

Universidade de São Paulo
Instituto de Psicologia
Programa de Pós-Graduação em
Neurociências e Comportamento (NeC)

Karin Kieling

**Efeitos do estresse pré-natal sobre a atividade de
linfócitos de uma prole de camundongos**

São Paulo
2009

Karin Kieling

**Efeitos do estresse pré-natal sobre a atividade de
linfócitos de uma prole de camundongos**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Instituto de Psicologia da Universidade de
São Paulo para obtenção do título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração:

Neurociências e Comportamento (NeC)

Orientador:

Prof. Dr. João Palermo-Neto

Co-orientadora:

Dra Ana Paula Ligeiro de Oliveira

São Paulo
2009

KIELING, Karin

Efeitos do estresse pré-natal sobre a atividade de linfócitos de uma prole de camundongos

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Neurociências e Comportamento.

Data: ____/____/____.

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Prof. Dr. _____ Instituição: _____

Assinatura: _____ Julgamento: _____

Este trabalho foi desenvolvido nas dependências dos laboratórios de Farmacologia e Toxicologia do Departamento de Patologia (VPT), na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ-USP),; através do Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Comportamento. Houve, também, colaboração do grupo de pesquisa liderado pelo Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB I).

Agradeço a essencial colaboração de todos que proporcionaram sua realização.

DEDICATÓRIA

Mãe, tu me deste a vida e me ensinaste a vivê-la com honra e dignidade;
deixo aqui não somente meu imenso amor,
mas toda labuta representada por este trabalho.

A todos, cuja curiosidade os levam a pesquisar
e o amor os levam a trabalhar por um bem comum.

AGRADECIMENTOS

Minha amada família, que renunciou a minha presença diária por saber que estas páginas representam para mim a conquista de um sonho. AMO VOCÊS!

Joca, dizem que a felicidade não bate à porta: erraram! Você bateu, literalmente, à minha! Obrigada! Te amo...

Juju, você fez parte de toda essa caminhada... Como amiga, colega, irmã... Obrigada!

Aos professores Martha e Jorge, cujo carinho constante foi um oásis. Obrigada!

Maga e Rosires, não foram apenas os almoços, mas a vida que tornou-se mais substancial pela presença de vocês... Obrigada!

Aos amigos da informática FMVZ, Miro e “Cabelo”, pelo suporte.

Aos amigos incríveis, que dispuseram de seu tempo para me ajudar nas idéias e/ou com a “mão na massa”... Sem vocês, nada teria se conseguido ou mesmo valido a pena! Vag, Cá Lima, Déia, Moniquinha, Garé, Ana, Bia, Fer, Fred, Ri, Márcio, Glau, Portela, Natô, Evinha... Obrigada!

Aos técnicos do laboratório LABFAT-LADTOX: Priscila, Jibóia e Magali; bem como ao pessoal do biotério: Cláudia, Rosires, Herculano, Idalina, Mauro, Nelsinho; vocês são parte da labuta e foram indispensáveis para a realização deste trabalho! Obrigada!

Às secretarias, do Depto VPT: Cláudia, Cris e Silvinha e; do IP: Idalina e Ronaldo. Obrigada!

Ao Prof. Lú, que me recebeu de braços abertos como sua estagiária PAE. Aprendi com você mais do que teoria científica, lições de vida e humanidade. Obrigada!

Aos amigos do laboratório de histopatologia, Cláudio e Buga, pela amizade e auxílio. Obrigada!

Aos professores e amigos do Laboratório de Farmacologia das Vias Aéreas e Endócrino – ICB, pelo apoio e amizade. Obrigada!

A todos do Depto VPT e FMVZ da USP, inúmeras pessoas que direta ou sutilmente, tornaram agradável este ambiente que por tantas vezes foi um pouco minha casa... Obrigada!

Ao grupo de Neuroimuno, que através da convivência, muito aprendi e me desenvolvi... O valor deste grupo está nas pessoas que o compõem, não apenas nos números que produz... Obrigada!

À da FAPESP, cujo suporte foi vital. Obrigada!

Ao Prof. Dr. João, pois mesmo sem me conhecer de fato, me apoiou e incentivou. Por me dar subsídio para iniciar minha metamorfose de menina do interior para “gente grande” e, principalmente, por possibilitar, através deste trabalho, a realização de um sonho pessoal... Muito obrigada!

E enfim, agradeço às pessoas que trouxeram “arco-íris” e/ou “tempestades” à minha vida; o que sou hoje é a resultante de cada momento que tivemos. Quisera Deus que eu seja melhor do que fui ontem e, deveras pior do que venha a ser amanhã... Obrigada!

*“ ...Viver, e não ter a vergonha de ser feliz!
Cantar e cantar e cantar,
a beleza de ser um eterno aprendiz!...”*

Gonzaguinha.

RESUMO

KIELING, K. **Efeitos do estresse pré-natal sobre a atividade de linfócitos de uma prole de camundongos** [*Effects of prenatal stress on the lymphocytes mice litter activity*] 2008. 152 f. (Dissertação de Mestrado em Neurociências e Comportamento). Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Sabe-se que o feto é vulnerável a modificações do *milieu* materno, especificamente, a exposição a um estressor ativa sistemas neuroendócrinos (expoentes o eixo hipotálamo-hipófise-adrenais – HPA e o sistema nervoso autônomo simpático – SNAS). Quando no terço final da gestação, essas mudanças podem interferir com o desenvolvimento/ maturação neuroimune. Estudos prévios de nosso grupo demonstraram que, o estresse pré-natal diminuiu significativamente a imunidade inata e aumentou o *turnover* de noradrenalina hipotalâmica de camundongos, dados que somados a outros de literatura levaram aos objetivos deste trabalho: analisar os efeitos de um estresse pré-natal sobre parâmetros de linfócitos de camundongos. Os resultados obtidos mostraram que a aplicação de choques nas patas (0,2 mA, 10 choques/sessão), tanto no terço final gestacional quanto após desafio agudo pós-natal, contudo, não modificou significativamente os parâmetros linfocitários avaliados. Baseado nisto, levantamos hipóteses: 1- a existência de vias de redundância fisiológica capacitaria o organismo a manter sua homeostasia frente aos estressores empregados; 2- inaptidão do modelo de estresse empregado; 3- ausência de desafio imune prévio à análise de um sistema que é responsivo (adaptativo). A primeira hipótese confirmou-se quando desenvolvemos como estresse pós-natal o modelo do “estresse do metrô de Nova Iorque”; a segunda hipótese confirmou-se também verdadeira através de desafio em modelo experimental de asma OVA-induzida; finalmente, a terceira hipótese foi confirmada por estudos de outros autores.

Palavras-chave: Estresse, Neuroimunomodulação, Catecolaminas, Linfócitos, Estresse pré-natal, *Foot-shock*, estresse por contenção de movimentos.

ABSTRACT

KIELING, K. **Effects of prenatal stress on the lymphocytes mice litter activity** [*Efeitos do estresse pré-natal sobre a atividade de linfócitos de uma prole de camundongos*] 2008. 152 f. (Dissertação em Neurociências e Comportamento). Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

As a consequence of his fast development, the fetus is vulnerable to modifications from the hormonal maternal *milieu*. This is explained mainly by the permeability of the placental barrier to several hormones and substances. Specifically, it is known that the maternal exposition to a stressor activates neuroendocrine systems (exponents, the hypothalamus-pituitary-adrenal axis – HPA, and the sympathetic autonomic nervous system – SANS), causing an exaggerated production of neuropeptides, which have the potential to change the motherly-fetus homeostasis. When this unbalance occurs in the final three months of pregnancy, it may impact fetal systems that are still being developed/matured, as the immune and nervous systems. According to previous studies, the prenatal-stress proposed in this work was able to produce a significant decrease on innate immunity as assessed by the evaluation of the activity of peritoneal macrophages; it was also, a significant increment in hypothalamic noradrenaline turnover. Such prenatal events, could be derived and/or reflect a lost in adaptative immunity homeostasis. The objective of this work was, thus, to analyze lymphocyte parameters of prenatal stressed mice. A footshock stress (0,2 mA, 10 shock's of 5 seconds each/session) was applied both in the final third of gestation and/or in the postnatal adult life. Those stressors was anable to affect the lymphocytes viability and their subpopulation patterns token from peripheral blood; the esplenic lymphocytes proliferation ratio were also not changed. Those results suggested that: 1- the stress model was not effective; 2- the obtained results reflected the absence of an immune challenge applied previous by the experiments performedb; 3- the existence of physiologic redundancies turns the organisms able to react in a homeostatic way even exposed to stress situations.

Key-words: Stress, Neuroimmunomodulaion, Catecholamines, Lymphocytes, Prenatal-stress, Foot-shock, restraint stress.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

β_2 AR	Adreno-receptor do tipo β_2
Ac	anticorpo
ACTH	hormônio adrenocorticotrófico (<i>adrenocorticotrophic hormone</i>)
CFSE	fluorocromo para análise de proliferação celular por citometria de fluxo (<i>5-and-6-carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester</i>)
ConA	concanavalina A
CRF	fator liberador de corticotrofina (<i>corticotrophin release factor</i>)
ELISA	ensaio imunoadsorvente associado à enzima (<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>)
EPN	estresse pré-natal
GD	dia gestacional (<i>gestational day</i>)
HPA	hipotálamo-pituitária-adrenal
Ig	imunoglobulina
i.p.	intraperitoneal
IL	interleucina
LBA	lavado bronco alveolar
LPS	lipopolissacarídeo de bactérias gram-negativas
NE	norepinefrina (noradrenalina)
NIM	neuroimunomodulação
OVA	ovoalbumina
PBS	tampão fosfato-salina (<i>phosphate buffer saline</i>)
PHA	fitohemaglutinina A
PND	dia pós-natal (<i>post natal day</i>)
PVN	núcleo paraventricular (<i>paraventricular nucleus</i>)
SBF	soro bovino fetal
s.c.	subcutâneo
SI	sistema imune
SNA	sistema nervoso autônomo
SNAS	sistema nervoso autônomo simpático
SNC	sistema nervoso central
Th	Célula T auxiliar (CD4+)
WBC	leucócitos (<i>white blood cells</i>)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1 Estresse e neuroimunomodulação	14
2.2 Estresse pré-natal	25
2.3 Considerações sobre a inflamação alérgica pulmonar.....	31
3 OBJETIVO GERAL.....	36
3.1 Objetivos específicos.....	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 Animais	38
4.2 Reagentes e soluções.....	38
4.3 Obtenção dos filhotes e formação dos grupos	41
4.4 Modelos de estresse	42
4.5 Verificação do consumo de água de ração em diferentes períodos peri-natais.....	45
4.6 Parâmetros reprodutivos e gestacionais	45
4.7 Avaliação do desenvolvimento físico e reflexológico.....	46
4.8 Análise de parâmetros neuroimunes.....	47
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
6 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E RESULTADOS.....	56
6.1 EXPERIMENTO 1: Avaliação dos parâmetros reprodutivos e gestacionais de fêmeas estressadas ou não	56
6.2 EXPERIMENTO 2: Avaliação do consumo de água (mL) de ração (g) em diferentes períodos peri-natais de fêmeas estressadas ou não	57
6.3 EXPERIMENTO 3: Avaliação do desenvolvimento físico e reflexológico ...	59
6.4 EXPERIMENTO 4: Verificação do peso relativo das adrenais de animais estressados ou não pré- e/ou pós-natalmente	60

6.5 EXPERIMENTO 5: Contagem da celularidade total de medula óssea de animais estressados ou não pré- e/ou pós-natalmente.....	61
6.6 EXPERIMENTO 6: Fenotipagem dos linfócitos do sangue periférico de animais estressados ou não pré- e/ou pós-natalmente.....	62
6.7 EXPERIMENTO 7: Análise de viabilidade (apoptose/necrose) dos linfócitos do sangue periférico de animais estressados ou não pré- e/ou pós-natalmente.....	65
6.8 EXPERIMENTO 8: Testes-piloto de responsividade de esplenócitos à proliferação celular: seleção de mitógenos e doses de NE	66
6.9 EXPERIMENTO 9: Testes de responsividade à NE em proliferação de esplenócitos de animais estressados ou não pré- e/ou pós-natalmente	73
6.10 EXPERIMENTO 10: Validação do “estresse do metrô de NI”	81
6.11 EXPERIMENTO 11: Avaliação dos efeitos do estresse sobre a inflamação alérgica pulmonar (OVA-induzida).....	85
7 DISCUSSÃO	99
7.1 Avaliações perinatais.....	99
7.2 Avaliações imunes	100
7.3 Inflamação alérgica pulmonar – asma OVA-induzida	109
8 CONCLUSÕES	117
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	118

1 INTRODUÇÃO¹

Neste exato momento, arrisco-me a dizer que é possível que, em algum lugar: uma gazela foge desesperadamente de uma leoa, um executivo lança suas melhores estratégias para fechar um contrato, uma equipe cirúrgica labuta por salvar uma vida, um assaltante “briga” por alguns trocados, um trabalhador no térreo seu expediente enfrenta mais um final de tarde de trânsito caótico...

Como ponto de intersecção entre estes eventos, aparentemente tão desconexos, vivencia-se, em todos eles, a percepção de um perigo eminente que pode incluir, inclusive, sensação de ameaça às existências dos protagonistas.

Nossos sentidos básicos foram “treinados”, ao longo da evolução das espécies, para reconhecerem riscos à nossa integridade, sejam eles de natureza física ou psicológica. Sendo assim, não importa se estamos expostos ao ridículo público que fere nosso orgulho, se estamos perdidos no deserto sem suprimentos ou se enfrentamos um assaltante ou uma fera. Nossos órgãos sensoriais enviam ao encéfalo os avisos do que se passa no ambiente, estas informações são processadas e analisadas num contexto de memórias e conhecimentos prévios e, de lá, sai a regência de uma série de modificações da fisiologia de nosso organismo para reagir de alguma forma a estes estímulos.

Ou seja, todas estas situações são, de algum modo ou em algum grau estressoras.

Num contexto geral, o estresse é tido pelo senso comum como doença ou, pelo menos, como desencadeador ou agravante do desenrolar de diversas patologias. Da mesma forma em que quando estamos exacerbadamente felizes ou tristes, nossos corpos “materializam” nossas emoções em lágrimas, nosso encéfalo “traduz” os estímulos estressores em moléculas que “informarão” a todo nosso organismo que estamos estressados.

Após os modelos cartesianos que buscavam entender o funcionamento dos organismos por suas partes (sistemas), foi a disciplina denominada *Neuroimunomodulação* (NIM) ou *Psiconeuroimunologia* uma das que retomou a análise do *homem vitruviano* de *Da Vinci*, passando a enxergar o corpo como um todo, onde as partes se interconectam.

¹ As referências bibliográficas encontram-se no item 2 Revisão da Literatura.

Eis o campo de estudo aqui abordado: as relações bidirecionais entre o sistema nervoso central (SNC) e o sistema imune (SI).

Neste contexto, nossa proposta é analisar crítica e cientificamente os efeitos de estímulos estressores sobre parâmetros e/ou respostas do SI. Existem diferenças entre os efeitos de um estresse vivenciado na vida adulta de outro aplicado pré-natalmente, isto é, no período intra-uterino? Verticalizando, qual a intercorrência destes fatos sobre parâmetros indicativos de atividade de linfócitos?

Foi com o objetivo de responder a estas instigantes questões que este trabalho foi concebido.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Os dados aqui apresentados, compilam os achados de literatura por nós considerados como mais relevantes para o embasamento deste trabalho.

2.1 Estresse e neuroimunomodulação

“Eu ouvi um grito, e olhei em volta, eu vi o leão no momento em que ele pulou em cima de mim. Eu estava sobre um pequeno morro; ele alcançou meu ombro quando pulou, e nós dois caímos juntos no chão. Rugindo horrivelmente próximo ao meu ouvido, ele me sacudiu como se eu fosse um rato. O choque produziu um esturpor semelhante àquele que parece ser sentido por um camundongo após a primeira sacudida do gato. Isso causa um tipo de devaneio em que não se sente dor nem sensação de terror, ou qualquer consciência de tudo que está acontecendo. Isso foi semelhante ao descrito por pacientes sob influência parcial do clorofórmio que descrevem que vêem a operação, mas não sentem a faca... A sacudida aniquilou o medo e não permitiu qualquer sensação de horror ao olhar a fera. Esse estado peculiar é provavelmente produzido em todos os animais mortos por carnívoros; e, se é assim, é uma providência misericordiosa do nosso benevolente criador para diminuir a dor da morte”

(David Livingstone, *Missionary Travels*, 1857;
apud KANDEL; SCHWARTZ; JESSEL, 2003).

O texto acima é descrito por Kandel em “Princípios de Neurociência”, quando cita a experiência de David Livingstone, missionário e explorador escocês em viagem à África em 1857, em seu livro *Missionary Travels* (KANDEL; SCHWARTZ; JESSEL, 2003).

Todo ser vivo depara-se, ao longo de sua existência, com diversas situações estressantes e, uma vida de sucesso dependerá da capacitação dos organismos em montar uma resposta apropriada a qualquer destas situações em particular (HARBUZ; LIGHTMAN, 1992). Logo, é plausível que tais respostas encontrem-se

distribuídas de forma ubíqua e, portanto, sejam resultantes da seleção natural (DARWIN, 2000).

Parece intuitivo para o leigo, creditar a uma estresse conexão com distúrbios de saúde. Mas, encarar as respostas fisiológicas a um estressor como sendo algo negativo ao bem estar do organismo, pressupõe que este processo não atende ao molde darwiniano.

Então, afinal, o que é estresse?

Proveniente do inglês medieval, *distress*, a palavra foi cunhada inicialmente na física, como sinônimo de tensão mecânica (FERRARI; LEAL, 2006), e indicava a capacidade de resistência de uma ponte. Entre 1910 e 1920, Walter Cannon, estudou o tema e sugeriu que essa idéia enquadrava-se bem à imagem de adaptação às mudanças impostas por estímulos estressores: passar de um ponto a outro, como através de uma ponte mais ou menos resistente (CASTELNUOVO, 2005).

Contudo, segundo Castelnovo em 2005, o emprego do termo estresse com finalidade de denominar um novo estado fisiológico, não teria sido mérito de Cannon. A autora fundamentada no *Dicionário etimológico da língua italiana*, remete a procedência da palavra estresse ao extinto latim. No jargão latino popular, *districtia* significava angustia, aperto ou aflição. Empregada pelos franceses, esta palavra latina tornou-se *distress*, e os italianos receberam de volta o neologismo criando o verbo *strizzare* (estressar-se) (CASTELNUOVO, 2005). Seja qual for a real origem etimológica, fato é que os seres vivos sempre vivenciaram tal situação.

Fisiologicamente, estresse define-se como o conjunto de alterações orgânicas que visam um novo estado de homeostase, em resposta a um estímulo estressor. Já estressor, caracteriza-se, como qualquer agente (endógeno ou ambiental) capaz de produzir respostas reativas que alterem a homeostasia e, seu reconhecimento na circuitaria nervosa como tal, está condicionado ao grau de alteração fisiológica que ele envolve e/ou às experiências prévias do indivíduo (HERMAN; CULLINAN, 1997). As respostas emitidas em consequência destes estímulos são geralmente adaptativas a curto prazo (VISWANATHAN *ET AL.*, 2005; DHABHAR, 2003; DHABHAR E MCEWEN, 1997); no entanto, podem também serem prejudiciais, especialmente quando o estímulo estressor se mantém por um período prolongado ou crônico (SAUL *ET AL.*, 2005; MCEWEN, 1997).

Foi Hans Selye, na revista *Nature* de 4 de Julho de 1936, o primeiro autor a valer-se da palavra “estresse” para indicar a “síndrome de adaptação geral” ou “síndrome produzida por vários fatores nocivos”. Sua publicação histórica, descreve que, num primeiro momento após a exposição a estímulos lesivos/nocivos, o corpo reage de acordo com um determinado padrão estereotipado de sinais e sintomas que incluem hipertrofia das adrenais, úlceras gástricas e atrofia de órgãos linfóides como baço, timo e linfonodos, transudação pleural e peritoneal. Selye denominou este primeiro estágio de “reação geral de alarme”. A partir daí, o cessar ou a continuidade da exposição ao estímulo estressor determina, respectivamente, o retorno à condição fisiológica normal ou à síndrome decorrente da manutenção destas alterações até um padrão de “exaustão” orgânica. (COSTA-PINTO, 2004; STANDFORD E SALMON, 1993).

Estas observações acarretam, obrigatoriamente, o entendimento lógico de que estressores, de qualquer natureza, são sempre interpretados de forma semelhante pelo encéfalo, que responde com a liberações de substâncias que afetarão diretamente todo o organismo e nele, o sistema imune (SI). Nascia a idéia de *NIM* e, num primeiro momento, estabelecia-se a idéia de que a exposição continuada a um estressor implicava um quadro de doença.

Está bem descrita na literatura científica a existência de vias bidirecionais de modulação neuroendócrina e imunológica, relacionadas, principalmente, aos efeitos do estresse. Diversos estudos têm demonstrado uma fundamentação neuroimunológica para o desenvolvimento de algumas disfunções psicológicas como depressão, ansiedade, anorexia nervosa, síndrome de fadiga crônica ou estresse pós-traumático; algumas teorias acerca de doenças como patologias inflamatórias, metabólicas e auto-imunes, como por exemplo alergias, asma, câncer, doença de Alzheimer e esclerose múltipla têm se respaldado em idêntica fundamentação científica (TAGAY *ET AL.*, 2005; WINDLE *ET AL.*, 2001; LAWRENCE E KIM, 2000; MCEWEN *ET AL.*, 1997; DINARELLO E SAVAGE, 1989).

Neste sentido, o entendimento das bases fisiológicas do estresse proporciona não apenas um *approach* para análises científicas, mas também uma possibilidade de avanço em questões sócio-econômicas. Um estudo publicado no *European Journal of Health Economics* calcula que no ano 2000, das 24,5 milhões de pessoas em idade produtiva na França, de 300 a 400 mil experimentaram problemas de saúde relacionados a estresse no trabalho e destas, cerca de 2300 a 3600 vieram a

óbito. Os gastos com tratamentos e perda de serviço calculados neste contexto foram de 1,2 a 2 bilhões de euros, isto é, consumiram de 14 a 24% das verbas do sistema de saúde francês (BÉJEAN E SULTAN-TAÏEB, 2005).

Porém, retomemos a idéia de que “o estresse, em si, é um mecanismo natural de adaptação, não uma doença”, parafraseando o neurofarmacologista Cristoforo Scavone (*apud* ZORZETTO, 2006).

Neste sentido, é sabido que alterações endógenas ou ambientais estressoras podem acarretar ativação crônica ou transitória do eixo hipotálamo-hipófise-adrenais (HPA) e do sistema nervoso autônomo simpático (SNAS). A resposta do eixo HPA inicia-se nos neurônios do núcleo paraventricular hipotalâmico (PVN), com liberação via sistema circulatório portal de hormônio liberador de corticotrofina (CRH). Este, acarreta a subsequente liberação de proopiomelanocortina (POMC), clivada a β -endorfinas, hormônio estimulador de melanócitos (MSH) e hormônio adeno-corticotrópico (ACTH). Este último, alcançando o córtex das adrenais sinaliza secreção de glicocorticóides. Além disso ocorre, concomitantemente, a ativação do SNAS, via ativação do *locus coeruleus*, com liberação de catecolaminas pela medula das adrenais e pelas terminações nervosas do SNAS. Modifica-se, assim, o SI. O mesmo é válido quando consideramos os efeitos de estímulos imunes sobre o SNC, sendo um clássico exemplo o comportamento doentio (**Figura 1**).

