9, 1982.
- WILLIAMS, T.J. & PECK, M.J. - Role of prostaglandin-mediated vasodilatation in inflammation. **Nature**, **270**: 530-2, 1977.
- WILLIAMS, T. J. & MORLEY, J. - Prostaglandins as potentiators of increased permeability in inflammation. **Nature**, **246**: 215-7, 1973.
- WILLNER, P. - Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. **Psychopharmacology**, **134**: 319-29, 1997.
- WILLNER, P.; TOWELL, A.; SAMPSON, D.; SOPHOKLEAS, S.; MUSCAT, R. - Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress and its restoration by tricyclic antidepressants. **Psychopharmacology**, **93**: 358-64, 1987.

- WONG, M-L.; BONGIORNO, P.B.; GOLD, P.W.; LICINIO, J. - Localization of interleukin-1 β converting enzyme mRNA in rat brain vasculature: Evidence that the genes encoding the interleukin-1 system are constitutively expressed in brain blood vessels. **Neuroimmunomodulation**, **2**: 141-8, 1995.
- YABUUCHI, K.; MINAMI, M.; KATSUMATA, S.; SATOH, M. - Localization of type I interleukin-1 receptor mRNA in the rat brain. **Mol Brain Res**, **27**: 27-36, 1994.

Anexo

Esquema do regime de estresse

Dias da semana	Privação comida	Privação água	Iluminação contínua	Inclinação da gaiola	Agrupamento gaiola	Gaiola molhada	Sala resfriada	Barulho intermitente 85 db	Luz estraboscópica	Garrafa vazia	Alimentação reduzida	Odor novo	Objeto estranho na gaiola
				→									
2ª	14:00 →	14:00 →		9:00		16:00 →	14:00 → 14:30		9:00 → 11:00				
3ª	14:00 →	→	18:00 →			9:00		14:00 → 16:00					
4ª	16:00 →	10:30 → 16:00	9:00				9:30 → 10:00	13:00 → 16:00	13:00 → 16:00	10:00 → 10:30			16:00 → 9:00
5ª	→	→ 9:00		9:30 → 16:00	16:00 → 9:00		9:00 → 9:30						
6ª	11:00 →						13:00 → 13:30	11:00 → 16:00			9:00 → 11:00	16:00 → 9:00	
Sáb.	9:00 →	9:00 →	18:00 →										
Dom.	14:00 →	14:00 →	14:00	16:00 →									