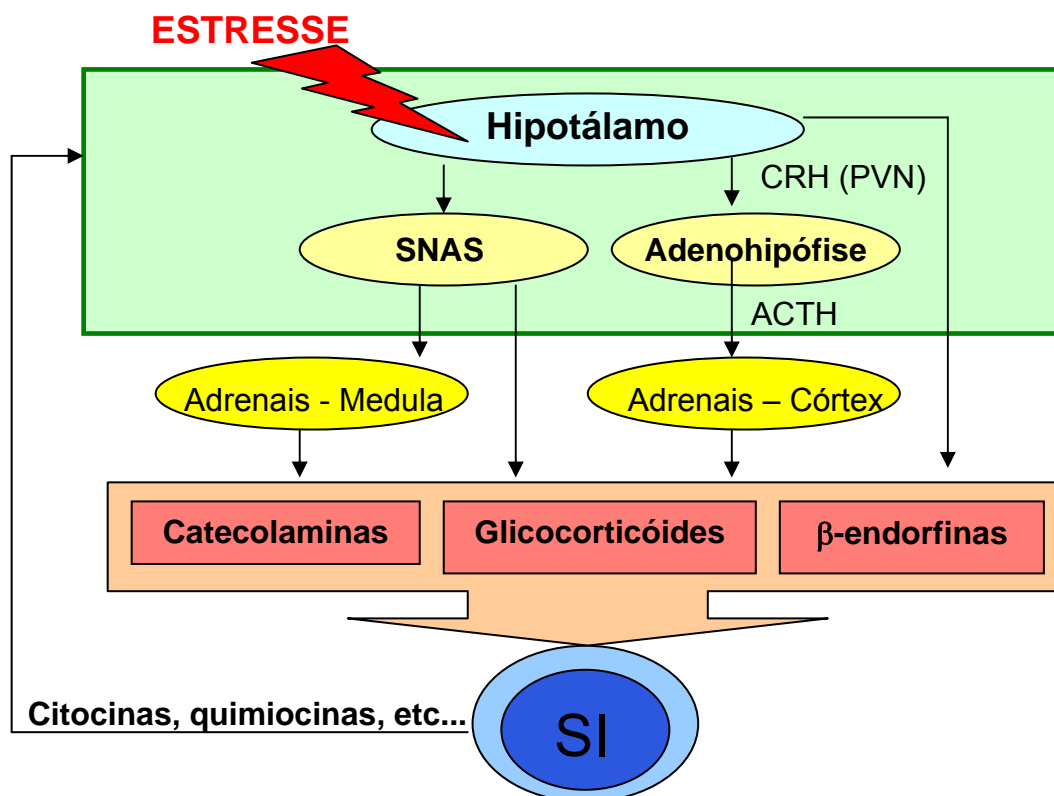


Figura 1 – Esquema ilustrativo dos eixos de comunicação SNC – SI. ACTH: hormônio adeno-corticotrófico; CRH: hormônio liberador de corticotrofina; PVN: núcleo paraventricular hipotalâmico; SNAS: sistema nervoso autônomo simpático.

Em conjunto, a ativação destes sistemas leva a um estado de alerta que, entre outros, inclui: midríase, ativação de regiões de memória, aumento da capacidade cardio-respiratória e mecanismos de lipólise e gliconeogênese (que por sua vez geram a mobilização energética), além de analgesia pela ação opióide. Tudo isto, culmina no clássico modelo de responsividade a estressores proposto por Cannon e Selye em 1932, denominado “luta ou fuga” (STRATAKIS E CHROUSOS, 1995).

Focando-se mais nos efeitos relativos às interações neuroimunes, encontramos dados na literatura que demonstram ser a ativação do eixo HPA e do SNAS em resposta ao estresse capazes de alterar tanto a capacidade funcional quanto o padrão migratório das células do sistema imune (DHABHAR E MCEWEN, 1997; STEFANSKI, 2001; ENGLER, 2004); estas alterações são dependentes das características do agente estressor, em especial, sua intensidade, tipo (fisiológico ou psicológico – *processing*) e tempo de exposição (agudo ou crônico) (GAMARO, 1998; BAUER ET AL., 2001; KIELING ET AL, 2005).

Neste âmbito, as citocinas e imunoglobulinas (Ig's) desempenham um papel relevante. As citocinas são moléculas importantes na imunorregulação; atuam na inflamação, febre, comportamento doentio, proliferação e diferenciação celular, síntese de proteínas de fase aguda, quimiotaxia, catabolismo, fibrose, ações antivirais e produção de outras moléculas de citocinas e moléculas de adesão. Originam-se de diversas células, sendo as principais os macrófagos, os linfócitos, as células *Natural Killer* (NK), os monócitos, as células dendríticas, endoteliais e epiteliais, os fibroblastos e os astrócitos. Alguns representantes desta “família” de glicoproteínas são a IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, o fator de necrose tumoral (TNF) e os interferons (INF) (FONSECA, 2005; ROTHWELL e STRIJBOS, 1995; JANEWAY et al., 2001; ROITT, BROSTOFF e MALE, 2001).

Diversos trabalhos têm demonstrado que as respostas neuroendócrinas ao estresse podem regular genes de citocinas e, no sentido inverso, há mais de 10 anos já se descreve a existência de um sistema de transporte ativo de citocinas da periferia para o SNC, que, por sua vez, modulam a atividade neural (GUTIERREZ et al, 1994).

Como bem exemplificou Baccan em sua tese de doutorado (2004), uma vasta amplitude de genes do sistema imune pode ser regulada pelos glicocorticóides (BACCAN, 2004).

A autora demonstra que os glicocorticóides podem tanto aumentar a transcrição de citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) como diminuir àquela de pró-inflamatórias (ILs 1, 2, 6, 8, 11, 12; TNF- α ; IFN- γ e GM-CSF); podem, ainda, atuar sobre moléculas de adesão: diminuindo a transcrição de ICAM-1 e VCAM-1; ou, ainda, sobre genes envolvidos na regulação da inflamação: diminuindo a síntese de prostaglandinas e a expressão das enzimas óxido nítrico sintase e iNOS (BACCAN, 2004).

Todos estes trabalhos, exemplificam a “conversa” neuroimune. Como já salientado, desde o início do século passado já haviam descrições relativamente detalhadas dessa interação no sentido SNC \rightarrow SI, porém, foi somente na década de 70 que o grupo liderado por Hugo Besedovsky mostrou, pela primeira vez, que componentes do SI influenciavam funções neuro-endócrinas. Estes pesquisadores utilizando ratos demonstraram que a imunização feita com diferentes antígenos aumentava, em até três vezes, a concentração sérica de corticosterona e, também, propiciava maior atividade elétrica de neurônios ventromediais hipotalâmicos

(BESEDOVSKY *et al*, 1977 e 1975). Capcioso abordar aqui que, na época, o trabalho foi rejeitado pela revista *Nature*, pois, segundo os *referees*: “ele trazia evidências de que o cérebro deveria receber informações do sistema imune” (BACCAN, 2004; ADER, 2000), isto é, recusado exatamente pelo conceito que demonstrava.

Costa-Pinto fez uma análise interessante destas publicações: o aumento sérico de corticosterona e da atividade elétrica de neurônios hipotalâmicos não parecia ser apenas uma coincidência temporal pois, animais que individualmente não respondam à imunização também não apresentam estas alterações. Os experimentos foram replicados posteriormente com maior detalhamento por Saphier e colaboradores em 1987, confirmando-se esta hipótese (COSTA-PINTO, 2004).

Na continuidade de seus estudos, o grupo de Besedovsky correlacionou uma diminuição hipotalâmica de NE com o pico de produção de anticorpos (Ac's), e mais que isto, reproduziu os fatos *in vitro* com cultura de linfócitos ativadas. Além disto, mostraram uma tendência para uma redução dos níveis de NE no tronco encefálico (BESEDOVSKY *et al*, 1983). Dando seqüência a estas observações, Carlson e colaboradores demonstraram, novamente, que havia uma diminuição dos níveis de NE no PVN hipotalâmico no pico de produção de Ac's (CARLSON *et al*, 1987).

Atualmente, já esta bem aceito que a ativação do SNAS atua de forma crucial sob o sistema imune; a própria anatomo-fisiologia destas interações abre espaço para discussões do tipo “ovo e galinha”.

Fibras pós ganglionares simpáticas adrenérgicas possuem ramificações que inervam órgãos linfóides como timo (NANCE e BURNS, 1989; NANCE, HOPKINS e BIEGER, 1987; BULLOCK E MOORE, 1981), baço (CANO ET AL, 2001; BELLINGER ET AL, 1993), linfonodos (SHEPHERD ET AL, 2005; ROMEO ET AL, 1994; KURKOWSKI ET AL, 1990), tonsilas, medula óssea e tecidos associados à mucosa (GALT e BALT: *gut-associated lymphoid tissue* e *bronchus associated lymphoid tissue*) (NANCE E SANDERS, 2007; FELTEN *et al*, 1985). Especificamente, quando considerada a inervação esplênica, um estudo publicado em 1982 demonstrou que 98% desta é formada por fibras nervosas simpáticas (KLEIN *et al*, 1982).

Estas terminações nervosas fazem contato sináptico (as denominadas sinapses neuroimunológicas) (TOURNIER e HELLMANN, 2003) na vizinhança de células T, B e macrófagos, permitindo que a NE influencie diretamente a atividade

destas células (KOHM e SANDERS, 2000; MADDEN, 2003). De fato, alguns estudos revelam que os leucócitos possuem, em sua superfície, diferentes tipos de adrenorreceptores, e que sua expressão é alterada de modo diferencial conforme o estado de ativação imunológica (CAZAUX *et al*, 1995^{a,b}).

Aparentemente, todos os leucócitos expressam receptores β -adrenérgicos (β AR), com exceção apenas dos clones de linfócitos auxiliares (T CD4⁺) do tipo Th₂ (KOHM e SANDERS, 2000; MADDEN, 2003; SANDERS, 2006). Mais especificamente, estudos demonstraram que células T, NK, monócitos CD4⁺ e células B expressam β_2 AR. A ligação da NE a esses receptores aumenta os níveis de cAMP intracelular, culminando com vários efeitos intracelulares característicos, dentre os quais alguns que levam a uma inibição de proliferação de células T via inibição da produção de IL-12, importante estímulo proliferativo (RAMER-QUINN, BAKER e SANDERS, 1997; SANDERS 1998; ELENKOV *et al.*, 2000; KOHM e SANDERS, 2000). E mais, demonstrou-se que a diminuição induzida por NE da expressão de receptores para IL-12 em células CD4⁺ ocorre via estimulação dos β_2 AR (BACCAN, 2004).

Como as células Th₂ maduras não expressam β_2 AR, a NE não afeta, diretamente, a produção das citocinas tipo Th₂; porém, ao diminuir a produção de citocinas do tipo Th₁, pode indiretamente aumentar a produção de citocinas de imunidade humoral. Na maioria dos dados da literatura, a NE é relatada como tendo uma ação antiinflamatória, por inibir a expressão de citocinas pró-inflamatórias do tipo Th₁ (PANINA-BORDIGNON *et al*, 1997; BORGER *et al*, 1998; KALINICHENKO *et al*, 1999; MALARKEY *et al*, 2002).

Em resumo, os efeitos da NE em células T CD4⁺, via estimulação de β_2 AR, vão depender do modelo analisado. Para se determinar estes efeitos, alguns fatores são importantes, como o momento de exposição às catecolaminas, o estado de ativação celular, a concentração dos neurotransmissores no momento em que se deu a exposição, e, dentre tantos outros, a expressão diferencial de β_2 AR na superfície de células Th₁ e Th₂ ativadas (NAVARRO, 2005).

Já os conhecimentos relacionados com a presença e o papel dos receptores α -adrenérgicos em células imunes ainda não são conclusivos, tendo-se sugerido que estes sejam expressos apenas em células mononucleares (linfócitos, monócitos e macrófagos) de compartimentos específicos como, por exemplo, nos espaços

alveolar e peritoneal, ou, ainda, em algumas condições patológicas (HASKÓ e SZABÓ, 1998; ELENKOV *et al.*, 2000).

Ainda discorrendo sobre a relação neuroimune, mas redirecionando seu enfoque, com um modelo experimental de alteração de preferência ao sabor, Basso e col. (2003, 2004) mostraram entre tantos fatos, que a alteração comportamental era acompanhada por um aumento da expressão de *c-fos* no PVN hipotalâmico e no CE da amígdala. Este mesmo grupo mostrou que o aumento de *c-fos* envolvia a imunoglobulina E (IgE). De fato, quando testados frente ao uso de bloqueadores de IgE, obteve-se não somente a prevenção do aumento de *c-fos* no PVN, mas também da alteração comportamental de preferência de sabor (BASSO *et al.*, 2003, 2004; COSTA-PINTO *et al.*, 2005).

Palermo-Neto e col. (2000) mostraram condicionamento semelhante, mas empregando o modelo de inflamação pulmonar. Depois de algum tempo do pareamento som e luz (estímulo neutro) com inalação de ovalbumina em animais OVA-sensibilizados foi possível observar que apenas o estímulo neutro era capaz de eliciar as alterações comportamentais e imunes observadas, ou seja, eram iguais àquelas obtidas após a inalação de ovalbumina por animais OVA-sensibilizados. Logo, os autores mostraram o condicionamento das respostas comportamentais desencadeadas pela reação anafilática (PALERMO-NETO *et al.*, 2000).

Já Portela e col. (2001) apresentaram dados consistentes de que o estresse aumenta a infiltração de leucócitos na inflamação das vias aéreas antígeno-induzidas em ratos, o que sugere que a resposta ao estresse é fisiopatologicamente significativa para modular uma resposta anafilática pulmonar (PORTELA *et al.*, 2001). Resultados semelhantes foram demonstrados por Nogueira e col., ao descreverem um aumento da inflamação induzida pelo alérgeno OVA nas vias aéreas de uma prole de ratos OVA-sensibilizados na fase adulta e expostos a um modelo crônico de estresse pré-natal (NOGUEIRA *et al.*, 1999).

Uma hipótese plausível para argumentar todos estes dados, aqui exemplificando as relações da NIM, foi apresentada pela por Blalock em uma “opinião” de apenas 3 páginas publicada no *The Journal of Immunology* em 1984, intitulado “O sistema imune como um órgão sensorio”. O autor inicia comunicando três idéias com respeito às interações dos sistemas imune, endócrino e nervoso central: 1) que havia uma razão lógica para as interações entre os sistemas imune e neuroendócrino; 2) que o sistema imune poderia funcionar como um órgão sensorio

e; 3) que no futuro (diga-se aqui, atualmente, uma vez que a publicação data de mais de 20 anos) poderia ser difícil fazer a distinção dos receptores e sinais que estes sistemas utilizam para comunicar-se entre si (BLALOCK, 1984).

A seguir, o autor defende a idéia de que a “neuroimunoendocrinologia” não seria, nem mesmo naquela época uma área nova do conhecimento. Seus argumentos baseavam-se em estudos prévios que demonstravam a existência de vias neuroanatômicas aferentes e eferentes diretas entre o SN e órgãos linfóides; destaca ainda, que lesões de nervos ou grupos de neurônios eram capazes de inibir funções do SI do mesmo modo que estimulação elétrica dessas poderia modula-las. Já no sentido SN->SI, considera o fato já conhecido na época de comprometimento da efetividade da imunidade celular em casos de hipopituitarismo. No sentido inverso (SI-SN), lembra que desafios antigênicos apresentavam potencial para induzir *firing* de neurônios hipotalâmicos (BLALOCK, 1984).

Finalmente, o autor deixa três perguntas aos leitores: 1) Teriam as linfocinas e os hormônios peptídicos neuroendócrinos funções em comum? 2) Teriam as células do SN e do SI receptores em comum para sinais peptídicos? 3) Existiriam peptídeos que seriam comuns aos SI e SN? (BLALOCK, 1984).

Mesmo com a relativa precariedade de técnicas da época, o que o autor consegue é, a façanha de compilar dados numa abordagem nova e, principalmente, “predizer” situações futuras. Sua brilhante publicação foi, deste modo um marco na imunologia, brindada no presente ano (2007) com uma revisão especial (*Named Series*) publicada em comemoração aos 20 anos da *Brain, Behavior and Immunity*. “Desenvolvimento Conceitual do SI como um sexto sentido” (BLALOCK, 1984).

O argumento que embasa a teoria proposta por Blalock advém de observações anatomo-bioquímicas. Considerando que as células do SI não são interligadas, como ocorre com um órgão sensório, fixo anatomicamente e, conectado ao encéfalo por nervos, o autor embasou sua concepção em resultados advindos de variados experimentos que mostram presença tanto de peptídeos como de neurotransmissores e de receptores comuns para estas moléculas nos SI e SN. Logo, apesar de não haver órgãos e nervos ligados anatomicamente, a comunicação dos sistemas entre si dar-se-ia através de moléculas e receptores idênticos; apresentava-se, deste modo, uma possibilidade inquestionável (BLALOCK, 1984).

Porém, retomemos novamente a idéia de NIM na perspectiva do estresse. Admitindo-se, as respostas fisiológicas descritas por Walter Cannon: de nada adiantaria lutar ou fugir do estressor e morrer horas depois de infecção por patógenos inoculados pelos traumas e escoriações decorrentes.

Dadas as proporções de citações oriundas até hoje, pode-se dizer que Dhabhar e McEwen foram os autores melhor conseguiram justificar as respostas a esta questão (DHABHAR, 2003 e 2002; MCEWEN, 2000; DHABHAR e MCEWEN, 1997). Os autores descrevem o “Espectro do estresse”, onde correlaciona-se a vivencia de exposição a um estressor por sua intensidade ou cronicidade: a exposição aguda ou moderadamente intensa estimulante e, a exposição crônica ou extremante intensa debilitante das funções do SI. Entre estes extremos, um período de resiliência, conforme detalha a **Figura 2**.

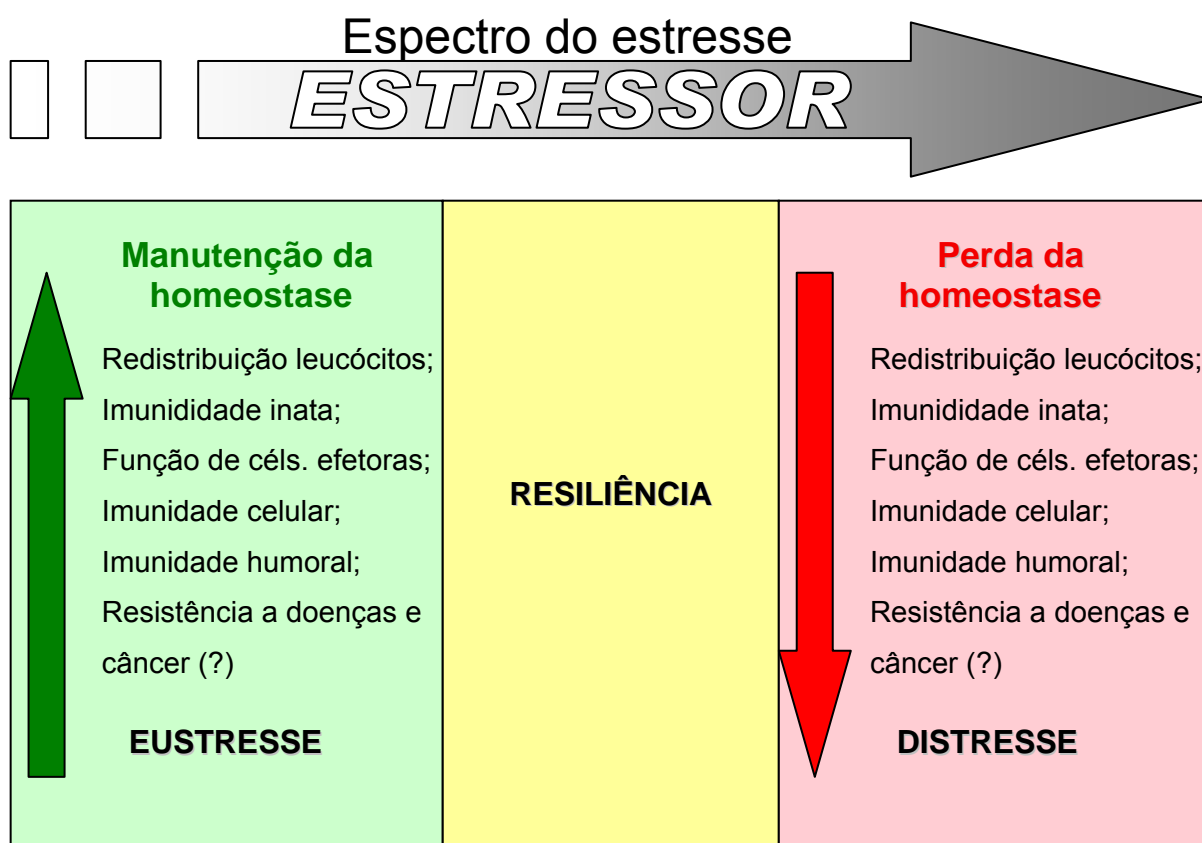


Figura x. Espectro do estresse. Adaptado de Dhabhar e McEwen, 1997.

Contudo, esta premissa tão bem estabelecida, só é válida quando consideramos indivíduos adultos. Quanto às questões relacionadas ao estresse no período peri-natal, de modo geral não há ainda um consenso bem estabelecido entre os autores.

2.2 Estresse pré-natal

Dá-se o nome de fase perinatal ao intervalo de tempo que tem início na concepção e termina no desmame. A gestação coincide com o período pré-natal, estendendo-se da concepção ao parto. Finalmente, o período neonatal estende-se do parto ao desmame. Já o período perinatal, divide-se em 4 fases:

1. *implantação*: começa na fecundação do oócito e termina com a implantação do blastocisto no endométrio;
2. *organogênese*: período de formação dos órgãos rudimentares, fase de intensa proliferação, diferenciação e migração celular;
3. *desenvolvimento fetal*: crescimento dos tecidos. Este período é marcado por uma alta taxa de replicação celular e é nele que acontece grande parte da maturação e diferenciação do cérebro e do sistema imune. Em camundongos, esta fase vai do 15º ao 19º dia de gestação (VOM SAAL, 1991); foi por isso que escolhemos este período para a realização das manipulações pré-natais deste trabalho;
4. período neonatal: corresponde do nascimento ao desmame.

Está bem documentado que eventos deletérios ocorridos durante a gestação podem induzir defeitos neurobiológicos e comportamentais na prole. Estresse materno aplicado ou induzido nas fêmeas durante a gestação, pode induzir efeitos de longa duração no desenvolvimento físico, neuroquímico, comportamento, regulação do eixo HPA e na imunocompetência da prole (MAZUR-KOLECKA *et al.*, 1996; PALERMO-NETO *et al.*, 2001; FONSECA *et al.*, 2002). Conforme estes autores, choques elétricos aplicados nas patas, restrição de movimentos com ou sem acendimento de luzes ou elevação de temperatura, barulho, superpopulação ou outro estímulo estressor aplicado às fêmeas têm sido apresentados como afetando todas as variáveis indicadas acima na vida adulta da prole.

Tanto em ratos quanto em camundongos, alterações induzidas por estresse materno são mais freqüentemente apontadas quando o estresse é aplicado durante o terço final da gestação, período durante o qual há diferenciação das gônadas, trato reprodutivo, órgãos linfóides e formação encefálica (PALERMO-NETO *et al.*, 2001; FONSECA *et al.*, 2002; GERARDIN *et al.*, 2005).

Dentre estes, Gerardin e col. demonstraram que uma prole de fêmeas submetidas a estresse de restrição nesse período de gestação apresentava

masculinização encefálica incompleta, diminuição da distância anogenital e das dosagens de testosterona sérica, além de redução do comportamento sexual e do número de ejaculações (GERARDIN *et al.*, 2005).

Mais do que isso, um recente trabalho de doutorado realizado em nossos laboratórios mostrou que camundongos machos e fêmeas, submetidos a um estresse pré-natal por choque nas patas no terço final de gestação, apresentavam, aos 30 dias de vida: 1) aumento de atividade geral no campo aberto; 2) padrão ansiogênico por análise no labirinto em cruz elevada (*pluz maze*); 3) diminuição da atividade dos macrófagos peritoneais (significativo aumento de liberação de peróxido de hidrogênio espontâneo e induzido pelo PMA) e; 4) aumento do *turnover* de NE hipotalâmica. Especialmente nos machos da prole, evidenciou-se uma diminuição dos níveis séricos de corticosterona e aumento do turnover de NE no hipotálamo (FONSECA, 2005).

Uma boa hipótese para explicar os resultados comportamentais relatados acima, pressupõe um aumento da atividade do sistema catecolaminérgico central. Há mais de 20 anos já se evidenciou que áreas da região límbica como o hipotálamo, a amígdala e o hipocampo apresentavam aumentos rápidos e de significativa magnitude no *turnover* de NE em resposta a estressores como, por exemplo, choque nas patas (FONSECA, 2005). Em animais de laboratório, mostrou-se que o estresse aumentou a atividade de células do *locus coeruleus* (PAVCOVICH *et al.*, 1990).

Neste mesmo trabalho (FONSECA, 2005), observando mais focadamente a atividade imune, os autores mostraram que o tratamento da mãe com um antagonista opióide, a naloxona, 30 minutos antes da aplicação do estresse, prevenia estes efeitos. Ainda, mostraram que o uso de um inibidor da síntese de glicocorticóide, a metirapona, aplicada 3 horas antes do estresse pré-natal, também interferia com a atividade dos macrófagos peritoneais da prole de camundongos avaliada aos 30 dias, com efeitos diferenciais quando avaliados machos e fêmeas (FONSECA, 2005).

Todos estes achados evidenciam que, a ativação de sistemas de neurotransmissores relacionados à resposta ao estresse da mãe, altera, de alguma forma, os sistemas ainda em formação da prole. Verticalizando os achados, a ativação simpática, por liberar NE em terminações com íntima associação com células imunes, favoreceria a síntese de citocinas do tipo Th₂, que inibiriam a

resposta imune celular. Isto inclusive, permitiria explicar a diminuição da atividade dos macrófagos peritoneais relatada em nossos laboratórios em animais estressados no terço final da gestação (FONSECA, 2005).

Diversos estudos têm demonstrado que fêmeas gestantes em que se inflige um estresse pré-natal respondem com um aumento da produção dos hormônios do estresse durante períodos críticos do desenvolvimento encefálico fetal, provocando como resposta uma redução do número de receptores para corticosteróides hipocampais na prole (WEINSTOCK, 2005 e 2001; LEMAIRE *et al.*, 2000; VALEE *et al.*, 1997).

Um fato contundente é o de que há uma correlação positiva entre os níveis plasmáticos de corticosterona em roedoras grávidas e seus fetos (CADET *et al.*, 1986; WILLIAMS *et al.*, 1999). Mais especificamente, Williams e col. demonstraram em ratas que a titulação plasmática de corticosterona, aldosterona e ACTH, 15 minutos após a exposição a um estressor, elevava-se em fêmeas gestantes e, em igual padrão, em seus fetos (WILLIAMS *et al.*, 1999). Em humanos, esta premissa parece ser também válida: após a administração de glicocorticóides sintéticos à mãe, fetos entre 20 e 34 semanas apresentaram alterações de responsividade à estimulação vibro-acústica (ROTMENSCH *et al.*, 1999).

Pois que se por um lado há o aumento de glicocorticóides decorrente de estímulos estressores, por outro há a regulação fisiológica deste aumento proporcionalmente ao direcionamento do final da gestação.

Já evidenciou-se tanto em humanos quanto em primatas superiores que há uma contínua produção placentária de CRH, dentre a 8 e 10 semanas gestacionais (MAJZOUB e KARALIS, 1999; CHALLIS *et al.*, 1995;). Ativado por glicocorticóides, o CRH placentário é detectável tanto nos compartimentos materno quanto fetal durante a gravidez, sendo o eixo HPA materno regulado por *feedback* positivo durante a gestação. Como consequência, os níveis circulantes de cortisol e ACTH da mãe aumentam gradualmente durante a gestação, culminando em uma elevação de 20 vezes das concentrações de CRH maternos algumas semanas antes do parto e, atuando de forma crucial para que este ocorra (FRIM *et al.*, 1988).

A exposição intrauterina aos glicocorticóides é regulada pela expressão placentária da enzima 11 β -hidroxisteróide dehidrogenase (11 β -HSD), a qual tem duas isoformas: 11 β -HSD do tipo 1, que é bidirecional, atuando como oxidase e

redutase convertendo o cortisol ativo a cortisona inativa e; 11β -HSD do tipo 2, unidirecional, atuando exclusivamente como uma oxidase que converte o excesso de cortisol fetal circulante a cortisona inativa (KAJANTIE et al., 2003; BROWN et al., 1996). Esta última, servindo para proteger o feto de exacerbados níveis de glicocorticóides. Além disso, alguns estudos sugerem que a exposição fetal aos glicocorticóides seja cerca de 10 vezes menor que os observados nos compartimentos maternos (SECKL et al., 1995). O papel preciso da 11β -HSD em relação à situações de estresse materno, permanece, contudo, sob investigação (AUSTIN, LEADER e REILLY, 2005).

Não obstante, por volta do 17º dia de gestação o eixo HPA fetal já é capaz de responder às alterações dos hormônios maternos com liberação de CRH, ACTH, corticosterona e β -endorfinas (OHKAWA et al, 1991; WEINSTOCK *et al.*, 2005). Assim, além dos glicocorticóides e da β -endorfina materna, que atravessam a placenta, o feto também tem que controlar o funcionamento do seu próprio eixo HPA e do seu SNAS.

Vários trabalhos demonstraram que a aplicação de um estresse pré-natal altera a homeostasia neuroendócrina da prole e também que estas alterações são observadas até a idade adulta (WEINSTOCK *et al.* 2005; WARD *et al.*, 2000; SOBRIAN *et al.*, 1997; VALEE *et al.*, 1999). Além destes dados, Sobrian e col. (1992) relataram diminuição dos níveis séricos de IgG em uma prole de ratos submetidos a um estresse durante o terço final de gestação (choque nas patas do 15º ao 21º dias de gestação) e estudada aos 7 e aos 28 dias de vida (SOBRIAN *et al.*, 1992).

Nos estudos de Palermo-Neto e col. (2001) demonstrou-se que a prole de fêmeas submetidas ao mesmo modelo de estresse por choque inescapável nas patas entre os dias 15 e 19 de gestação, apresentaram: (1) diminuição da atividade locomotora na zona central do campo aberto e aumento na zona periférica; (2) diminuição do número de entradas aos braços abertos do *pluz-maze* e diminuição do tempo despendido em exploração dos braços abertos; (3) diminuição do espriamento de macrófagos e fagocitose; (4) aumento de crescimento tanto nas formas sólida quanto ascítica do tumor de Erlich (PALERMO-NETO *et al.*, 2001).

Alguns autores estudaram a tríade estresse pré-natal, sistema imune e dimorfismo sexual: Klein e Rager (1995) mostraram que a citotoxicidade das células

NK era menor em machos que em fêmeas jovens, independente da exposição ao estresse *in útero*. Neste trabalho, a exposição a um estresse do 14º ao 21º dia de gestação reduzia ainda mais a atividade das células NK apenas nos machos adultos (KLEIN e RAGER, 1995). Kay e col. (1998) mostraram que a aplicação de luz e barulho durante toda a gestação diminuía a citotoxicidade das células NK e dos linfócitos sanguíneos e a taxa de proliferação dos linfócitos esplênicos, efeitos estes mais marcantes na prole de fêmeas (KAY *et al*, 1998). Llorente e col. (2002) observaram que o estresse aplicado a ratas durante o terço final de gestação resultava em hipertrofia da adrenal apenas na prole de fêmeas. Em resposta a um estresse crônico aplicado na idade adulta, foi observado aumento no peso da adrenal apenas na prole de machos (LLORENTE *et al*, 2002).

Uma relevante revisão sobre este tema foi apresentada por Von-Hertzen; nela, o autor mostra em resposta ao estresse pré-natalmente aplicado que os hormônios da resposta ao estresse atravessam a barreira placentária e, também, que ocorrem alterações significativas do desenvolvimento do sistema imune, principalmente em relação à diferenciação de células T (VON-HERTZEN, 2002).

Todos estes achados evidenciam que, a ativação de sistemas de neurotransmissores relacionados à resposta ao estresse da mãe, altera, de alguma forma, os sistemas ainda em formação da prole.

Uma hipótese plausível para explicar os efeitos derivados de um estresse pré-natal é dada por Myatt em sua publicação *Placental adaptive responses and fetal programming*. Nesta, a autora discorre que modulações permanentes podem ser geradas no feto por meio epigenético (*imprinting* gênico), via metilações no DNA e acetilação de histonas fetais (MYATT, 2006). Myatt traz neste contexto informações adicionais importantes ao correlacionar os mecanismos de *imprinting* com o estresse materno. Retoma, deste modo, um conhecimento já descrito com detalhes 10 anos antes, na revista da Sociedade de Genética da América: “A evolução do *imprinting* gênico” (MOCHIZUKI, TAKEDA e IWASA, 1996).

Neste sentido e de certo modo, a idéia de reprogramação fetal por decorrência de estímulos aplicados à mãe, já havia sido igualmente descrita. Ora, mesmo sem a capacidade, obviamente técnica, de discorrer sobre os aspectos da biologia molecular envolvidos neste processo, Barker e colaboradores já haviam postulado em 1986 que influências adversas vivenciadas no período de desenvolvimento e, particularmente, durante a vida uterina, poderiam resultar em

modificações permanentes na fisiologia e no metabolismo fetais, que resultariam em um maior risco ao desenvolvimento de doenças na vida adulta (BARKER *et al*, 1989).

Dados epidemiológicos sobre doenças cardiovasculares suscitaram o estudo de Barker e colaboradores, que analisaram em escala geográfica a correlação de fatores de risco como tabagismo, concentrações séricas de colesterol e de triglicérides, pressão arterial, etc. Os resultados indicaram que apenas dados fisiológicos/ metabólicos bem como os hábitos e o estilo de vida, por si só, não eram capazes de prever com precisão o risco a estas doenças em questão. Ora, se os parâmetros da vida adulta não eram suficientes, o *insight* do autor foi supor que talvez eventos ocorridos durante o período uterino estivessem ligados à incidência das patologias. Nesta linha de raciocínio, encontraram uma correlação direta entre a alta taxa de mortalidade de neonatos de regiões menos favorecidas sócio-economicamente e a igualmente alta prevalência de doenças cardíacas em adultos destas regiões (BARKER, 2007).

A partir de então, foram comparadas 23 patologias tipicamente de adultos com parâmetros perinatais, encontrando-se correlação entre fatos gestacionais e peso ao nascimento e bronquite crônica e câncer de estômago, além das patologias cardiovasculares. Inaugurava-se, aí, um novo campo epidemiológico que extrapolava condições de saúde na vida adulta com parâmetros perinatais, dentre os quais, o peso ao nascer foi um fator especialmente marcante (BARKER, 2007).

Os argumentos de Barker e colaboradores ganharam tamanha aceitação da comunidade científica que são hoje reconhecidos como “Hipótese de Barker” ou ainda “Hipótese das origens desenvolvimentais das doenças de adultos” (“*developmental origins of adult disease hypothesis*”) (BOO e HARDING, 2006; BRAKEFIELD *et al*, 2005; LAU e ROGERS, 2004).

Portanto, os dados agora apresentados indicam indubitavelmente que a exposição a estressores pré-natais e pós-natais, apresenta capacidade de afetar parâmetros neuroimunológicos. Esta análise, é objeto deste estudo.

2.3 Considerações sobre a inflamação alérgica pulmonar

Uma vez que o sistema imune é multimediado, lesões ou interferências que levem ao prejuízo do mesmo tendem a ser atenuadas ou compensadas, impedindo a percepção das reais alterações decorrentes. No entanto, quando o sistema lesado é submetido a um desafio suas deficiências podem, então ser detectadas. Neste sentido, escolheu-se como desafio para detectar as possíveis alterações promovidas pelo estresse pré-natal a inflamação alérgica pulmonar.

Considerando-se que uma de nossas variáveis de estudo é o estresse pré-natal, vale ressaltar que o desenvolvimento pulmonar inicia-se na fase fetal e finaliza-se pós-natalmente, prosseguindo até a adolescência. Este processo está associado a eventos bem definidos que ocorrem em cinco estágios: embrionário, pseudoglandular, canalicular, sacular e alveolar. Durante o estágio embrionário o futuro pulmão parece ser uma extensão da parede ventral do intestino primitivo. Nas fases seguintes, ocorre a transformação deste pequeno agregado de células em estruturas altamente complexas incluindo a traquéia, brônquios intra e extrapulmonares, bronquíolos, a área alveolar e as respectivas vias nervosas e circulatórias adjacentes bem como sua maturação (KAJEKAR, 2007; HISLOP, 2005; SPARROW et al., 2004; FASOULIOTIS et al., 2002; KOTECHA, 2000; JEFFREY, 1998; BURRI, 1984).

A organização embrionária é feita em etapas em todos os níveis e sistemas. Assim, os glicocorticóides também estão sujeitos a esta programação tendo papel importante nos processos de maturação, em especial do pulmão (SECKL, 2004). Fatores que interferem com seus níveis durante as fases iniciais da vida podem resultar na alteração da função pulmonar bem como em risco maior de doenças pulmonares tardias (KAJEKAR, 2007). Neste sentido, o estresse materno e/ou fetal altera a trajetória da programação dos glicocorticóides durante o desenvolvimento fetal com efeitos persistentes em vários sistemas (SECKL, 2004).

A asma é uma doença inflamatória crônica das vias aéreas, a qual didaticamente podemos subdividir em dois quadros distintos, embora bidirecionalmente mediados: a asma propriamente dita, definida pela contração da musculatura lisa do brônquios; e a inflamação alérgica pulmonar, foco neuroimune deste trabalho, na qual várias células têm papel fundamental tais como os

eosinófilos, mastócitos, neutrófilos, células dendríticas e linfócitos T (critérios GINA-Global Initiative for Asthma/ WHO-World Health Organization, 2002). Em indivíduos suscetíveis, esta inflamação causa episódios recorrentes de dispnéia, chiado e tosse. Estes sintomas estão associados à obstrução brônquica que é parcialmente reversível espontaneamente ou por tratamento farmacológico.

Muito embora a asma seja uma patologia complexa e multimedida, existem diversos fatores já identificados que contribuem para o seu desencadeamento ou para a exacerbação dos seus sintomas (TILLIE-LEBLOND et al., 2005).

Assim sendo, asma caracteriza-se também pelo aumento da expressão de múltiplas proteínas que estão envolvidas na complexa cascata da reação inflamatória. Estas proteínas reguladoras incluem citocinas, quimiocinas, enzimas que produzem mediadores inflamatórios, receptores para estes mediadores inflamatórios, bem como aquelas envolvidas na adesão celular. Na doença inflamatória, fatores de transcrição, ativados por estímulos inflamatórios (alérgenos, oxidantes, citocinas e vírus), acionam genes, determinando desta forma, aumento da síntese de proteínas inflamatórias (BOCHNER, 2004). Logo, a ativação celular é passo fundamental para a resposta inflamatória de origem alérgica.

O processo de sensibilização provavelmente representa a primeira etapa para o desenvolvimento do quadro asmático (de inflamação alérgica pulmonar). No contexto da apresentação do antígeno as células dendríticas presentes na mucosa brônquica interagem com linfócitos T auxiliares fazendo com que estas células estimulem a produção de imunoglobulinas (IgE) (anticorpos) por linfócitos B (plasmócitos) (OKAYAMA et al., 1997; JANEWAY et al, 2001; ROITT et al, 2001). Estes anticorpos, liberados na circulação, ligam-se a receptores específicos da porção Fc das imunoglobulinas presentes nos mastócitos (PUXEDDU et al., 2003). Quando ativados pelo antígeno, liberam uma gama de autacóides, os quais têm efeitos biológicos importantes sobre a atividade funcional da musculatura lisa brônquica e de células inflamatórias (PEACHELL, 2005).

Durante sua fase imediata, observam-se contração da musculatura lisa brônquica, formação local de edema, aumento da secreção de muco e um pequeno infiltrado celular. O principal fator responsável pela obstrução das vias aéreas nesta fase é a contração da musculatura lisa brônquica.

Já as reações de fase tardia induzidas por alérgenos persistem por até 24 horas. Os grânulos de mastócitos contêm citocinas (TNF) e mediadores lipídicos (PAF e LTB₄) que podem causar aumento da expressão endotelial de moléculas de adesão como selectinas e integrinas. Assim, a degranulação mastocitária pode levar à facilitação do *rolling* e da diapedese e, promover o recrutamento de leucócitos ao tecido inflamado. Os leucócitos típicos desta reação tardia são os eosinófilos e os linfócitos do tipo Th2 e, além disso, é freqüente a presença de neutrófilos nessa reação. Este padrão de resposta tardia pode facilmente converter-se em uma resposta inflamatória crônica na persistência do antígeno e estimular as células Th2 alérgeno-específicas, as quais, por sua vez, promovem a eosinofilia e a produção subsequente de IgE (BELVISI, 2004; MATSUMOTO e SAITO, 2001).

É justamente o quadro inflamatório pulmonar descrito, que culmina no remodelamento da arquitetura pulmonar, o qual é considerado característico de algumas alterações como, por exemplo, a fibrose subepitelial na asma. Todas essas mudanças incluem alterações na matriz extracelular do pulmão e, nesse processo, estão envolvidas as metaloproteinases, que têm a capacidade de clivar proteínas estruturais como as de fibras colágenas e da elastina. (AMMIT, 2005; BOUSQUET et al., 2004).

Tomado em seu conjunto, o cenário inflamatório observado para o desencadeamento da asma pode ser caracterizado, sinteticamente, pela presença pulmonar de mastócitos degranulados, eosinófilos, ativação de linfócitos Th1 (fase inicial) e Th2 (fase tardia) e geração de citocinas (BOCHNER et al., 2005).

Sabe-se que o desenvolvimento desta inflamação alérgica pulmonar está relacionado a diversos fatores. Entre eles incluem-se a atopia (predisposição genética de certos indivíduos para a síntese exacerbada de IgE), os fatores causais (exposição de indivíduos a alérgenos ambientais) e os de contribuição (exposição a fumaça, poluição, infecção viral entre outros) (JANEWAY et al, 2001; ROITT et al, 2001).

Porém, é do conhecimento médico, científico e, igualmente, popular, que fatores adjuvantes como o estresse podem participar, de forma decisiva, dos quadros asmáticos. Um estudo prospectivo feito por 18 meses com crianças asmáticas evidenciou que “eventos de vida agudamente negativos” (situação de estresse agudo como, por exemplo, morte de um familiar) dobrava o risco de um

ataque asmático subsequente. Mais do que isto, o impacto da exposição aguda a um estressor era acentuada quando ocorrida no contexto de um estresse crônico. Quando ambas as modalidades de estressores estavam presentes, a possibilidade de uma crise asmática parecia triplicar em relação às crianças não estressadas (SANDBERG et al, 2000).

Contudo, uma recente publicação acerca do tema faz uma ressalva importante: a exposição a um estressor por si só não é capaz de modificar funções imunes de forma a levar aos sintomas asmáticos. O estresse é visto como um processo que, em contrapartida, acentua as respostas inflamatórias e, que portanto, é capaz de aumentar a frequência, a duração, e a intensidade dos sintomas presentes nas crises asmáticas (CHEN e MILLER, 2007). De fato, não encontramos na literatura dados que apontassem ação direta de estressores sobre um quadro asmático, mas diversas publicações apontam o papel indireto dos mesmos (CHEN e MULLER, 2007; CHEN et al., 2007; SEGERSTROM e MILLER, 2004; MARSHALL e AGARWAL, 2000; PORTELA et al, 2007 e 2001).

Especificamente no tocante ao estresse pré-natal, já foi demonstrado que a exposição pré-natal crônica a estressores imprevisíveis (*chronic mild unpredictable stress*) foi capaz de incrementar significativamente a inflamação alérgeno-induzida das vias aéreas em uma prole de ratas, com maior infiltrado eosinofílico no lavado broncoalveolar (BAL) (NOGUEIRA et al, 1999). Focando mais, duas publicações apresentaram razões convincentes de que o risco para atopia e asma está associado à diminuída capacidade produção de IFN- γ durante a vida fetal (HOLT, 1999).

É de amplo conhecimento que os glicocorticóides liberados em consequência de um estímulo estressor são potentes imunomoduladores, sendo capazes de direcionar o balanço Th₁/Th₂ para uma resposta do tipo Th₂ (DEL PRETE, 1992); e que corticosteróides maternos são hábeis em cruzar a barreira placentária (GITAU et al, 1998). Logo, a hipótese corrente é de que a excessiva e contínua exposição da prole *in útero* aos corticóides maternos afetaria o desenvolvimento do SI e, principalmente, o direcionaria para um padrão Th₂.

Neste sentido e, considerando-se o embasamento discutido, é que buscamos entender os efeitos da exposição a estressores pré- e pós-natais sobre o quadro asmático, através da análise da celularidade total (BAL, leucócitos circulantes) e

diferencial (BAL e leucograma) em modelo murino de asma experimental (OVA induzida).

3 OBJETIVO GERAL²

Avaliar, através de uma perspectiva neuroimune, os efeitos da exposição ao estresse pré e/ou pós-natal sobre o padrão subpopulacional (fenotipagem), a atividade e a viabilidade de linfócitos (do sangue periférico ou provenientes do baço) de camundongos machos.

3.1 Objetivos específicos

- ✓ Avaliar parâmetros reprodutivos e gestacionais de fêmeas e de suas proles estressadas ou não pré-natalmente;
- ✓ Avaliar o peso relativo das adrenais e a celularidade total de medula óssea de animais submetidos a estressores aplicados no período pré-natal e/ou pós-natal;
- ✓ Avaliar, por fenotipagem, o padrão subpopulacional de linfócitos do sangue periférico de animais submetidos a estressores aplicados no período pré-natal e/ou pós-natal;
- ✓ Avaliar a viabilidade dos linfócitos do sangue periférico de animais submetidos a estressores aplicados no período pré-natal e/ou pós-natal;
- ✓ Avaliar o padrão de proliferação dos linfócitos esplênicos de animais submetidos a estressores aplicados no período pré-natal e/ou pós-natal;
- ✓ Avaliar, *in vitro*, os efeitos da noradrenalina sobre a proliferação de linfócitos esplênicos de animais submetidos a estressores pré-natal e/ou pós-natal.

² Os resultados a seguir apresentados, direcionaram o trabalho para novos objetivos, centrados na eficiência do modelo estressor e no papel do estresse pré e/ou pós natal sobre a resposta imune na asma experimental OVA-induzida.

-
- ✓ Avaliar a eficiência dos estressores pré-natal e pós-natal empregados;
 - ✓ Avaliar a inflamação alérgica pulmonar em modelo de asma experimentalmente induzida por ovoalbumina (OVA) de animais submetidos a estressores pré-natal e/ou pós-natal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos adultos da linhagem *Swiss*, com 30 e 60 dias de idade e fêmeas virgens com 50 dias, cedidos pelo Biotério do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ-USP). Os animais permaneceram durante todo o experimento em caixas plásticas medindo 28 cm x 17 cm x 12 cm, forradas com maravalha esterilizada e isenta de impurezas. Os animais foram utilizados seguindo-se as normas e procedimentos éticos relativos ao uso de animais de laboratório do Comitê de Ética da FMVZ-USP (protocolo nº 1131/2007), as quais são baseadas naquelas descritas pelo “Committee on Care and Use of Laboratory Animal Resources”, National Research Council, EUA. As caixas de moradia foram mantidas em sala com aeração, exaustão, temperatura ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e umidade (45% - 65%) constantes, controladas por meio de aparelhos de ar condicionado central em um ciclo claro/escuro de 12 h, com luz ligada às 7:00h; sendo fornecidos aos animais água e ração *ad libitum*.

4.2 Reagentes e soluções

Os reagentes empregados neste trabalho foram:

- **Anexina V conjugada ao fluorocromo FITC (Lab. de Biologia Celular e Molecular – ICB / USP):** empregada como marcador indicativo de processo apoptótico nos experimentos de apoptose/ necrose por citometria de fluxo;
- **Anticorpos conjugados aos marcadores de superfície celular anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD19 e, isotípicos controles (Pharmingen – BD):** utilizados para marcação dos linfócitos do sangue periférico;

- **Azul de Trypan (GIBCO):** corante para contagem e determinação de viabilidade celular;
- **Bitartrato de Norepinefrina (Sigma):** utilizado nos testes de desafio à proliferação de esplenócitos;
- **CFSE (5-(and-6)-carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester) (Molecular Probes - Invitrogen):** fluorocromo para experimentos de proliferação celular;
- **Iodeto de propídeo (Sigma):** fluorocromo indicativo de morte celular nos experimentos de apoptose/ necrose por citometria de fluxo;
- **Facsflow:** solução comercial utilizada para carrear as células nos experimentos de citometria de fluxo;
- **Fitohemaglutinina A (PHA), M form (GIBCO):** mitógeno específico para linfócitos T, empregado nos experimentos de proliferação de esplenócitos;
- **Fungizone (GIBCO):** antifúngico para cultura de células;
- **Heparina sódica (Roche):** anticoagulante para coleta de sangue;
- **Hepes (GIBCO):** tampão para meio de cultura de células;
- **LPS – cepa 0127:B8 (Sigma):** mitógeno específico para linfócitos B, empregado nos experimentos de proliferação de esplenócitos;
- **Penicilina / estreptomicina (GIBCO):** formulação antibiótica para meio de cultura celular;
- **RPMI 1640 (GIBCO):** meio de cultura celular e utilizado para contagem de celularidade total de medula óssea;
- **Soro bovino fetal (GIBCO):** utilizado como suplemento para enriquecer o meio de cultura celular;

As soluções empregadas foram:

- **PBS (tampão fosfato-salina): solução estoque 10x concentrada.**

$\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Sigma	26,70 g
$\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Sigma	4,14 g
NaCl	Sigma	82,0 g
H_2O milli-Q		1000 mL q.s.p.

- **Tampão de ligação:**

Hepes (10mM)	Gibco	1,19 g
NaCl	Sigma	4,383 g
KCl	Sigma	0,1865 g
MgCl ₂	Sigma	0,1015 g
CaCl ₂	Sigma	0,1325 g
H ₂ O milli-Q		500 mL q.s.p.

- **RPMI (pH 6,8 – 7,0):**

RPMI	Gibco	10,4 g
NaHCO ₃	Sigma	2 g
Hepes (10mM)	Gibco	2,32 g/L (9,76 mL)
Estreptomicina	Gibco	100 mg
Penicilina	Gibco	60 mg
Fungizone	Gibco	2 mL
Na ₂ PO ₄ .H ₂ O	Sigma	4,14g
NaOH	Sigma	ajuste de pH
HCl	Sigma	ajuste de pH
H ₂ O milli-Q		1000mL q.s.p.

- **Soluções de lise**

Para cultura de células – cloreto de amônio

Cloreto de amônio	Sigma	8,56 g
H ₂ O milli-Q		1000 mL q.s.p.

Para lise por choque hipotônico – Salina 0.2%

NaCl	Sigma	2 g
H ₂ O milli-Q		100 mL q.s.p.

Para lise por choque hipotônico – Salina 1,6%

NaCl	Sigma	1,6 g
H ₂ O milli-Q		100 mL q.s.p.

4.3 Obtenção dos filhotes e formação dos grupos

Para obtenção dos filhotes foram utilizadas camundongas *Swiss*, virgens, com 50 a 60 dias de idade, acasaladas com machos de mesma linhagem. O número total de animais por caixa foi de 3, sendo 2 fêmeas para cada macho.

As fêmeas foram sincronizadas na fase de anestro do ciclo estral. Então, foram alocadas juntamente com o macho. Diariamente entre 7h e 9h, realizou-se a observação da presença do tampão vaginal, considerado como indicativo de acasalamento e, logo, considerado como sendo o dia zero de gestação (GD_0 – *gestacional day 0*). No 10º dia gestacional (GD_{10}), as fêmeas foram separadas dos respectivos machos sendo, então, colocadas em caixas-moradia individuais, onde permaneceram até o desmame dos filhotes, que foi realizado aos 21 dias de vida – (PND_{21} – *post natal day*).

Ao desmame, os animais foram separados e pesados, sendo as fêmeas utilizadas em outros experimentos.

Os machos foram distribuídos em 4 grupos, evitando-se que filhotes de uma mesma ninhada fossem alocados para um mesmo grupo afim de evitar variáveis genotípicas eventualmente presentes.

Os grupos formados foram:

- **Grupo CC:** machos não estressados, pré- ou pós-natalmente (controle negativo dos desafios de responsividade ao estressor);
- **Grupo CE:** machos não estressados pré-natalmente, porém desafiados pós-natalmente (PND_{30}) quanto à sua responsividade a um estressor (sessão aguda de choques nas patas exatamente igual àquela aplicada às gestantes estressadas);
- **Grupo EC:** machos estressados pré-natalmente (GD_{15} ao GD_{18}) uma vez ao dia e não desafiados pós-natalmente;
- **Grupo EE:** machos estressados pré-natalmente (GD_{15} ao GD_{18}) uma vez ao dia e desafiados pós-natalmente (PND_{30}) quanto à sua responsividade a um estressor (sessão aguda de choques nas patas exatamente igual àquela aplicada às gestantes estressadas).

As características do choque utilizado pré-natalmente e/ou pós-natalmente serão descritas na continuidade deste trabalho (item 3.6 Caixa de Choque e modelo de estresse).

A **Quadro 1** e a **Figura 3**, esquematizam o desenho dos grupos e dos experimentos.

Quadro 1 – Desenho dos grupos experimentais, onde “X” indica a exposição à ao estressor (modelo de choques às patas –*footshock stress*; crônico durante o terço final gestacional e agudo prévio aos experimentos pós-natais).

	EPN	Desafio
CC	-	-
CE	-	X
EC	X	-
EE	X	X

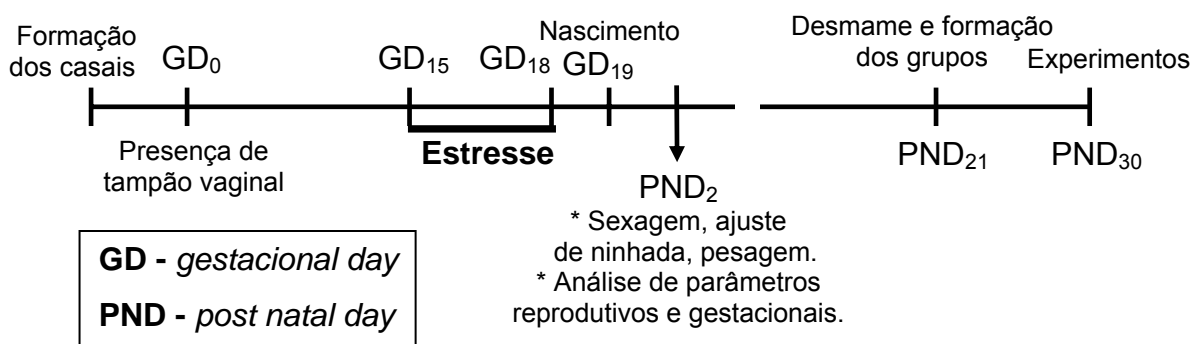


Figura 3 – Esquema temporal que sintetiza os procedimentos realizados.

4.4 Modelos de estresse

- **Footshock estresse – choques nas patas**

A caixa de choque utilizada (AVS Projetos Especiais – São Paulo/SP) é uma caixa metálica retangular com parede frontal em acrílico transparente, medindo 36x25x18 cm. Seu piso é constituído de 24 barras metálicas separadas entre si por

1,5 cm, conectadas a um gerador de choques com alternador de polaridade. Este, por sua vez, permite a seleção da amperagem a ser aplicada nos camundongos. O fundo da caixa é provido de uma bandeja plástica removível, situada a 2,5 cm abaixo das barras que compõem a base da caixa de choque, cuja finalidade é coletar as excretas dos animais (**Figura 4a**). A caixa é acondicionada dentro de um móvel com 80x51x54 cm, que isola os animais de estímulos externos como, por exemplo: a presença dos experimentadores, sons e/ou luz do ambiente. Este móvel dispõe de dois “olhos mágicos” que permitem a observação dos animais por parte do experimentador (**Figura 4b**).

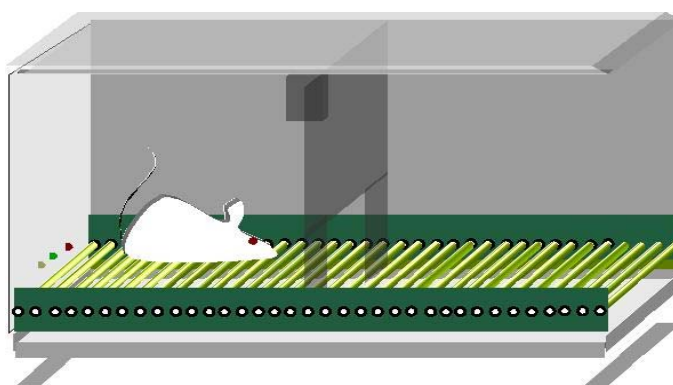


Figura 4a. Ilustração da caixa de choque, conforme suas especificações.



Figura 4b. Ilustração da sala de comportamento onde se encontram os aparatos de choque.

As funções da caixa de choque como: número das sessões de choque, tempo de duração de cada sessão, tempo de adaptação do animal à caixa antes do início das sessões de choque, tempo máximo e mínimo entre uma sessão e outra foram reguladas e monitoradas através de um *software* (4Stressbox – AVS Projetos Especiais) que realiza a interface entre o equipamento e computador (*Pentium II – Microsoft*®).

O modelo de estresse pré-natal empregado foi o de choques intermitentes e inescapáveis, liberados nas patas dos animais e aplicado nas fêmeas dos grupos estresse pré-natal (EE e EC) uma vez ao dia, consecutivamente do 15º ao 18º dia gestacional (GD15-GD18), entre 8h e 10h da manhã. A amperagem utilizada foi a de 0,2 mA. Outros trabalhos relatam ser esta intensidade de choque não lesiva e ideal para estudos nesta área (HIMI *et al.*, 1990). Cada sessão de estresse consistiu em 10 choques aplicados às patas dos animais, com intervalo randômico de 5 a 25 segundos (a fim de evitar-se o condicionamento). Ressalte-se que este modelo vem sendo utilizado com sucesso para avaliações neuroimunes e comportamentais em nossos laboratórios (PALERMO-NETO *et al.*, 2001; FONSECA *et al.*, 2002).

Os animais dos grupos controles não foram estressados pré-natalmente (CC e CE), sendo apenas manipulados quando da limpeza das caixas moradia.

O desafio por *footshock* aos 30 dias de vida dos filhotes dos animais dos grupos CE e EE atenderam as mesmas características do estresse aplicado às fêmeas.

- **Estresse do “metrô de Nova Iorque”**

Este modelo de estresse foi descrito por Dhabhar e McEwen (1997) cujo laboratório situa-se em Nova Iorque (NI), e foi assim denominado por assemelhar-se à situação vivenciada por um indivíduo ao embarcar no metrô em horário de grande circulação de usuários: espaço com restrita capacidade de movimentação do corpo e, com agitação contínua.

A metodologia consiste da adaptação de um clássico modelo de estressor, o “estresse de restrição de movimentos”. Este, é considerado como capaz de promover uma experiência estressante de natureza psicológica, através do sentimento de confinamento do animal. Nesta metodologia, os animais têm seus movimentos restringidos sem serem fisicamente comprimidos e sem experimentarem dor (DHABHAR e MCEWEN, 1997; GLAVIN ET AL., 1994; BERKENBOSCH, WOLVERS e DERIJK, 1991). Duas revisões de um mesmo grupo caracterizam modelo de restrição como extremamente útil para o estudo dos mecanismos, tanto centrais como periféricos, das desordens relacionadas ao estresse, assim como para o estudo de fármacos para o tratamento destas desordens (GLAVIN *et al.*, 1994; PARÉ e GLAVIN, 1986).

O aparato restrição de movimentos, foi desenvolvido por colegas de nosso laboratório, consistindo de uma placa de madeira laminada (23,5 cm de comprimento) onde fixam-se 6 tubos de PVC (3 cm de diâmetro x 10 cm de comprimento) para restrição individual, com as extremidades fechadas para evitar escape, mas com orifícios frontais para ventilação e traseiros permitindo a passagem da cauda do animal estressado. Para emprego do “estresse do metrô de NI”, o aparato era colocado sobre um agitador mecânico (Agitador Kline – Nova Ética, Modelo 108, Vargem Grande Paulista), programado para 2 rotações/segundo. Adotou-se o período de 2 horas de estresse, lembrando-se que durante o mesmo o animal não tinha acesso à água ou ração.

4.5 Verificação do consumo de água e de ração em diferentes períodos gestacionais

Após a separação da fêmea de seu companheiro no décimo dia gestacional (GD₁₀), iniciamos o controle do consumo de água e de ração, o que foi feito até o sétimo dia pós-natal (PND₇).

Deste modo, cada fêmea recebeu uma quantidade conhecida de ração (pesada em balança de precisão), bem como 250 mL de água dosados em proveta volumétrica. O cálculo de consumo foi obtido pela diferença entre a quantidade de água e de ração fornecidos e aquela tomada no momento da análise.

Aferimos os consumos de água e de ração em três momentos:

- antes do início das sessões de exposição ao estressor (do GD₁₀ ao GD₁₅);
- durante o período de exposição ao estressor (do GD₁₅ ao PND₂);
- e, finalmente, após o término de exposição ao estressor (do PND₂ ao PND₇).

4.6 Parâmetros reprodutivos e gestacionais

Avaliamos os seguintes parâmetros reprodutivos e gestacionais: duração da gestação, presença de natimortos, abortamentos, presença de mal-formações, peso da ninhada, número de filhotes e relação de filhotes machos/fêmeas.

Sabe-se que alguns partos podem apresentar complicações de forma que algumas fêmeas permaneçam por um período prolongado em partição. Segundo Asdell (1964), a maioria das partições em camundongos de laboratório dura de 4 a 12 horas (ASDELL, 1964). Mais do que isto, diversos autores citam que a manipulação da mãe e/ ou da prole durante o período de parturição representa um estressor (KOSTEN *et al*, 2007; PARFITT *et al*, 2004; BEANE *et al*, 2002). Por este motivo, realizamos a verificação da data do nascimento dos filhotes apenas observando-se os animais em suas caixas-moradia, sem manusear as parturientes e/ou as ninhadas.

No segundo dia pós-natal realizamos a aferição dos dados acima comentados, sendo as ninhadas ajustadas nesse dia para 8 filhotes por fêmea: 4 machos e 4 fêmeas (de acordo com o número de tetos da espécie). Aleatoriamente, um macho dentre os 4 foi marcado subcutaneamente com nanquim no coxim plantar direito, para verificação diária do desenvolvimento físico e reflexológico. Das ninhadas com mais de 8 filhotes distribuídos uniformemente por sexo, os filhotes aleatoriamente sobressalentes foram separados e encaminhados para outras fêmeas, sendo utilizados em outros experimentos do laboratório.

Nova pesagem dos filhotes, agora feita individualmente, foi realizada no dia do desmame.

Uma vez que a unidade experimental para análise dos efeitos do estresse pré-natal é a ninhada, utilizaram-se apenas dois filhotes por mãe para os experimentos.

Ressalte-se que toda manipulação dos animais foi realizada das 8:00 às 10:00 h, intercalando-se os animais dos grupos controle e experimental, a fim de evitar que variações circadianas atuassem como um viés.

4.7 Avaliação do desenvolvimento físico e reflexológico

Foram avaliados parâmetros do desenvolvimento físico e reflexológico dos filhotes, adaptado do descrito por Iezhitsa, Spasov e Bugaeva (IEZHITSA, SPASOV e BUGAEVA, 2001). Para isso, observamos diariamente um macho de cada prole, marcado como já descrito, registrando-se:

Desenvolvimento Físico:

- a) Aparecimento de pêlos: o dia do aparecimento dos pêlos foi marcado com cautela, dada a presença de penugem.
- b) Desdobramento das orelhas: o dia de desdobramento de ambas orelhas.
- c) Erupção dos dentes: o dia da ocorrência da erupção dos dentes incisivos do maxilar superior;
- d) Abertura dos ouvidos: o dia em que ocorreu a abertura das aurículas auditivas;
- e) Abertura dos olhos: o dia de abertura das fissuras longitudinais das pálpebras.

Desenvolvimento Reflexológico:

- a) Reflexo de endireitamento: este parâmetro foi medido colocando-se os filhotes em posição de decúbito dorsal sobre uma área plana e anotando-se o tempo necessário para que retornassem à posição de decúbito ventral, isto é, apoiados novamente nas quatro patas. Espera-se que este reflexo ocorra em um período máximo de 30 segundos.
- b) Preensão palmar: é o único parâmetro que desaparece ao longo do tempo; foi observado e anotado o dia de ausência de preensão a um objeto (barra lateral de um clipe).
- c) Geotaxia negativa: a observação foi realizada colocando-se os animais sobre uma plataforma com inclinação de 45° posicionados com a cabeça voltada para a base da mesma e anotando-se o tempo necessário para que o animal se redirecionassem em direção ao topo da plataforma. Espera-se que este redirecionamento do animal deve ocorrer em um tempo máximo de 30 segundos.
- d) Andar adulto: registrou-se o dia em que os animais foram capazes de andar com as quatro patas, sem encostar o ventre na superfície em que se deslocavam.

4.8 Análises de parâmetros neuroimunes

- **Leucograma**

A partir de sangue coletado por eutanásia por decapitação ou, por punção cardíaca de animais previamente anestesiados, os leucócitos circlantes totais foram contados em câmara de Neubauer (diluição 1:40 em azul de Trypan). A análise diferencial destes, foi realizada pela confecção de distensão sangüínea (esfregaço)

previamente fixada com metanol (3 minutos) e, a seguir, corada pelo método de Rosenfeld. Contou-se em microscopia óptica 100 células, distinguidas por suas características de coloração e morfologia.

- **Peso relativo das adrenais**

Previamente pesados para a experimentação, os animais foram eutanasiados por decapitação, sendo procedida a coleta das adrenais. Foram retirados os tecidos adjacentes em ambiente umidificado com PBS e, então, pesadas em balança analítica. O peso relativo foi calculado pela relação entre o peso das adrenais e o peso do animal.

- **Contagem da celularidade total de medula óssea**

A coleta de células da medula óssea dos animais foi procedida através da lavagem do fêmur direito com 5 mL de meio RPMI gelado, após o corte das epífises. A contagem celular foi feita em câmara de Neubauer (diluição 1:10 em azul de Trypan).

- **Citometria de fluxo**

A citometria de fluxo é uma técnica que através de um aparelho (FACScalibur Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San José, CA, USA), simultaneamente, mensura e analisa múltiplas características físicas de partículas simples, geralmente células, suspensas em um sistema de fluxo, desenvolvido de tal forma que estas células passem por um foco de luz: o laser (laser de argônio com 488 nm de excitação).

A transmissão ou a refração da luz pelas células, são captadas por meio de quatro detectores: *Side Scatter* (SSC) – sensível à dispersão lateral da luz, fornece idéia de tamanho das células; *Forward Scatter* (FSC) – sensível à dispersão frontal da luz, fornece parâmetros de complexidade celular; e os detectores de fluorescência FL1 (verde) e FL2 (vermelha – alaranjada). Estes sinais ópticos convertidos em sinais eletrônicos, permitindo sua leitura computadorizada (*Macintosh Apple*, CA, USA). pelo *software Cell Quest Pro* (Becton Dickinson Immunocytometry Systems).

As subpopulações celulares são reconhecidas por meio das propriedades FSC/SSC das mesmas. Assim, coletamos os dados relativos aos linfócitos por

análise de *gates*, sendo os resultados de fluorescência adquiridos em escala logarítmica. A fluorescência verde foi mensurada a 530 ± 30 nm (detector FL1) e a fluorescência vermelha foi mensurada a 585 ± 42 nm (FL2).

Os dados relativos à fenotipagem das subpopulações de linfócitos e à verificação de viabilidade celular (apoptose/necrose) foram analisados pelo uso do programa *Cell Quest Pro* (Becton Dickinson Immunocytometry Systems) e, àqueles da linfo-proliferação foram analisados através do programa *FlowJo (Treestar – Versão 7.2.1 para Windows)*.

- **Fenotipagem dos linfócitos do sangue periférico**

A expressão de moléculas que caracterizam as diferentes subpopulações de linfócitos do sangue periférico foi determinada por meio de anticorpos comerciais para diferentes antígenos (Pharmingen), por citometria de fluxo. Após a aquisição dos eventos celulares, a análise foi realizada utilizando-se o *software Cell Quest Pro*.

Resumidamente, após a coleta de sangue periférico heparinizado, 100 μ L do mesmo foi adicionado aos tubos de citometria, procedendo-se a lise hipotônica das hemácias (2 mL de cloreto de sódio 0,2% adicionados aos tubos por 20 segundos seguido de 2 mL de cloreto de sódio 1,6% para retorno ao estado isotônico). As amostras foram a seguir incubadas com os anticorpos monoclonais, por sua vez conjugados com marcadores fluorescentes durante 1 hora, no escuro e em temperatura ambiente. Empregou-se anticorpos monoclonais conjugados ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou ficoeritrina (PE): anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD19. As células marcadas duplamente para anti-CD3 e anti-CD4 foram tidas como linfócitos T *helper* (CD4+), as marcadas com anti-CD8 como linfócitos T citotóxicos, as marcadas com anti-CD4 e anti-CD8 como duplo positivas imaturas e as marcadas com anti-CD19 como linfócitos B.

- **Análise de viabilidade (apoptose/necrose) dos linfócitos do sangue periférico**

Para este experimento, empregou-se uma adaptação do modelo descrito por Navarro (2005). Assim, utilizou-se o fluorocromo PI (iodeto de propídeo) o qual indica perda de seletividade de membrana e conseqüentemente, células inviáveis por necrose. Usou-se, também, a anexina-FITC, um marcador específico de

fosfatidil-serina, proteína fisiologicamente expressa na parte intracelular da membrana que ao ser externalizada iniciando o processo apoptótico mediado pela cascata de eventos das caspases (BEHBAHANI *et al.*, 2005).

Pipetaram-se 100 μL de sangue periférico heparinizado, procedeu-se à lise hipotônica das hemácias e, após lavagem das células com o tampão de ligação procedendo-se a incubação como descrito anteriormente (item 4.12) com 100 μL anexina-FITC (diluída 1:500), em temperatura ambiente e no escuro por 20 minutos. A seguir, as amostras foram ressuspensas em 400 μL de tampão de ligação, procedendo-se imediatamente à leitura no citômetro de fluxo. O iodeto de propídeo (PI, 40 μL na concentração de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foi adicionado aos tubos no momento em que estes foram lidos.

Como procedeu-se dupla marcação celular obteve-se, a partir da seleção de *gate* dos linfócitos, quatro análises possíveis: células negativas para ambas marcações, ou seja, viáveis; células marcadas apenas com PI células marcadas apenas com anexina-FITC e finalmente, células marcadas com PI e anexina-FITC.

- **Obtenção de linfócitos esplênicos**

Para as avaliações da proliferação dos linfócitos esplênicos, os baços foram coletados dos animais da forma mais asséptica possível e, após lavagens com RPMI estéril, foram individualmente macerados em 5 mL de solução RPMI estéril. Cada suspensão celular obtida foi centrifugada (1200 rpm, 8 minutos, 4° C), sendo o botão celular ressuspenso em solução de cloreto de amônio (4 mL). Este processo, foi repetido até a lise completa das hemácias. As células foram, então, ressuspensas em meio RPMI completo (10% SFB – soro bovino fetal) e cultivadas em placas de 6 poços por 2 horas em estufa a 37° C, 5% de CO₂, para aderência dos monócitos e macrófagos ao fundo da placa. Após este período de incubação, o sobrenadante (que contém as células não aderentes - prioritariamente linfócitos) foi cuidadosamente aspirado e transferido para tubos do tipo falcon de 15 mL. As células foram, então, contadas em câmara de Neubauer com azul de Trypan, o que permitiu a verificação da viabilidade dos linfócitos bem como o ajuste do número de células para 2×10^7 células/ mL.

- **Análise de proliferação de linfócitos esplênicos**

Mediante a obtenção e o ajuste do número de linfócitos para 2×10^7 células/mL, marcaram-se as amostras com o fluorocromo CFSE-DA (5mM) (*Molecular Probes*) durante 20 minutos a 37° C – 5% CO₂, o qual permite a quantificação final da taxa de proliferação (ASQUITH *et al*, 2006). Lavou-se, então, as células em RPMI completo estéril e realizou-se o reajuste celular para que tivéssemos ao final 1×10^5 cells/ poço de cultura. Ajustadas as suspensões celulares, estas foram “plaqueadas” em triplicata e mantidas em cultura celular em estufa a 37° C, 5% de CO₂ por 4 dias, para posterior avaliação por citometria de fluxo.

Avaliou-se a proliferação linfocitária sem estímulo (basal) e estimulada pelos mitógenos: PHA (fitohemaglutinina A; sem concentração definida, conforme fabricante) para linfócitos T e LPS (lipopolisacarídeo bacteriano; 300 µg/mL) para as células B.

O cálculo de proliferação foi feito através da análise da população correspondente aos linfócitos esplênicos no *software FlowJo*, o qual calcula a progressão geométrica de decaimento do fluorocromo CFSE das células. Considerando-se que cada célula “plaqueada” continha 100% do CFSE fornecido, ao realizar mitose, 50% de fluorocromo estaria presente em cada célula-filha. Estas, à divisão, fornecem 25% à cada de suas células-filhas, das quais as filhas passam, por sua vez, a ter 12,5% do fluorocromo, e assim sucessivamente. O programa, tem a capacidade de analisar com confiabilidade até 7 gerações celulares. A partir destes dados, calculamos o percentual de proliferação celular, conforme descrito por Lyons (LYONS, 2000).

- **Testes de responsividade dos linfócitos esplênicos em cultura à adição de diferentes concentrações de norepinefrina (NE)**

Nos experimentos de proliferação, avaliou-se a resposta *in vitro* dos linfócitos esplênicos dos animais dos diferentes grupos à noradrenalina (NE).

Inicialmente, foram realizadas curvas dose-resposta para a NE. Para tanto, realizou-se um estudo-piloto visando a seleção das doses de NE a serem utilizadas nos experimentos com os animais dos grupos experimentais supra mencionados. Empregamos incubações *in vitro* com concentrações de NE 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-9} e 10^{-12} M.

Tanto para os experimentos-piloto, como para os demais, cultivava-se uma coluna de poços de cultura com células não marcadas com CFSE (controle de fluorescência basal celular), sendo que nos demais poços o esquema empregado foi o seguinte:

- ✓ Células sem mitógeno e sem NE: 80 μ L de suspensão celular + 20 μ L de RPMI;
- ✓ Células sem mitógeno e com NE: 80 μ L de suspensão celular + 10 μ L de RPMI e 10 μ L de NE (na concentração a ser testada);
- ✓ Células com mitógeno e sem NE: 80 μ L de suspensão celular + 10 μ L de mitógeno (PHA ou LPS);
- ✓ Células com mitógeno e com NE: 80 μ L de suspensão celular + 10 μ L de mitógeno (PHA ou LPS) e 10 μ L de NE (na concentração a ser testada).

- **Indução da inflamação alérgica pulmonar – asma experimental OVA induzida**

Todos animais dos grupos de trabalho (CC, CE, EC, EE) foram imunizados pela injeção subcutânea (s.c.) de 10 μ g de ovalbumina (OVA grau II, Sigma) adsorvida em hidróxido de alumínio (2,5 mg/kg). Após 7 dias da sensibilização os animais receberam um reforço de imunização pela mesma via de administração e formulação, a solução de OVA em hidróxido de alumínio (*booster*).

Salienta-se que os animais dos grupos EC e EE foram estressados pré-natalmente pela mesma metodologia (*footshock*, 10 choques de 0,2 mA, 1 sessão/dia, do 15^o ao 18^o dias gestacionais), já os animais dos grupos CE e EE

foram estressados pós-natalmente com o modelo do “estresse do metrô de NI”, validado como descrito. Neste caso, imediatamente após as 2 horas de exposição ao estressor, os animais eram imunizados.

Nos dias 14, 15 e 16 após a sensibilização primária os animais foram expostos à inalação de 10 mg/ml de OVA por 15 minutos, colocando 5 animais por sessão em caixa plástica (18,5 cm X 18,5 cm X 13,5 cm) acoplada a um nebulizador ultrassônico (marca ICEL) com capacidade de produzir névoa com partículas entre 0,5 a 1,0 μm^3 .

- **Obtenção do lavado broncoalveolar**

As células (mononucleares e polimorfonucleares) presentes no espaço broncoalveolar foram obtidas pela utilização da técnica de lavado broncoalveolar (LBA) segundo **Riffo-Vasquez et al (2000)**. Para tanto, 24 horas após a broncoprovação, os animais foram anestesiados com quetamina (100 mg/kg) e xilazina (20 mg/kg) intraperitonealmente (i.p.), realizando-se exsangüinação por secção da aorta abdominal. Por incisão longitudinal na região cérvico-ventral, canulou-se a traquéia com uma cânula de polietilenoacoplada à uma seringa de plástico contendo 0,5 ml seguido de 1 ml de PBS, totalizando 1,5 ml de lavado broncoalveolar (LBA).

Centrifugou-se o LBA por 10 minutos a 1500 rpm, sendo o sobrenadante desprezado e o botão celular ressuspenso em 1 ml de PBS. O total de células foi contado em câmara de Neubauer e a contagem diferencial feita por microscopia óptica comum e contadas no mínimo 200 células, diferenciando-as segundo o tipo celular (células mononucleares, neutrófilos e eosinófilos).

Para a contagem total, alíquotas da amostra (90 μl) acrescidas de 10 μl de cristal violeta 0,2% dissolvido em ácido acético (30%). Para a contagem diferencial das células, alíquotas da amostra (100 μl) foram colocadas em Cytospin[®] (Fanem) e centrifugadas a 800 rpm por 5 minutos. As lâminas obtidas foram coradas pelo método de May-Grünwald-Guimosa modificado segundo Rosenfeld.

- **Obtenção de lavado de medula óssea**

O fêmur dos animais foi cirurgicamente removido, ambas as extremidades foram abertas e a medula perfundida pela injeção de 1 mL de PBS a partir da extremidade distal, usando uma agulha com espessura de 23G. As células da medula foram dispersas no líquido de perfusão com o auxílio da seringa com agulha. A suspensão celular foi centrifugada, o sobrenadante desprezado, e o botão celular ressuspenso em 1 ml de PBS. Para a contagem total, alíquotas da amostra (90 µl) acrescidas de 10 µl de cristal violeta 0,2% dissolvido em ácido acético (30%). A contagem do número total de células foi realizada em câmara de Neubauer.

- **Leucograma total e diferencial**

Com os animais anestesiados, conforme previamente descrito, foi realizada punção cardíaca (heparinizada, 5000 UI/mL). Do sangue coletado, contaram-se os leucócitos totais em câmara de Neubauer utilizando-se líquido de Turk; e o diferencial por distensão sangüínea corada pelo método de Rosenfeld, com leitura em microscopia óptica.

- **Análise histopatológica pulmonar**

Após a coleta do lavado broncoalveolar, o lobo inferior direito pulmonar foi coletado e armazenado em solução de formaldeído (40%). Após, as amostras foram catalogadas e processadas conforme metodologia padrão para análise pulmonar do Laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP). Ao final, foram obtidas lâminas com os cortes pulmonares corados pelo método de hematoxilina e eosina (HE), as quais foram avaliadas qualitativamente em microscopia óptica.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados pelo teste de Kolmogorov e Smirnov (KS) para verificação de homocedasticidade. Os dados paramétricos foram previamente submetidos ao teste de Bonferroni e, a seguir, analisados através do teste *t* de Student, da análise de variância (ANOVA) de uma via seguida, quando necessário, do teste de Tukey-Kramer de comparações múltiplas, ou ainda, do teste ANOVA de duas vias de medidas repetidas. Dados não paramétricos foram analisados por Kruskal-Wallis (KW) ou teste de distribuição do chi-quadrado, como pós-teste aplicou-se o teste de comparações múltiplas de Dunnet.

Os dados obtidos foram apresentados sob a forma de média \pm erro padrão médio (SEM), sendo que o nível de significância crítico admitido para rejeição da hipótese de nulidade foi uma probabilidade de até 5% ($p < 0,05$) para todas as análises realizadas.

6 DELINEAMENTOS EXPERIMENTAIS E RESULTADOS

Este trabalho foi realizado em, no mínimo, 2 repetições idênticas e, os dados aqui apresentados foram separados ou agrupados conforme experimentos propostos em objetivos específicos, para melhor análise e interpretação.

6.1 Experimento 1: Avaliação dos parâmetros reprodutivos e gestacionais de fêmeas estressadas ou não

Foram utilizadas 35 camundongas prenhes, alocadas aleatoriamente em dois grupos com 18 fêmeas experimentais e 17 fêmeas controle, que foram submetidas ou não, respectivamente, à sessões diárias de *footshock's* no terço final gestacional. Verificamos, no PND2, os seguintes parâmetros reprodutivos e gestacionais das mesmas: duração da gestação, presença de natimortos, abortamentos, presença de mal-formações, peso da ninhada, número de filhotes e relação de filhotes machos / fêmeas. Nova pesagem dos filhotes foi individualmente realizada no dia do desmame (conforme descrito em 3.6 e exemplificado na **Figura 3**).

A duração da gestação foi de 19 dias para ambos os grupos, e não foram observados abortamentos, partos prematuros/ tardios ou filhotes natimortos.

Apenas em 1 fêmea de cada grupo de estudo a gestação foi a termo a *posteriori* do período referido, sendo, deste modo, consideradas apenas para as análises dos parâmetros de duração da gestação; suas proles foram excluídas das análises peri-natais e dos demais experimentos.

A **Tabela 1** contém os resultados dos experimentos em que se aplicaram, ou não, choques inescapáveis nas patas das fêmeas prenhes. Da análise estatística dos dados (teste *t* de Student) verificou-se que o EPN não foi capaz de modificar o número total ou o a média do número de filhotes machos ou fêmeas paridos e, nem mesmo, os pesos médios das ninhadas ao nascimento ou dos filhotes ao desmame (PND21) ($p > 0,05$).

TABELA 1 – Efeitos da administração de EPN¹ sobre parâmetros reprodutivos e gestacionais.

Parâmetro	Grupo	
	Controle n = 16	EPN n = 17
Nº total de filhotes	11,29 ± 2,39	12,11 ± 1,93
Nº de filhotes machos	5,29 ± 1,79	5,53 ± 2,32
Nº de filhotes fêmeas	6,00 ± 2,15	6,53 ± 2,24
Peso ao nascimento (g) (ninhada)	20,07 ± 3,53	20,4 ± 3,21
Peso de machos ao desmame (g)	14,60 ± 2,26	13,50 ± 1,71
Peso de fêmeas ao desmame (g)	13,38 ± 1,61	14,40 ± 2,14

Os dados representam a média ± erro padrão da média (SEM).

¹EPN = estresse pré-natal (terço final gestacional, do 15º ao 18º dias gestacionais).

6.2 EXPERIMENTO 2: Avaliação do consumo de água (mL) e de ração (g) em diferentes períodos peri-natais de fêmeas estressadas ou não

Foram utilizadas as mesmas 35 fêmeas prenhas, do experimento anterior, divididas ao caso em dois grupos: controle e experimental. Destas, avaliou-se o consumo de água e ração conforme descrito no item 3.7. Foram excluídos das análises os dados de fêmeas que não tiveram parto a termo (1 fêmea em cada grupo), bem como aquelas das gaiolas cujos bebedouros apresentaram vazamento em qualquer dos períodos de análise (7 bebedouros ao total, sendo 3 de gaiolas de fêmeas do grupo controle e 4 do grupo EPN).

A **Tabela 2** mostra os resultados de consumo de água. De sua análise, observa-se que não foram detectadas diferenças estatisticamente significantes entre os dados dos grupos controle e experimental (ANOVA de duas vias de medidas repetidas; $df = 2,1,2,72$; $p > 0,05$). Os dados desta tabela evidenciam em ambos os grupos, no entanto, e como esperado, um consumo crescente de água acompanhando o avançar da gestação e da fase de amamentação, o que se confirma pela significância estatística ($p < 0,001$) quando analisado o consumo de água das fêmeas durante o período de amamentação em relação aos demais.

TABELA 2 – Consumo de água (em mL) nos diferentes períodos peri-natais de fêmeas estressadas ou não.

Dias perinatais	Grupo	
	Controle n=13	EPN ¹ n=13
GD ₁₀ – GD ₁₅	53,08±3,02	47,77±1,63
GD ₁₅ – PND ₂	62,38±2,91	66,00±1,54
PND ₂ – PND ₇	103,77±5,17*	103,23±2,91*

Os dados representam a média ± erro padrão da média (SEM).

¹EPN = estresse pré-natal (terço final gestacional, do 15° ao 18° dias gestacionais);

* p<0,001 em relação aos períodos GD's 10-15 e GD15-PND2.

A **Figura 5** ilustra estes resultados.

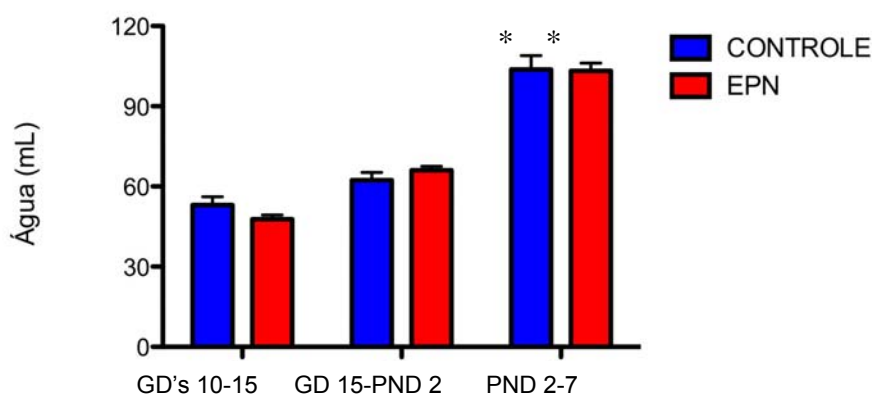


Figura 5. Consumo de água, de acordo com o avançar dos períodos gestacionais e de amamentação.

*p<0,001 em relação aos períodos GD's 10-15 e GD15-PND2.

Na **Tabela 3**, estão detalhados os dados relativos ao consumo de ração das fêmeas, também aqui, não se observaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (ANOVA de duas vias de medidas repetidas; df = 2,1,2,72; p>0,05). No entanto e, mais uma vez, evidenciou-se em ambos grupos um aumento do consumo de ração em função do avançar da gestação e da fase de amamentação, com significância estatística (p<0,001) para este último.

TABELA 3 – Consumo de ração (g) nos diferentes períodos peri-natais de fêmeas estressadas ou não.

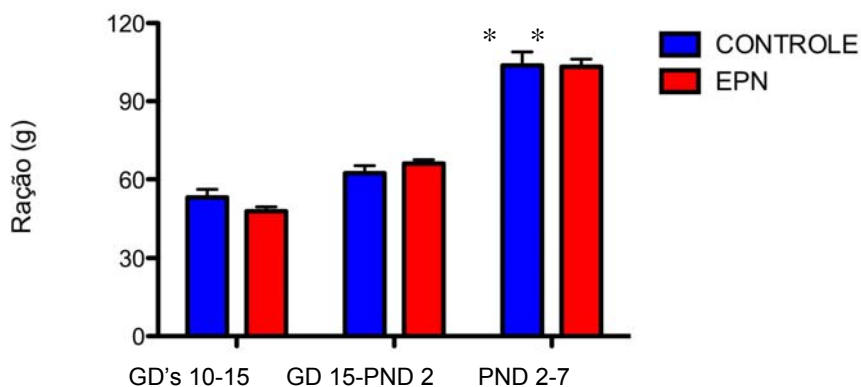
Dias perinatais	Grupo	
	Controle n=13	EPN ¹ n=13
GD ₁₀ – GD ₁₅	38,29±1,25	36,26±1,41
GD ₁₅ – PND ₂	47,72±1,36	49,29±1,45
PND ₂ – PND ₇	86,70±3,28*	86,70±3,30*

Os dados representam a média ± erro padrão da média (SEM).

¹EPN = estresse pré-natal (terço final gestacional, do 15° ao 18° dias gestacionais);

* p<0,001 em relação aos períodos GD's 10-15 e GD15-PND2.

A **Figura 6** ilustra estes resultados.

**Figura 6.** Consumo de água, de acordo com o avançar gestacional e o período de amamentação.

*p<0,001 em relação aos períodos GD's 10-15 e GD15-PND2.

6.3 EXPERIMENTO 3: Avaliação do desenvolvimento físico e reflexológico

Foram utilizados 20 machos, neonatos, provenientes de 10 partições de cada grupo (controle e EPN), os quais foram marcados com nanquim no coxim plantar direito para identificação (item 4.8). Deste modo, a partir do segundo dia pós-natal, os animais foram avaliados diariamente, sempre no mesmo horário (entre 8 e 10h), quanto a vários dos parâmetros. Os dados coletados foram avaliados pelo teste t de Student e os resultados são apresentados na **Tabela 4**, que demonstra não haver

significância estatística (desdobramento das orelhas: $T = 1,500$; geotaxia negativa: $T = 3,095$; reflexo de endireitamento: $T = 1,143$; aparecimento de pêlos: $T = 1,000$; erupção dos dentes: $T = 1,000$; andar adulto: $T = 1,778$; reflexo de agarrar: $T = 1,143$; abertura dos olhos: $T = 1,563$; abertura da aurícula auditiva: $T = 1,073$; para todos os parâmetros: $p > 0,05$).

Tabela 4. Efeitos do EPN sobre o desenvolvimento físico e reflexológico.

Parâmetro	Grupo	
	Controle n=10	EPN n=10
Desdobramento das orelhas	5,2±0,12	5,6±0,15
Geotaxia negativa	6,3±0,15	5,5±0,27
Reflexo de endireitamento	6,3±0,50	5,6±0,34
Aparecimento de pêlos	6,9±0,10	7,1±0,10
Erupção dos dentes	8,9±0,10	9,1±0,10
Andar adulto	9,8±0,13	9,9±0,10
Reflexo de agarrar	13,6±0,27	13,8±0,25
Abertura dos olhos	14,5±0,17	14,8±0,13
Abertura da aurícula auditiva	14,6±0,22	14,7±0,21

6.4 EXPERIMENTO 4: Verificação do peso relativo das adrenais de animais estressados ou não pré- e/ou pós-natalmente

Foram utilizados 44 animais com 30 dias de vida e alocados nos 4 grupos de estudo: CC, EC, CE e EE (n=10 ou 11/ grupo) como descrito no item 3.5. As adrenais foram coletadas imediatamente após as sessões de *footshock* pós-natal, intercalando-se um animal de cada grupo para as coletas, e os pesos relativos das adrenais foram calculados conforme descrito (item 3.9). Excluiu-se da análise um animal do grupo CC, cujas adrenais foram danificadas no ato da coleta.

Os dados referentes a este experimento foram analisados estatisticamente (ANOVA de uma via), e mostram que o EPN e a sessão aguda de exposição ao choque nas patas (PND30) não modificaram o peso das adrenais ($T = 0,03565$; $df=3,39$; $p > 0,05$). Na **Tabela 5**, são apresentados tais valores.

TABELA 5 – Efeitos da exposição pré-natal (terço final gestacional, crônico) ou pós-natal (30 dias, agudo) sobre o peso relativo das adrenais

	Grupo			
	CC ¹ n=10	EC ² n=11	CE ³ n=11	EE ⁴ n=11
Peso relativo (g/100g peso vivo)	0,0128±0,003	0,0132±0,004	0,0134±0,004	0,0130±0,003

Os dados representam a média ± erro padrão da média (SEM).

¹ CC = controle-controle, não estressado; ² EC = estressado-controle, apenas EPN; ³ CE = controle-estressado, estressado agudamente aos 30 dias; ⁴ EE = estressado-estressado, EPN e aos 30 dias.

6.5 EXPERIMENTO 5: Contagem da celularidade total de medula óssea de animais estressados ou não pré- e/ou pós-natalmente

Foram utilizados os mesmos 48 animais com 30 dias de vida (item 6.3), que foram alocados nos 4 grupos de estudo: CC, EC, CE e EE (n=12/ grupo), como descrito no item 3.5. Realizou-se a contagem da celularidade total da medula óssea conforme descrito no item 3.10.

Os dados deste experimento, foram analisados estatisticamente (ANOVA), observando-se que a exposição ao choque pré-natal durante o terço final gestacional não alterou significativamente a celularidade; o mesmo é válido quando da análise dos dados obtidos após a exposição a uma sessão aguda de choques inescapáveis aos 30 dias de vida (F= 0,6559; df= 3,43; p>0,05). Os dados referentes a este experimento, estão apresentados na **Tabela 6**.

TABELA 6 – Efeitos da exposição pré-natal (terço final gestacional, crônico) ou pós-natal (30 dias, agudo) sobre a celularidade total de medula óssea (célx10⁷/ 5mL).

	Grupo			
	CC ¹ n=12	EC ² n=12	CE ³ n=12	EE ⁴ n=12
Célx10⁷/ 5 mL	3,06±0.79	3,49±0,79	3,10±0,76	3,37±1,08

Os dados representam a média ± erro padrão da média (SEM).

¹ CC = controle-controle, não estressado; ² EC = estressado-controle, apenas EPN; ³ CE = controle-estressado, estressado agudamente aos 30 dias; ⁴ EE = estressado-estressado, EPN e aos 30 dias.

6.6 EXPERIMENTO 6: Fenotipagem dos linfócitos do sangue periférico de animais estressados ou não pré- e/ou pós-natalmente

Foram utilizados os mesmos 48 animais com 30 dias de vida (itens 6.3 e 6.4), sendo alocados nos 4 grupos de estudo: CC, EC, CE e EE (n=12/ grupo), conforme descrito nos itens 3.5 e 3.12. Uma vez realizada a leitura das amostras no citômetro de fluxo, selecionou-se a população correspondente aos linfócitos e realizou-se a análise.

A **Figura 7**, ilustra um gráfico de densidade celular proveniente de um animal controle (*density plot* - cada ponto no gráfico é referente a uma célula e a sobreposição de pontos gera o aumento de densidade gráfica que é indicada pela mudança de coloração). A partir de dados como estes, realizamos a seleção da população representativa dos linfócitos (*gate*) por suas características de tamanho por granulosidade (FSC x SSC). Tal *gate* é pequeno, como caracterizado na **Figura 7**, atendendo ao preconizado pela técnica visando excluir possíveis células não representativas.

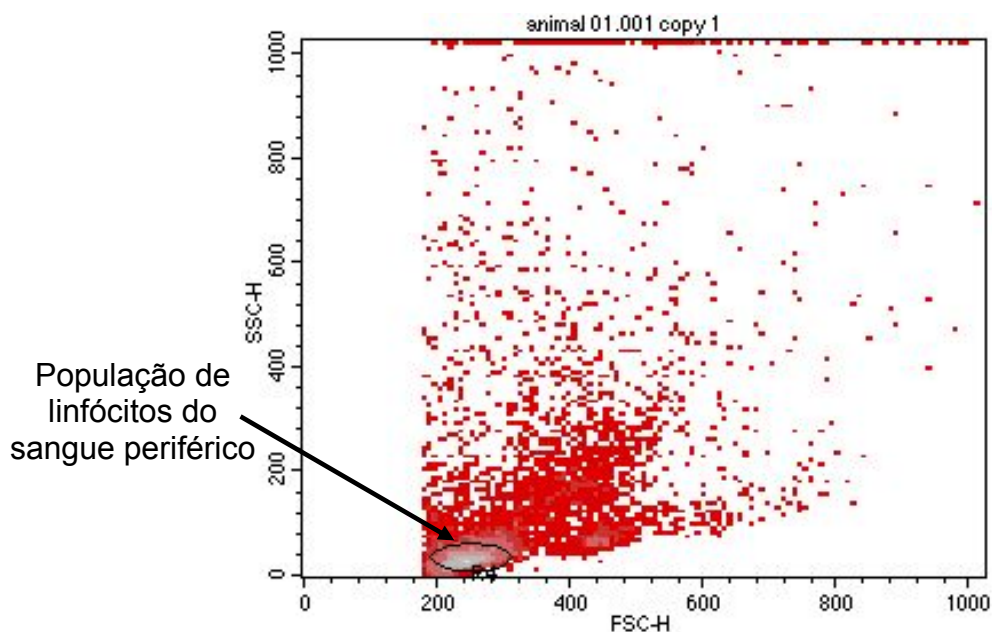
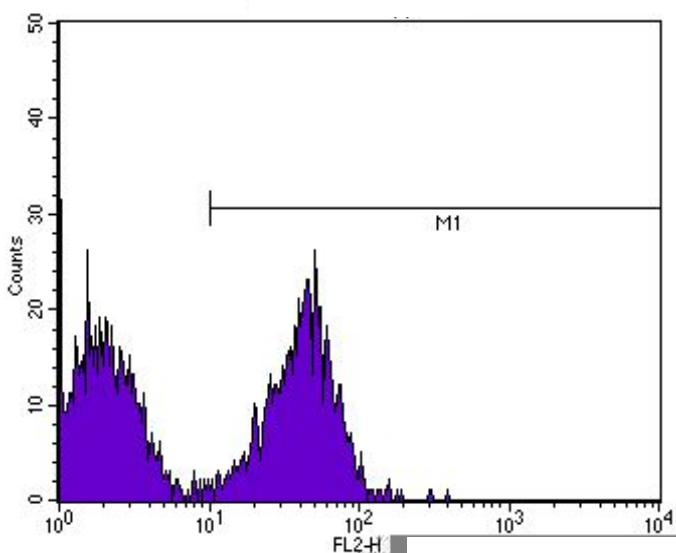


Figura 7 – Gráfico de densidade celular obtido de um animal controle, ilustrando a população de linfócitos do sangue periférico, a partir da qual, foram realizadas as análises fenotípicas, marcando-se as proteínas de superfície do tipo CD com anticorpos monoclonais.

Para verificação do percentual de células B e T citotóxicas, marcadas com apenas um anticorpo monoclonal (CD19 e CD8, respectivamente), buscou-se verificar, a partir da seleção da população de linfócitos, o percentual de células que expressavam a proteína CD em questão, através da análise de histogramas, conforme ilustra a **Figura 8**. Nota-se na mesma, a presença de dois picos celulares: o pico à esquerda, que foi excluído da análise, indica a fluorescência basal ou branco; já o pico à direita no histograma mostra a fluorescência das células marcadas com o anticorpo.

Histograma da análise de CD19-PE

-Linfócitos B-



Histograma da análise de CD8-PE

- Linfócitos T citotóxicos-

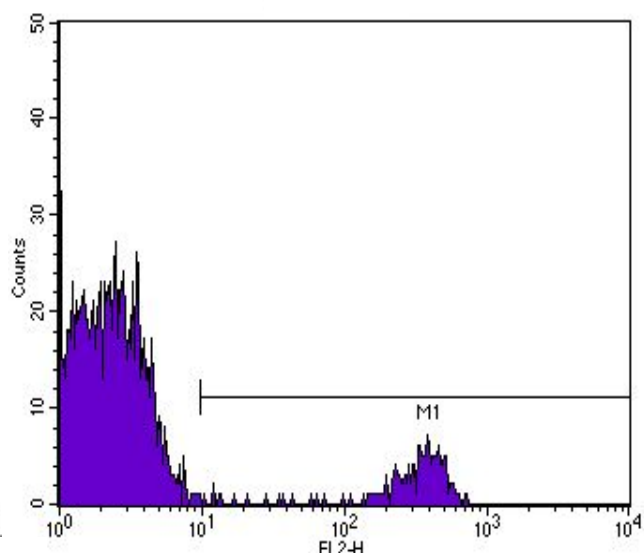


Figura 8 – Histogramas de animais controles, ilustrativos das análises de subpopulações de linfócitos CD19 (linfócitos B) e CD8 (linfócitos T citotóxicos), realizadas a partir da seleção da população de linfócitos.

A análise de células duplo-marcadas com anti-CD3 e anti-CD4, foi realizada a partir da população de linfócitos, obtendo-se um gráfico celular por quadrantes. No quadrante superior direito (SD) encontram-se as células duplo-marcadas ou linfócitos T auxiliares. O quadrante superior esquerdo (SE) indica as células marcadas apenas com anti-CD3 ou linfócitos *naive*, células NK, entre outras. Já no quadrante inferior esquerdo (IE) temos as células negativas para estes anticorpos, isto é, células B, entre outras. Tais resultados, são exemplificados pela **Figura 9**.

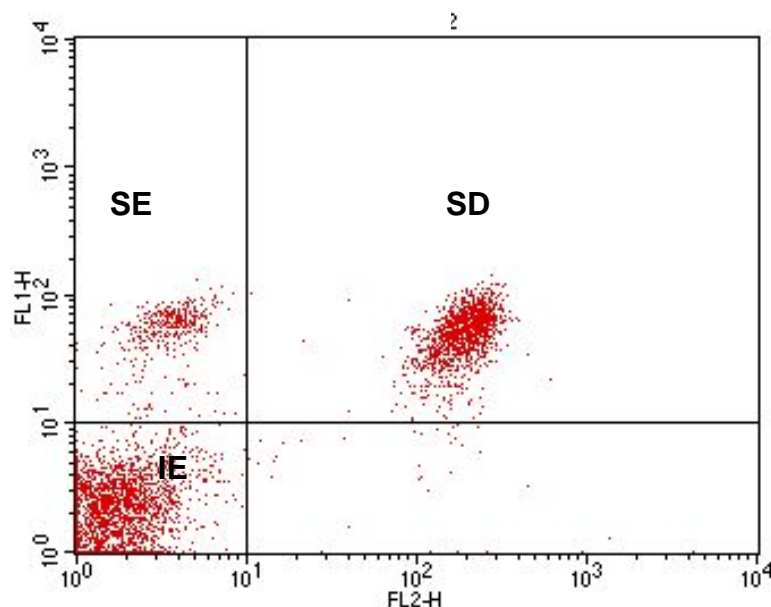


Figura 9 – Gráfico celular de animal controle, ilustrativo das análises de dupla marcação (anti-CD3 e anti-CD4) de linfócitos do sangue periférico, realizadas a partir da população de linfócitos do sangue periférico. (SE= CD3+: linfócitos *naive*, células NK, entre outras; SD= CD3-CD4+: linfócitos T auxiliares; IE= células não marcadas pelos anticorpos: linfócitos B, entre outras).

A análise estatística de dados como estes (ANOVA) indicou ausência de diferenças significantes quanto aos percentuais dos diferentes fenótipos de linfócitos periféricos entre os grupos (CD19: $F= 1,620$; $df=3,44$; $p>0,05$; CD8: $F= 4,979$; $df=3,44$; $p>0,05$; CD3-CD4: $F= 0,7674$; $df=3,44$; $p>0,05$); portanto, indica que a aplicação de choques nas patas quer no período pré-natal quer no pós-natal não afetou este parâmetro imunológico. Os resultados correspondentes a este experimento podem ser vistos na **Tabela 7**.

Tabela 7 – Efeitos do estresse pré e/ou pós-natal sobre os percentuais das subpopulações de linfócitos do sangue periférico.

Subpopulação linfocitária (%)	Grupo ¹			
	CC n=12	EC n=12	CE n=12	EE n=12
CD19 – linf. B	44,26±9,24	43,84±9,9	36,13±7,38	41,34±13,27
CD8 – linf. T citotóxico	6,79±1,78	8,11±2,00	9,82±2,03	8,85±2,08
CD3-CD4 – linf. T auxiliar	30,48±6,72	33,20±9,15	34,97±10,05	30,67±7,67

Os dados representam a média ± erro padrão da média (SEM).

¹ CC = controle-controle, não estressado; ² EC = estressado-controle, apenas EPN; ³ CE = controle-estressado, estressado agudamente aos 30 dias; ¹ EE = estressado-estressado, EPN e aos 30 dias.

6.7 EXPERIMENTO 7: Análise de viabilidade (apoptose/necrose) dos linfócitos do sangue periférico de animais estressados ou não pré- e/ou pós-natalmente

Foram utilizados os mesmos 48 animais, alocados nos 4 grupos de estudo: CC, EC, CE e EE (n=12/ grupo), conforme descrito nos itens 3.5 e 3.13.

Como houve dupla marcação celular, obteve-se a partir da seleção da população de linfócitos quatro análises possíveis (quadrantes): células negativas para ambas marcações, ou seja, viáveis (IE: quadrante inferior esquerdo); células marcadas apenas com anexina-FITC, ou seja, em processo apoptótico (ID: quadrante inferior direito); células marcadas apenas com PI, ou seja, mortas por necrose, com perda da permeabilidade seletiva da membrana (SD: quadrante superior direito); e finalmente, marcadas com PI e anexina-FITC (SD: quadrante superior direito).

A **Figura 10** ilustra um gráfico de densidade celular por quadrantes de dupla marcação anexina-FITC e PI, obtido pela seleção da população de linfócitos do sangue periférico de um animal do grupo controle.

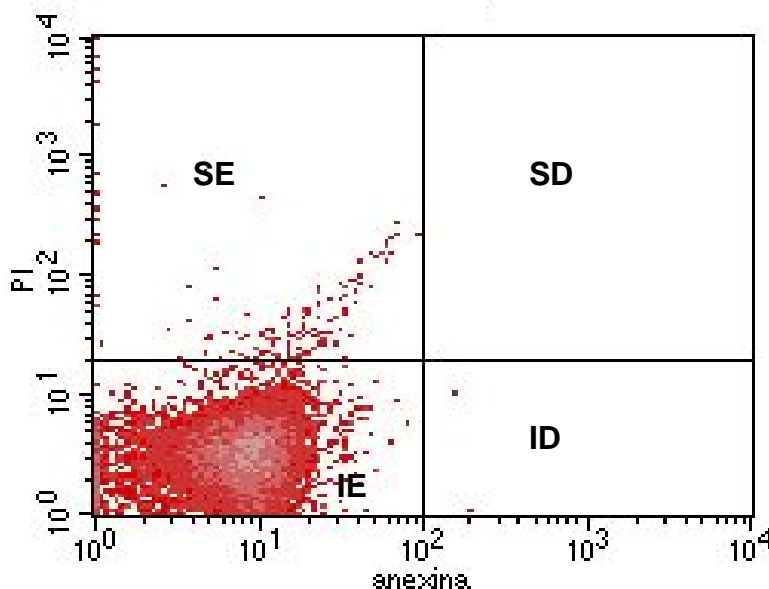


Figura 10 – Densidade celular de células provenientes de um animal do grupo controle, ilustrativo da técnica empregada, realizada a partir da seleção da população de linfócitos do sangue periférico. Observe que a maioria das células encontram-se no quadrante inferior esquerdo, ou seja, são viáveis. (IE= inferior esquerdo; células negativas para marcação com anexina-FITC e PI, ou seja, viáveis; SE= superior esquerdo; células positivas para anexina-FITC, ou seja, em apoptose; SD= superior direito, células positivas para ambos marcadores, ou seja, mortas; ID= inferior direito; células marcadas com PI, ou seja, necróticas).

Os resultados relativos a este experimento encontram-se na **Tabela 8**, os quais quando analisados estatisticamente (ANOVA) demonstraram ausência de efeitos do EPN e do desafio de responsividade ao estressor no período pós-natal (IE: $F=0,2512$; $df=3,43$; $p>0,05$; $p<0,05$; SD: $F=0,4981$; $df=3,43$; $p>0,05$).

Tabela 8 – Efeitos do estresse pré e/ou pós-natal sobre os percentuais de células viáveis e inviáveis (apoptose/ necrose), quadrantes inferior-esquerdo e superior-direito, respectivamente.

Quadrante	Grupo			
	CC ¹ n=11	EC ² n=12	CE ³ n=12	EE ⁴ n=12
Células viáveis	98,82±0,39	98,92±0,21	98,69±1,37	98,63±1,06
Células inviáveis (apoptose/ necrose)	0,0109±0,010	0,0091±0,010	0,0150±0,014	0,0108±0,012

Os dados representam a média ± erro padrão da média (SEM).

¹ CC = controle-controle, não estressado; ² EC = estressado-controle, apenas EPN; ³ CE = controle-estressado, estressado agudamente aos 30 dias; ⁴ EE = estressado-estresado, EPN e aos 30 dias.

6.8 EXPERIMENTO 8: Testes-piloto de responsividade de esplenócitos à proliferação celular: seleção de mitógenos e doses de NE

Inicialmente, foi realizado um experimento-piloto para testar os mitógenos e as doses de NE a serem empregados nos experimentos. Para isto, utilizaram-se esplenócitos de 4 animais do grupo controle, ajustados para 1×10^5 células/poço, conforme detalhado nos itens 3.15, 3.16 e 3.17.

A primeira questão a ser respondida era: qual a responsividade dos esplenócitos-linfócitos aos mitógenos LPS, PHA e ConA?

Os resultados deste experimento-piloto obtidos por citometria de fluxo foram calculados pelo *software FlowJo*, com consecutiva análise estatística (ANOVA – teste de comparações múltiplas de Tukey-Kramer; $F=7.501$; $df=3,12$). Esta, revelou que o estímulo proliferativo desencadeado pelo mitógeno LPS foi significativo ($p<0,01$) em relação às células não estimuladas. O mesmo foi válido para o mitógeno PHA ($p<0,05$). Porém, a adição de ConA às culturas não foi capaz de incrementar o percentual de proliferação dos esplenócitos ($p>0,05$). A **Tabela 9** mostra os resultados deste experimento, na forma de média±SEM, e a **Figura 11**, os ilustram.

Tabela 9 – Efeitos dos diferentes mitógenos testados na indução de proliferação dos esplenócitos.

Parâmetro	% de proliferação n=4
Somente células	5,37±1,44
LPS	30,68±1,89*
PHA	24,60±6,98#
ConA	16,18±3,12

Os dados representam a média ± erro padrão da média (SEM).

* $p < 0,01$ em relação às células não estimuladas com mitógeno;

$p < 0,05$ em relação às células não estimuladas com mitógeno.

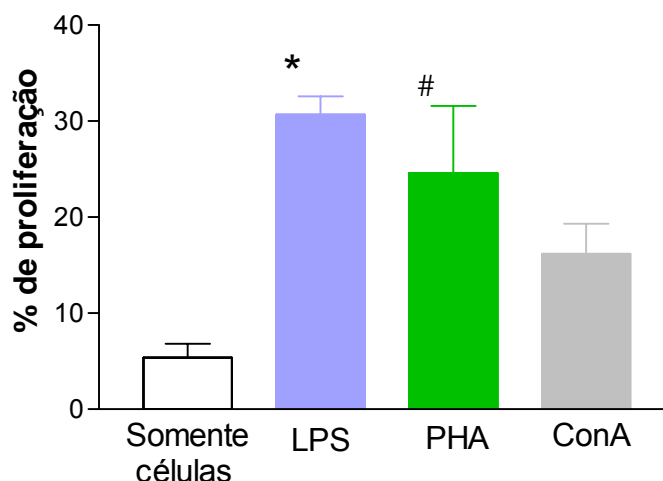


Figura 11 – Efeitos dos diferentes mitógenos testados na indução de proliferação dos esplenócitos. Os dados representam a média ± erro padrão da média (SEM).

* $p < 0,01$ em relação às células não estimuladas com mitógeno;

$p < 0,05$ em relação às células não estimuladas com mitógeno.

Testaram-se também diversas concentrações de NE para escolha daquelas que seriam mais adequadas para o experimento. A análise estatística (ANOVA seguida do pós-teste de Tukey-Kramer) destes resultados revelou que a NE nas concentrações 10^{-3} e 10^{-4} M *per se* foram capazes de estimular a proliferação celular ($F = 13,378$; $df = 6,21$; $p < 0,001$ e $p < 0,01$, respectivamente), o que não foi observado

após o emprego das demais doses. A **Tabela 10** mostra e a **Figura 12** ilustra estes efeitos.

Tabela 10 – Efeitos, *in vitro*, da NE *per se* na indução de proliferação dos esplenócitos, ou seja, sem adição de mitógenos.

Parâmetro	% de proliferação n=4
Somente células	5,37±1,44
Somente células + NE 10 ⁻¹² M	6,97±0,98
Somente células + NE 10 ⁻⁹ M	7,01±0,90
Somente células + NE 10 ⁻⁶ M	5,12±1,04
Somente células + NE 10 ⁻⁵ M	4,68±1,09
Somente células + NE 10 ⁻⁴ M	35,66±9,34#
Somente células + NE 10 ⁻³ M	48,69±8,88*

Os dados representam a média ± erro padrão da média (SEM).

* p < 0,001 em relação aos demais (exceto NE3 *versus* NE4).

p < 0,01 em relação aos demais (exceto NE3 *versus* NE4).

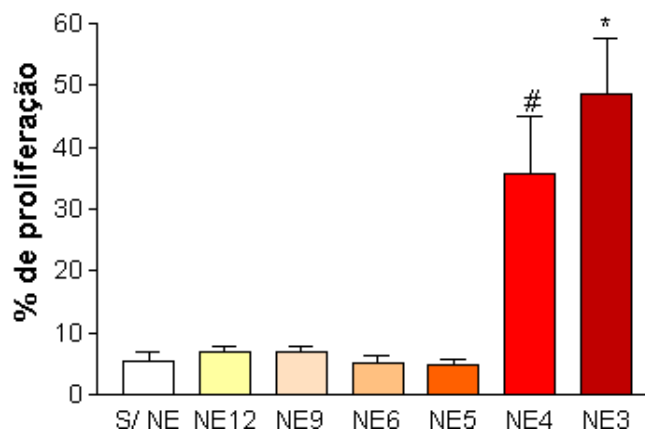


Figura 12 – Efeitos, *in vitro*, da NE *per se* na indução de proliferação dos esplenócitos, ou seja, sem adição de mitógenos.

* p < 0,001 em relação aos demais (exceto NE3 *versus* NE4).

p < 0,01 em relação aos demais (exceto NE3 *versus* NE4).

Idêntico fato foi observado quando da análise (ANOVA seguida do pós-teste de Tuckey-Kramer) das doses de NE empregadas conjuntamente com o mitógeno LPS (células B). A adição de NE na dose de 10^{-3} M ao cultivo celular resultou em ação sinérgica de um sobre o outro como estímulo proliferativo ($F= 6,021$; $df= 6,21$; $p<0,05$).

Ressalte-se que quando empregamos NE9, o SEM apresentou-se elevado. Conscientes de que esta variação é prejudicial às análises estatísticas, justificamos seu emprego pelo fato de que este experimento foi um piloto com apenas 4 animais; mais do que isto, os resultados de uma forma geral, demonstraram não ter sido esta dose relevante. Já a proliferação de esplenócitos após o emprego da dose NE12 não foi estatisticamente menor que àquela observada com a adição de NE3 e, novamente, acreditamos ser isto devido ao número amostral que permitiu variações. Estes resultados são apresentados na **Tabela 11**, e ilustrados pelas **Figuras 13 e 14**.

Tabela 11 – Efeitos percentuais da administração de NE concomitantemente com o mitógeno LPS (específico para células B), na indução de proliferação dos esplenócitos, *in vitro*,

Parâmetro	% de proliferação n=4
Somente LPS	30,68±1,90
LPS + NE 10^{-12} M	33,94±4,16
LPS + NE 10^{-9} M	17,24±4,66
LPS + NE 10^{-6} M	20,03±2,85
LPS + NE 10^{-5} M	27,45±3,09
LPS + NE 10^{-4} M	30,38±6,24
LPS + NE 10^{-3} M	51,81±6,92*

Os dados representam a média ± erro padrão da média (SEM).

* estatisticamente significativo, sendo: $p<0,05$ em relação às células sem NE, NE4 e NE5; $p<0,01$ em relação à NE6 e, finalmente, $p< 0,001$ em relação à NE9. Não significativo em relação à NE12.

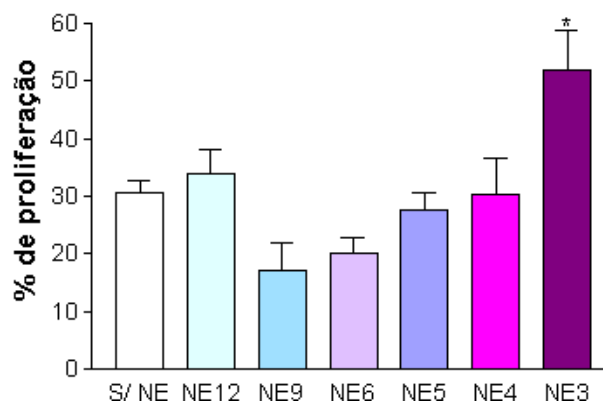


Figura 13 – Efeitos percentuais da administração de NE concomitantemente com o mitógeno LPS (específico para células B), na indução de proliferação dos esplenócitos, *in vitro*,

* $p < 0,05$ (no mínimo) em relação às demais doses, exceto NE12.

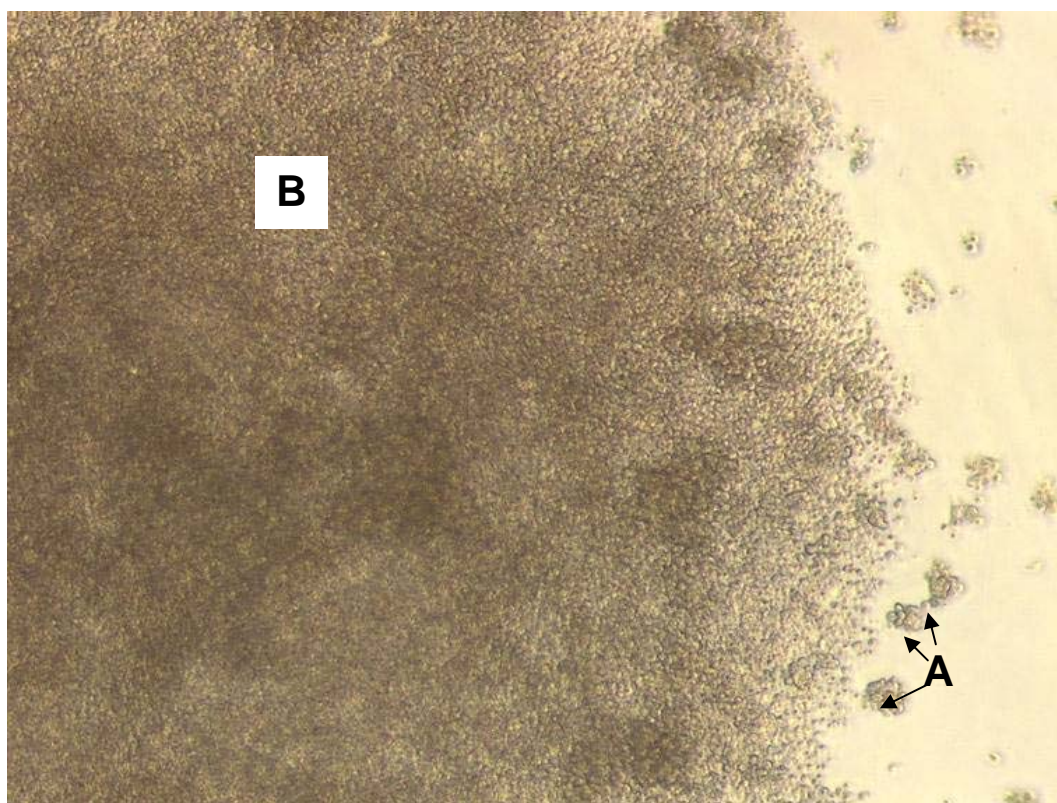


Figura 14 - Fotomicrografia (40x) evidenciando individualmente colônias de esplenócitos (A), e colônias cuja proliferação foi tão intensa que apresentam-se agregadas em massa única indistinta (B). 1×10^5 células foram plaqueadas, sendo a imagem obtida 4 dias após estímulo mitogênico com LPS e NE3, antes da coleta da suspensão celular para aquisição dos dados no citômetro de fluxo.

Quando empregou-se o mitógeno PHA (células T), a dose de NE3 novamente incrementou a proliferação dos esplenócitos em comparação a todas as demais doses (ANOVA seguida do pós-teste de Tuckey-Kramer; $F= 12,843$; $df= 6,21$; $p<0,05$ em relação à NE4 e $p<0,001$ em relação às demais doses). Já a dose NE4, foi capaz de aumentar a proliferação celular apenas quando comparada às doses NE9 e NE12 ($p<0,05$). As demais doses não foram efetivas em induzir proliferação celular. Estes dados são apresentados na **Tabela 12**, e são ilustrados pela **Figura 15**.

Tabela 12 – Efeitos percentuais da administração de NE concomitantemente com o mitógeno PHA (específico para células T), na indução de proliferação dos esplenócitos, *in vitro*,

Parâmetro	% de proliferação n=4
PHA	24,60±6,98
PHA + NE 10 ⁻¹² M	17,66±3,53
PHA + NE 10 ⁻⁹ M	16,58±3,20
PHA + NE 10 ⁻⁶ M	22,80±4,95
PHA + NE 10 ⁻⁵ M	23,83±7,17
PHA + NE 10 ⁻⁴ M	43,77±7,01#
PHA + NE 10 ⁻³ M	69,79±2,09*

Os dados representam a média ± o erro padrão da média (SEM).

* $p<0,01$ em relação aos demais, exceto NE4, cuja significância é de $p<0,05$;

$p<0,05$ em relação à NE9 e NE12.

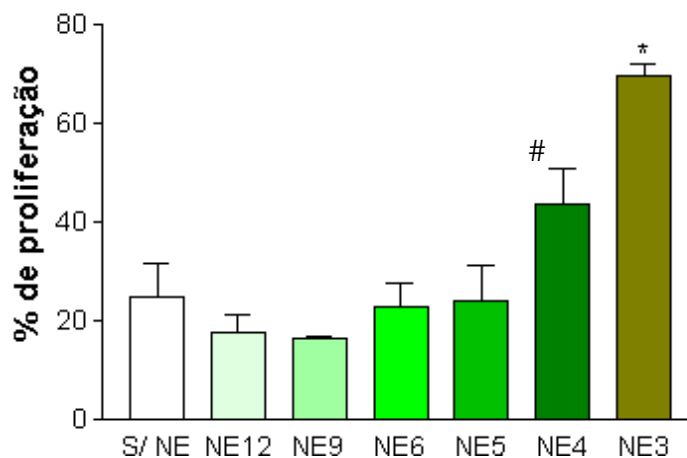


Figura 15 – Efeitos percentuais da administração de NE concomitantemente com o mitógeno PHA (específico para células T), na indução de proliferação dos esplenócitos, *in vitro*,

* $p<0,001$ em relação às demais doses e $p<0,05$ em relação à NE4;

$p<0,05$ em relação à NE9 e NE12.

Após adição de NE às culturas celulares com o mitógeno ConA também mostrou-se que as doses de NE3 ($F= 19,118$; $df= 6,21$; $p<0,01$ em relação à NE4 e $p<0,001$ em relação aos demais) e NE4 ($F= 19,118$; $df= 6,21$; $p<0,05$ em relação às doses de NE, mas não em relação às células apenas com o mitógeno) foram capazes de modular o incremento de proliferação celular. Tais dados, estão contidos na **Tabela 13** e na **Figura 16**.

Tabela 13 – Percentuais de proliferação celular em adição do mitógeno ConA, com as diferentes concentrações de NE.

Parâmetro	% de proliferação ¹
ConA	16,18±3,12
ConA + NE 10 ⁻¹² M	10,88±2,48
ConA + NE 10 ⁻⁹ M	10,55±2,89
ConA + NE 10 ⁻⁶ M	8,55±1,82
ConA + NE 10 ⁻⁵ M	8,68±1,24
ConA + NE 10 ⁻⁴ M	26,22±3,07#
ConA + NE 10 ⁻³ M	48,20±6,21*

Os dados representam a média ± o erro padrão da média (SEM).

(1) n= 4 animais.

* $p<0,001$ em relação às células não estimuladas, NE5, NE6, NE9 e NE12; e $p<0,01$ em relação à NE4.

$p<0,05$ em relação à NE5, NE6, NE9 e NE12.

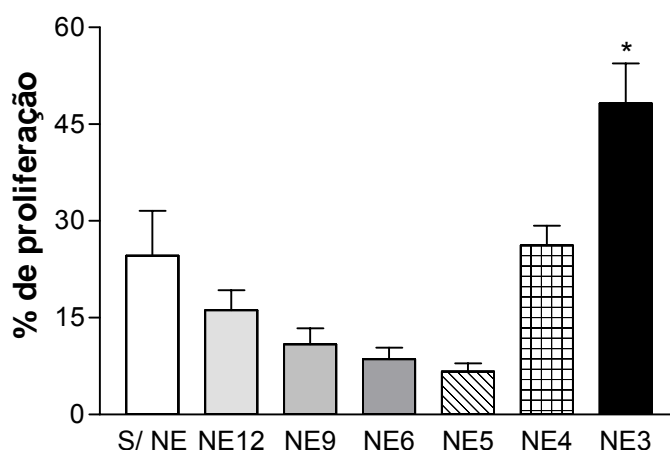


Figura 16 – Cultura de esplenócitos com as doses de NE testadas, em adição do mitógeno ConA.

* $p<0,01$ em relação às células não estimuladas, NE5, NE6, NE9 e NE12; e $p<0,01$ em relação à NE3.

$p<0,05$ em relação à NE5, NE6, NE9 e NE12.

Os resultados obtidos neste experimento-piloto sugerem que os mitógenos mais efetivos foram o LPS (células B) e a PHA (células T). Portanto, utilizou-se no experimento a seguir, tais fármacos e não o mitógeno ConA, inicialmente proposto no projeto deste mestrado.

Quanto às doses de NE, optou-se por realizar uma curva logarítmica de molaridade de 3 pontos, sendo o primeiro a mais baixa dose, NE12, cuja literatura³ descreve ser a dose fisiológica circulante. A partir desta, seguiu-se em progressão geométrica de dose, sendo portanto o segundo ponto da curva a NE6 e finalmente o terceiro NE3, aquele cuja significância estatística foi evidenciada.

6.9 EXPERIMENTO 9: Testes de responsividade à NE em proliferação de esplenócitos de animais estressados ou não pré-e/ou pós-natalmente

Foram utilizados 36 animais com 30 dias de vida, alocados como 9 animais por grupo nos grupos CC, EC, CE, e CC, conforme detalhado nos itens 3.5, 3.15, 3.16 e 3.17 em Materiais e Métodos.

Novamente, a primeira questão a ser respondida era se os mitógenos *per se* haviam sido efetivos. Neste caso, até mesmo visualmente pode-se verificar o deslocamento da população de linfócitos esplênicos no *dot plot*, pelo aumento da relação de tamanho por granulosidade das células (FSC x SSC). Ou seja, de células maduras, pouco complexas e pequenas, passou-se a ter uma população com células mais imaturas como blastos e pró-linfócitos, os quais caracterizam-se por núcleo maior com cromatina ainda não tão densa, e maior tamanho citoplasmático. Já nos histogramas, evidenciou-se um aumento do tamanho dos picos celulares após a adição dos mitógenos e seu deslocamento para a esquerda, característico do decaimento do fluorocromo FSCE em progressão geométrica às células-filhas após o processo mitótico. Todas estas observações encontram-se na **Figura 17**.

³ Todos os dados encontram-se em detalhes na Revisão da Literatura presente neste trabalho.

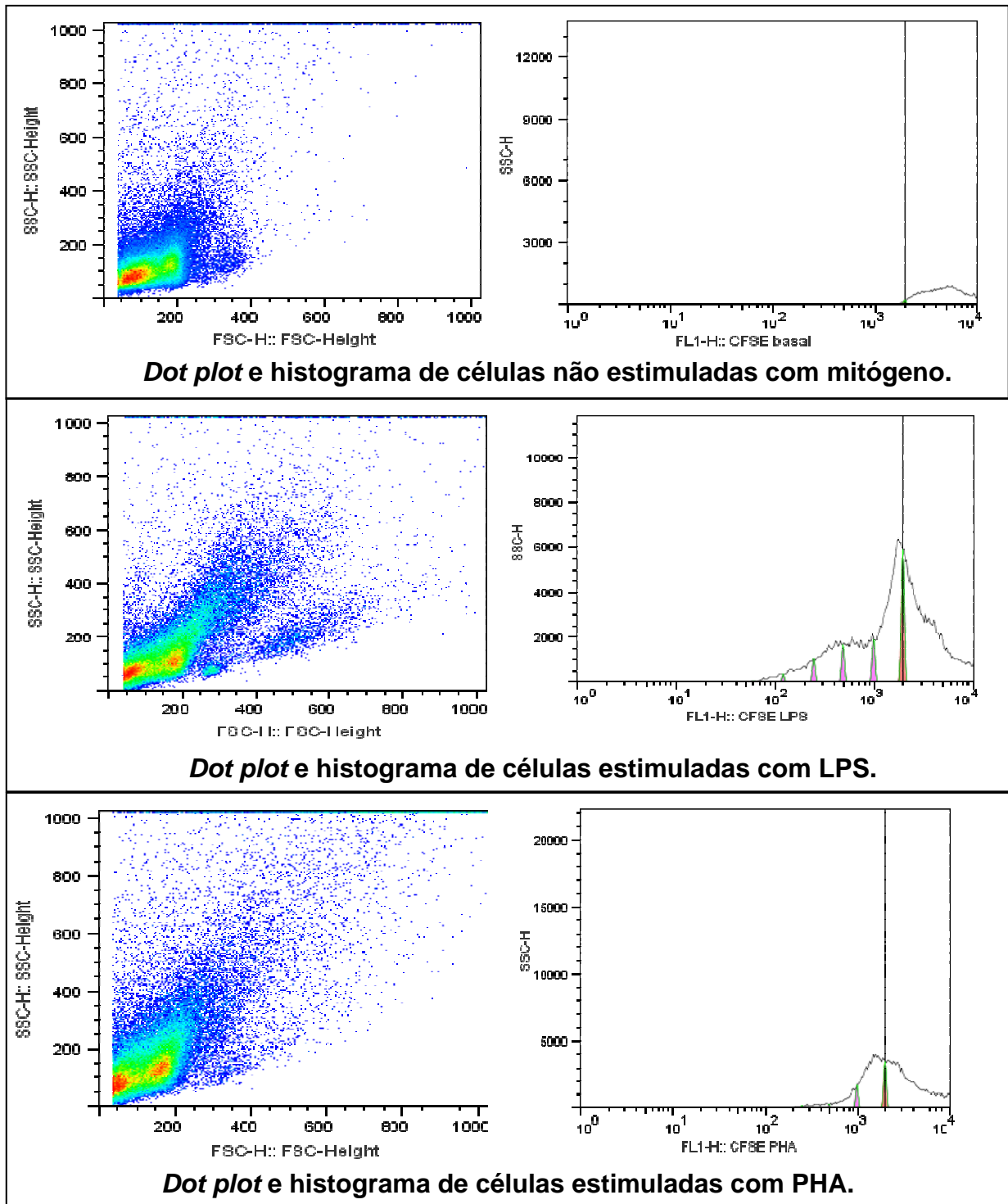


Figura 17 – *Dot plots* e histogramas de animais controles, ilustrando as diferenças dependentes dos estímulos empregados. Nota-se que a adição dos mitógenos deslocou nos *dot plots* a população de esplenócitos, pelo aumento em sua relação tamanho x granulosidade (FSC x SSC), indicativo de proliferação pela presença de células mais imaturas como blastos e pró-linfócitos. Já nos histogramas, observam-se aumento dos picos celulares e deslocamento dos mesmos para esquerda, denotando que o fluorocromo empregado (CFSE) diminuiu sua concentração (ou seja, sofreu progressão geométrica inversa por sua divisão às células-filhas).

Ora, a utilização dos mitógenos não apenas foi visualmente efetiva em aumentar os percentuais de proliferação de esplenócitos-linfócitos como também este fato pode ser visto pela análise dos dados da **Tabela 14**, que contém os valores de proliferação de células não estimuladas e estimuladas por mitógenos LPS e PHA, em todos os grupos de trabalho.

Tabela 14 – Percentuais de proliferação dos esplenócitos frente aos diferentes mitógenos.

Parâmetro	Grupo ¹			
	CC	EC	CE	EE
Somente células	2,93±0,63	3,59±0,57	3,66±0,74	2,56±0,59
LPS	9,41±1,12*	11,88±1,45*	8,24±0,62*	8,13±0,99*
PHA	11,79±2,25#	11,40±1,35#	10,31±1,24#	10,07±2,87#

Os dados representam a média ± erro padrão da média (SEM).

(1) n= 9 animais por grupo em todos os grupos;

* p<0,001 em relação às células não estimuladas com mitógeno, sem diferenças entre os grupos;

p<0,05 em relação às células não estimuladas com mitógeno, sem diferenças entre os grupos.

A **Figura 18** ilustra estes resultados.

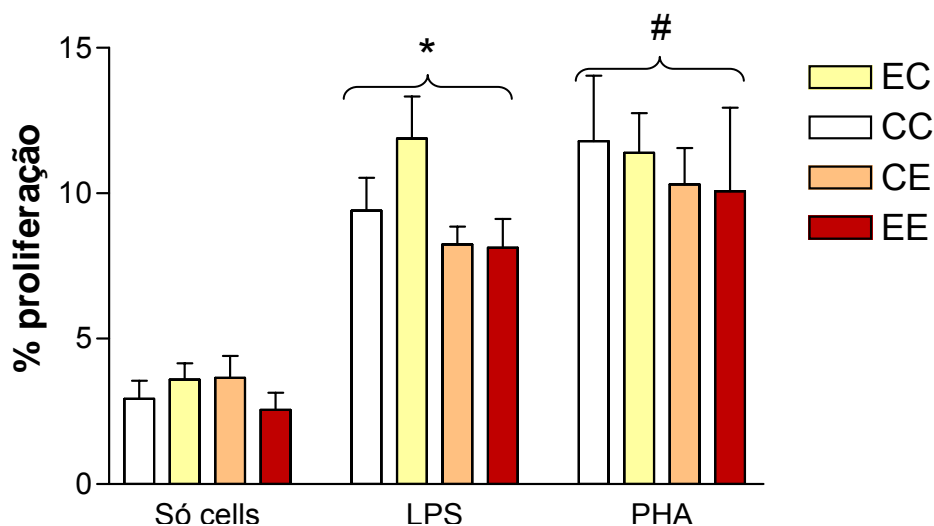


Figura 18 – Cultura de esplenócitos evidenciando os percentuais de proliferação frente aos diferentes mitógenos.

* p<0,001 em relação às células não estimuladas com mitógeno, sem diferenças entre os grupos;

p<0,05 em relação às células não estimuladas com mitógeno, sem diferenças entre os grupos.

No entanto, como se observa na **Tabela 14** e na **Figura 18**, não foram encontradas diferenças significantes entre os grupos de estudo ($p > 0,05$; em todos os experimentos relatados a seguir, os resultados têm como variáveis estatísticas: $F = 16,843$ para “Somente células”; $F = 20,530$ para “LPS” e $F = 11,586$ para “PHA”; $df = 15,128$ para todos os grupos).

Resultados interessantes, nesta mesma linha, foram aqueles que demonstraram ser a NE *per se* na dose 10^{-3} M (mM), capaz de induzir a proliferação dos esplenócitos. Inclusive, a adição de NE nesta concentração foi capaz de modular o deslocamento das células no *dot plot* indicando maior tamanho e complexidade das mesmas (ou seja, células imaturas), da mesma forma como mostrou-se previamente com a adição apenas dos mitógenos LPS e PHA. Tal achado ocorreu em todos os grupos. Ainda, a adição desta dose de NE foi capaz, *per se*, de aumentar intensamente o tamanho dos picos celulares nos histogramas de proliferação, bem como de deslocá-los à esquerda, de forma mais proeminente que àquela visualizada apenas com a utilização dos mitógenos LPS e PHA.

Já, na presença dos mitógenos, a NE parece atuar como estímulo sinérgico. A **Figura 19** ilustra estas informações.

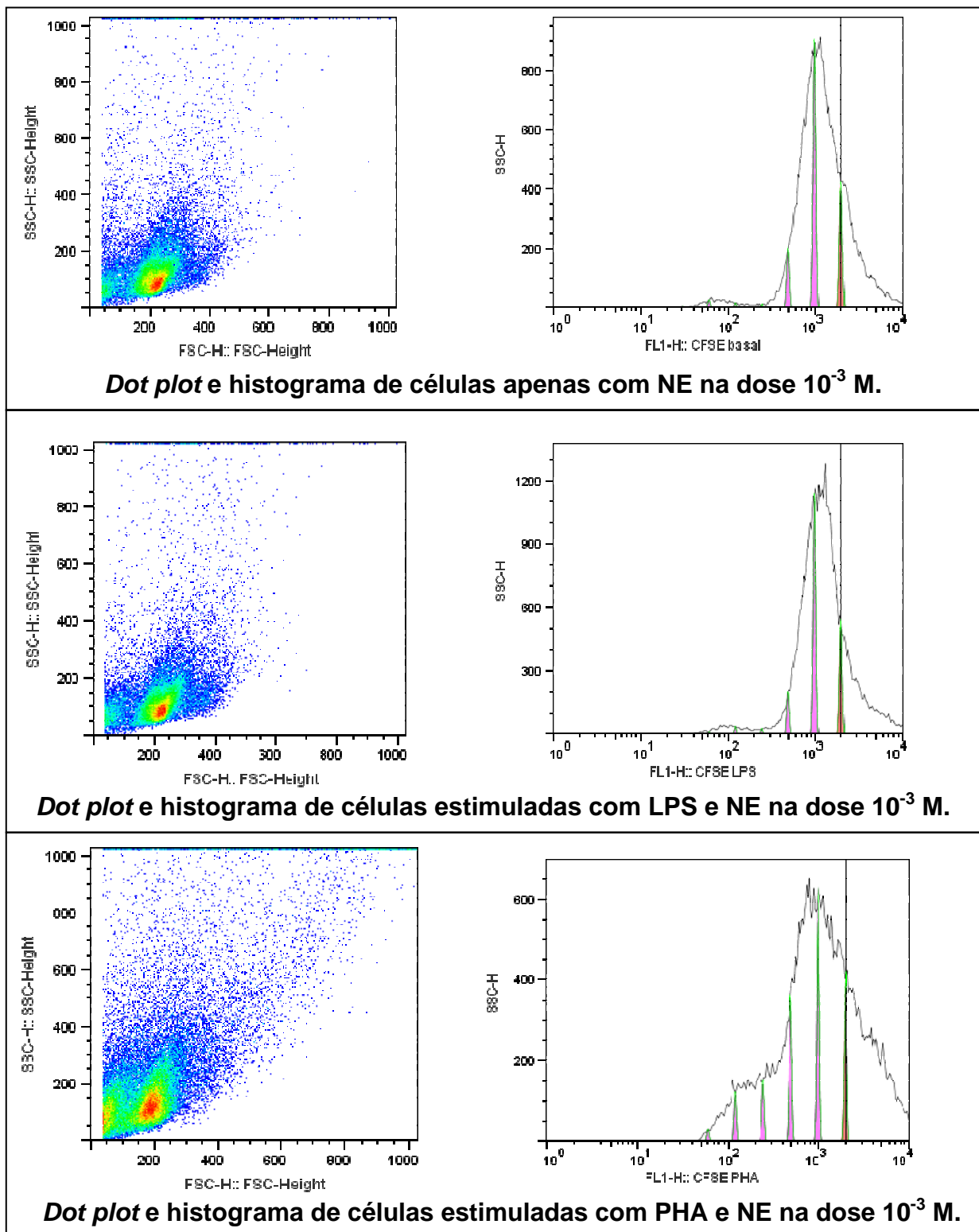


Figura 19 – *Dot plots* e histogramas de animais controles, ilustrando os efeitos da aplicação de NE na concentração 10^{-3} M. Note o deslocamento dos *dot plots*, pelo aumento da relação tamanho x granulosidade (FSC x SSC), indicativo de proliferação pela presença de células mais imaturas (blastos e pró-linfócitos). Nos histogramas, há aumento dos picos e deslocamento para esquerda, denotando que o fluorocromo empregado (CFSE) diminuiu sua concentração (ou seja, sofreu progressão geométrica inversa por sua divisão às células-filhas).

Os valores referentes a estes resultados e aqueles referentes às demais doses de NE empregadas *per se* no experimento, podem ser observados na **Tabela 15** e encontram-se ilustrados na **Figura 20**.

Tabela 15 – Percentuais de proliferação dos esplenócitos sem adição de mitógenos, nas doses-teste de NE.

Parâmetro	Grupo ¹			
	CC	EC	CE	EE
Somente células	2,93±0,63	3,59±0,57	3,66±0,74	2,56±0,59
Células+ NE 10 ⁻³ M	24,29±3,3*	29,50±5,37*	26,54±4,07*	29,60±5,45*
Células+ NE 10 ⁻⁶ M	2,62±0,58	4,08±0,47	2,37±0,41	2,42±0,36
Células+ NE 10 ⁻¹² M	2,70±1,59	3,48±0,95	2,50±1,08	2,54±0,88

Os resultados representam a média ± o erro padrão da média (SEM).

(1) n= 9 animais por grupo em todos os grupos;

*p< 0,01 em relação às demais doses e às células não estimuladas com NE; sem diferenças entre os grupos.

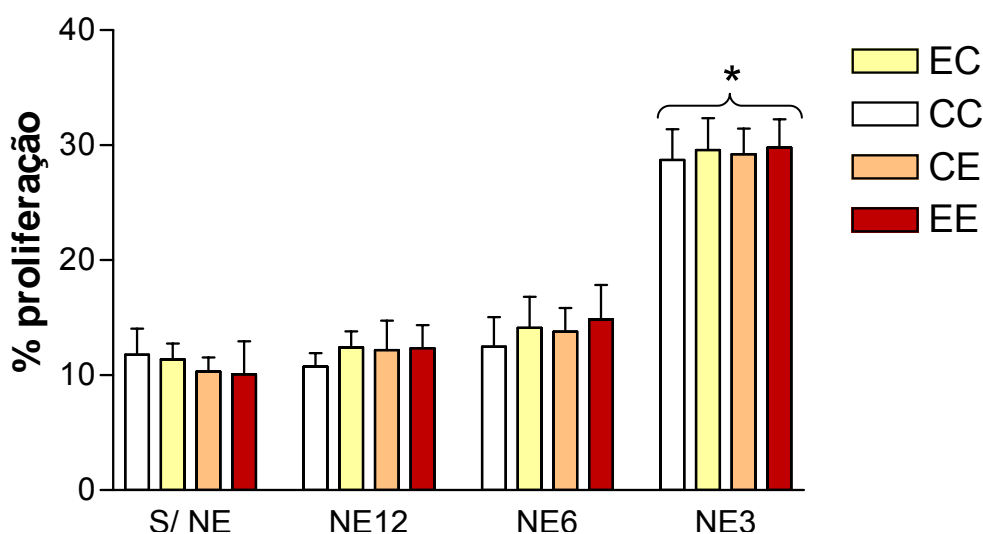


Figura 20 – Cultura de esplenócitos sem adição de mitógeno, com as doses de NE testadas.

* p<0,001 em relação às demais doses de NE ou sem adição desta, mas sem diferenças entre os grupos.

Mais uma vez, não foram encontradas diferenças entre os grupos (p>0,05).

Como já discorrido previamente, não apenas o mitógeno indutor de proliferação seletiva das células B, o LPS, foi efetivo, como também a adição de NE na dose 10⁻³ M sugere que o fármaco atue de forma sinérgica sobre o mitógeno. A análise

estatística realizada pelo teste ANOVA seguida do pós-teste de Tukey-Kramer indicou um aumento significativo ($p < 0,001$) do percentual de mitoses após a adição de NE em sua maior dose testada em relação às demais ou, ainda, em relação às células em que NE não foi adicionada ao meio de cultura. Tais dados estão detalhados na **Tabela 16** e são ilustrados na **Figura 21**.

Tabela 16 – Percentuais de proliferação dos esplenócitos à adição de LPS, nas doses-teste de NE.

Parâmetro	Grupo ¹			
	CC	EC	CE	EE
Células+ LPS	9,41±1,12	11,88±1,45	8,24±0,62	8,13±0,99
Células+ LPS+ NE 10⁻³ M	29,69±3,75*	27,85±5,09*	26,89±4,89*	33,51±4,21*
Células+ LPS+ NE 10⁻⁶ M	9,95±1,27	12,60±1,66	6,98±0,30	7,23±0,47
Células+ LPS+ NE 10⁻¹² M	8,33±1,05	9,87±1,09	8,31±0,60	7,97±1,02

Os resultados representam a média ± o erro padrão da média (SEM).

(1) n= 9 animais por grupo em todos os grupos;

* $p < 0,001$ em relação às demais doses de NE ou sem adição desta, mas sem diferenças entre os grupos.

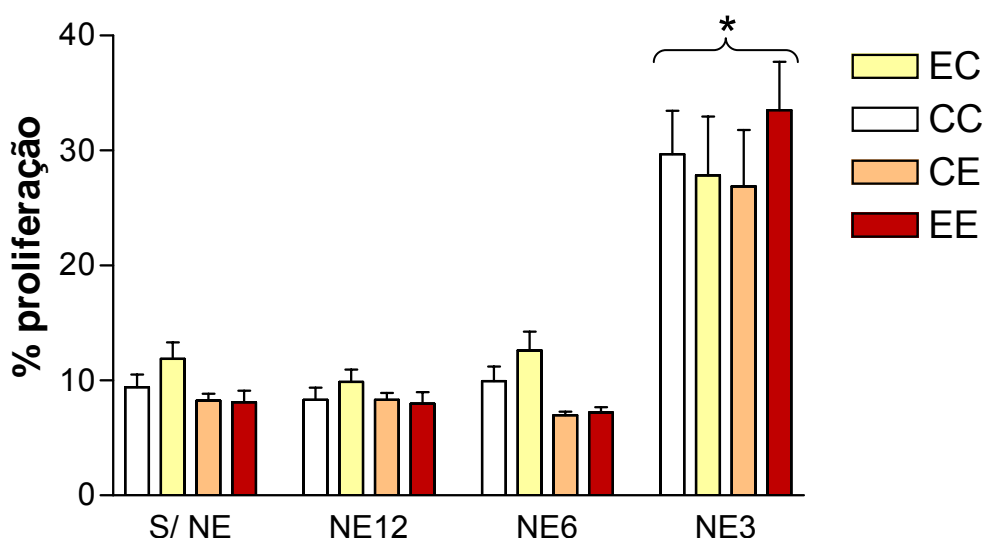


Figura 21 – Cultura de esplenócitos na adição do mitógeno LPS, com as doses de NE testadas.

* $p < 0,001$ em relação às demais doses de NE ou sem adição desta, mas sem diferenças entre os grupos.

No entanto, também aqui, diferenças estatisticamente não foram encontradas nas comparações entre os grupos ($p > 0,01$).

Da mesma forma que obtivemos para a NE empregada sem a adição de mitógenos e com o estímulo de células B, apenas a dose de 10^{-3} M de NE foi capaz de modular a amplificação do estímulo mitogênico da PHA, mitógeno específico para células T. Estes dados estão detalhados na **Tabela 17** e são ilustrados pela **Figura 22**.

Tabela 17 – Percentuais de proliferação dos esplenócitos à adição de PHA, nas doses-teste de NE.

Parâmetro	Grupo ¹			
	CC	EC	CE	EE
Células+ PHA	11,79±2,25	11,40±1,35	10,31±1,24	10,07±2,87
Células+ PHA+ NE 10^{-3} M	28,73±2,64*	29,58±2,76*	29,22±2,22*	29,80±2,45*
Células+ PHA+ NE 10^{-6} M	12,48±2,56	14,10±2,72	13,78±2,07	14,85±3,01
Células+ PHA+ NE 10^{-12} M	10,74±1,18	12,43±1,39	12,20±2,54	12,35±2,01

Os resultados representam a média \pm o erro padrão da média (SEM).

(1) n= 9 animais por grupo em todos os grupos.

* $p < 0,001$ em relação às demais doses de NE ou sem adição desta, mas sem diferenças entre os grupos.

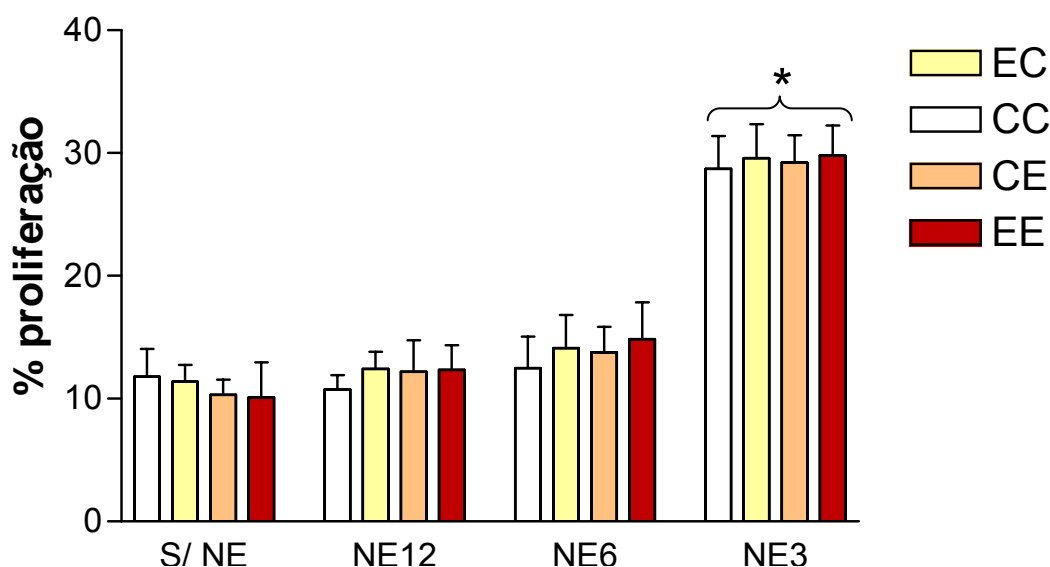


Figura 22 – Cultura de esplenócitos na adição do mitógeno PHA, com as doses de NE testadas.

* $p < 0,001$ em relação às demais doses de NE ou sem adição desta, mas sem diferenças entre os grupos.

6.10 EXPERIMENTO 10: Validação do “estresse do metrô de NI”

Foram utilizados 18 camundongos da linhagem *Swiss*, machos, com 2 meses de idade, provenientes do biotério conforme condições previamente descritas, sendo alocados aleatoriamente em 3 grupos de 6 animais cada: controle (não estressado) e estressados com análises realizadas imediatamente após a exposição ao estressor (0h) e 1h após. Os animais dos grupos estressados foram submetidos a uma sessão aguda (2h) do “estresse do metrô de NI” (restrição de movimentos concomitante com agitação contínua – 2 rotações/segundo). De todos os grupos, após eutanásia por decapitação, avaliou-se o leucograma (total e diferencial), bem como contagem dos esplenócitos totais, conforme previamente descrito (item 4.4).

Como resultado, a contagem total dos leucócitos circulantes apresentou-se significativamente diminuída em os grupos expostos ao estressor (0h e 1h após a exposição)($F=10,804$; $df=2,15$; $p<0,001$), como demonstrado pela **Tabela 18** e pela **Figura 23**.

Tabela 18 – Efeitos da exposição aguda (2h) ao “estresse do metrô de NY” (restrição de movimentos concomitante com o *shaking*), avaliado imediatamente após (0h) e 1h após o estresse, sobre o número absoluto de leucócitos circulantes no sangue periférico.

	Grupo		
	C ¹ n=6	E-0h ² n=6	E-1h ³ n=6
Leucócitos (x 10 ⁶ cels/ mL)	7,15±0,71	4,53±0,41*	3,96±0,36*

Os dados representam a média ± erro padrão da média (SEM).

¹C= controle, não estressado; ²E-0h = estressado por 2h, avaliado imediatamente (0h) após a exposição ao estressor; ³C-1h = estressado por 2h, avaliado 1h após a exposição ao estressor.

* $p<0,001$ em relação ao grupo controle.

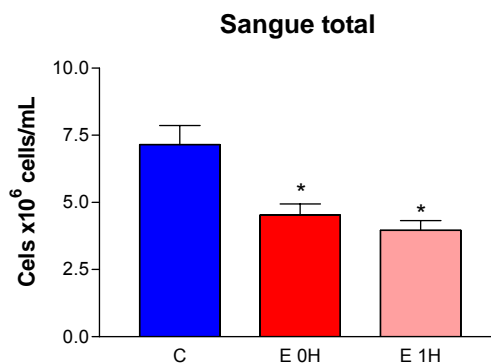


Figura 23 – Efeitos da exposição aguda (2h) ao “estresse do metrô de NY” (restrição de movimentos concomitante com o *shaking*), avaliado imediatamente após (0h) e 1h após o estresse, sobre o número absoluto de leucócitos circulantes no sangue periférico.

* $p<0,001$ em relação ao grupo controle.

A diminuição total do leucograma dos animais estressados, refletiu-se em alteração das contagens diferenciais das células. Contudo, apenas o número de linfócitos apresentou-se diminuído, sendo a redistribuição destas células para outros compartimentos imunes, a provável responsável pelo decréscimo do leucograma absoluto. Logo, como reflexo da emigração dos linfócitos do sangue periférico dos animais submetidos ao estresse, os valores relativos de neutrófilos e monócitos apresentaram-se aumentados (linfócitos: $F=34,666$; $p<0,001$; neutrófilos: $F=34,666$; $p<0,0001$; bastonetes: $F=7,424$; $p<0,005$ para E-0h e $p>0,05$ para E-1h; monócitos: $F=10,206$; $p<0,001$; eosinófilos: $F= 0,833$; $p>0,05$; basófilos: $F= 0,238$; $p>0,05$; $df= 2,15$ para todos os subtipos de leucócitos). Dados, estes, apresentados na **Tabela 19** e na **Figura 24**.

Tabela 19 – Efeitos da exposição aguda (2h) ao “estresse do metrô de NY” (restrição de movimentos concomitante com o *shaking*), avaliado imediatamente após (0h) e 1h após o estresse, sobre o leucograma diferencial, a partir do sangue periférico.

Subtipo de leucócito (%)	Grupo		
	C ¹ n=6	E-0h ² n=6	E-1h ³ n=6
Linfócitos	73,16±0,79	56,00±2,79*	52,66±1,43*
Neutrófilos	18,00±0,73	32,33±4,33 #	33,50±1,94 #
Bastonetes	1,66±0,33	2,83±0,16*	1,66±0,21
Monócitos	5,50±0,88	10,83±0,79*	11,16±1,25*
Eosinófilos	1,66±0,30	1,33±0,21	0,83±0,30
Basófilos	0,33±0,21	0,33±0,21	0,16±0,16

Os dados representam a média ± erro padrão da média (SEM).

¹C= controle, não estressado; ²E-0h = estressado por 2h, avaliado imediatamente (0h) após a exposição ao estressor; ³E-1h = estressado por 2h, avaliado 1h após a exposição ao estressor.

* $p<0,001$ em relação ao grupo controle.

$p<0,0001$ em relação ao grupo controle.

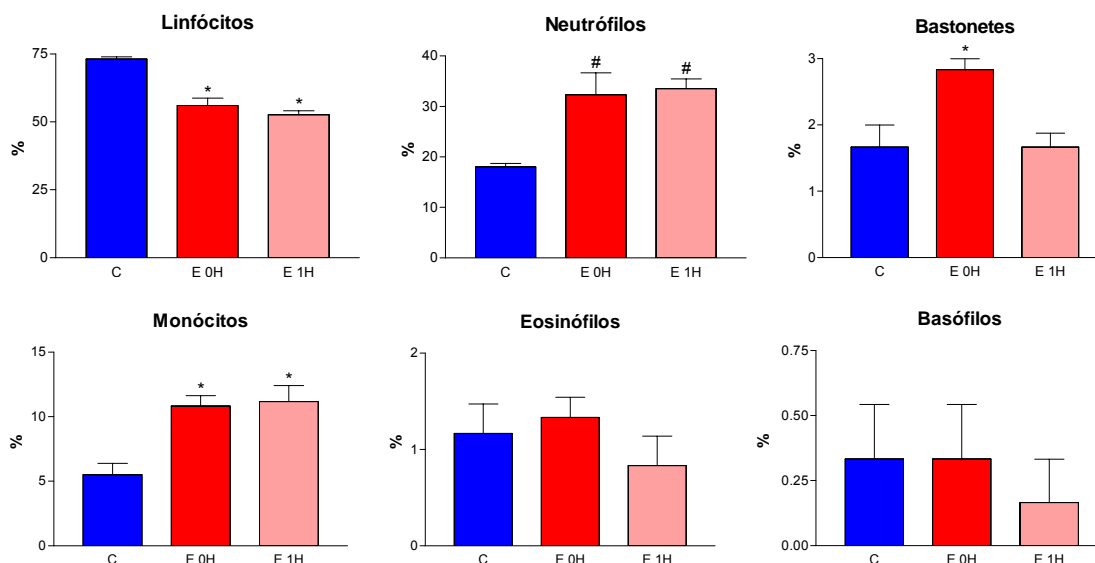


Figura 24 – Efeitos da exposição aguda (2h) ao “estresse do metrô de NY” (restrição de movimentos concomitante com o *shaking*), avaliado imediatamente após (0h) e 1h após o estresse, sobre o leucograma diferencial, a partir do sangue periférico.

* $p < 0,001$ em relação ao grupo controle.

$p < 0,0001$ em relação ao grupo controle.

Pela verificação de diferenças nas contagens totais e diferenciais dos leucócitos circulantes entre os grupos, realizamos ainda no dia do experimento a verificação da distribuição fenotípica dos linfócitos por citometria de fluxo, como previamente descrito. Neste experimento, observamos que, não foram apenas os linfócitos os responsáveis por estes dados reportados, mas, dentre os linfócitos ainda, especificamente as células do tipo B (CD19), apresentaram uma diminuição estatisticamente significativa, no grupo estressado 0h. Deste modo, a migração dos linfócitos B, apenas no grupo estressado 0h, refletiu-se no aumento significativo dos linfócitos T citotóxicos (CD8); não havendo, porém alteração quando considerados os linfócitos T auxiliares (CD3-CD4) (linfócito B: $F=4,225$; $p < 0,05$; linfócito T citotóxico: $F=4,492$; $p < 0,05$; linfócito T auxiliar: $F=0,214$; $p > 0,05$; $df=2,15$ em todos os parâmetros). Estes resultados encontram-se na **Tabela 20** e na **Figura 25**.

Tabela 20 – Efeitos da exposição aguda (2h) ao “estresse do metrô de NY” (restrição de movimentos concomitante com o *shaking*), avaliado imediatamente após (0h) e 1h após o estresse, sobre os subtipos de linfócitos do sangue periférico.

Subtipo de linfócito (%)	Grupo		
	C ¹ n=6	E-0h ² n=6	E-1h ³ n=6
Linfócitos B (CD19)	48,70±2,60	31,49±5,28*	47,52±5,57
Linfócitos T auxiliares (CD3-CD4)	24,11±2,87	27,18±4,86	26,68±6,14
Linfócitos T citotóxicos (CD8)	14,86±0,70	19,93±1,53*	14,45±1,68

Os dados representam a média ± erro padrão da média (SEM).

¹C= controle, não estressado; ²E-0h = estressado por 2h, avaliado imediatamente (0h) após a exposição ao estressor; ³C-1h = estressado por 2h, avaliado 1h após a exposição ao estressor.

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

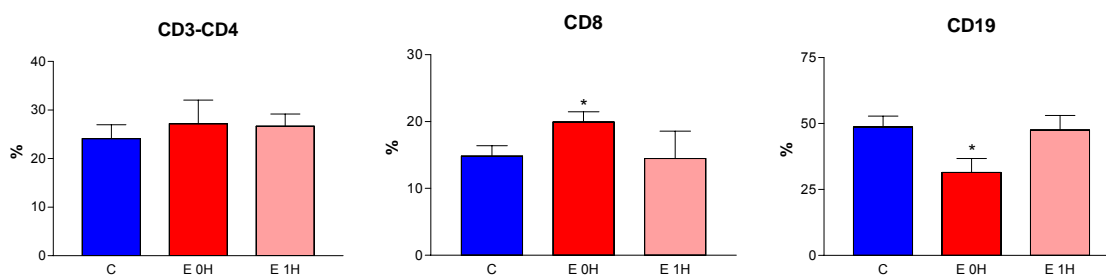


Figura 25 – Efeitos da exposição aguda (2h) ao “estresse do metrô de NY” (restrição de movimentos concomitante com o *shaking*), avaliado imediatamente após (0h) e 1h após o estresse, sobre o perfil de subpopulações de linfócitos do sangue periférico fenotipados por citometria de fluxo.

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

Considerando-se o papel do medula óssea como órgão imune, averiguamos se as modificações observadas no sangue periférico, estavam também aí presentes. Observamos um significativo aumento nas contagens totais das células hematopoéticas nos grupos estressados (F=6,409; df=2,15; p<0,009). Dados exibidos na **Tabela 21** e na **Figura 26**.

Tabela 21 – Efeitos da exposição aguda (2h) ao “estresse do metrô de NY” (restrição de movimentos concomitante com o *shaking*), avaliado imediatamente após (0h) e 1h após o estresse, sobre a contagem total das células hematopoéticas.

Células hematopoéticas (x 10 ⁶ / mL)	Grupo		
	C ¹ n=6	E-0h ² n=6	E-1h ³ n=6
	4,43±0,29	5,83±0,19*	5,56±0,37*

Os dados representam a média ± erro padrão da média (SEM).

¹C= controle, não estressado; ²E-0h = estressado por 2h, avaliado imediatamente (0h) após a exposição ao estressor; ³C-1h = estressado por 2h, avaliado 1h após a exposição ao estressor.

* p<0,009 em relação ao grupo controle.

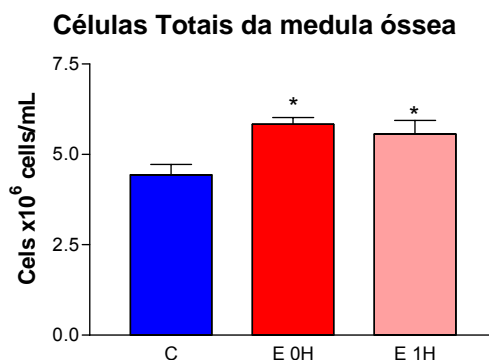


Figura 26 – Efeitos da exposição aguda (2h) ao “estresse do metrô de NY” (restrição de movimentos concomitante com o *shaking*), avaliado imediatamente após (0h) e 1h após o estresse, sobre a contagem total de células medulares.

* $p < 0,009$ em relação ao grupo controle.

6.11 EXPERIMENTO 11: Avaliação dos efeitos do estresse sobre a inflamação alérgica pulmonar (OVA-induzida)

Foram utilizados 48 camundongos *Swiss*, machos, divididos inicialmente como estressados pré-natalmente ou não. Aos 60 dias de vida (PND60), estes animais foram re-divididos como estressados ou não pós-natalmente, originando os 4 grupos de trabalho: CC, EC, CE e EE. Baseados no teste piloto do “estresse do metrô de NI”, este foi o estressor pós-natal empregado, sendo os animais imunizados à OVA imediatamente após (0h) a retirada do aparato estressor. Os animais dos grupos CC e EC, foram imunizados sem qualquer outra intercorrência prévia. Uma semana após a imunização primária (PND67), todos os animais receberam reforço de imunização (*booster*) com a mesma solução de OVA e, iniciando no PND74, os animais foram submetidos por 3 dias consecutivos a uma sessão de desafio inalatório de OVA. Após 24h do último desafio, com prévia anestesia com quetamina e xilazina, coletou-se: sangue por punção cardíaca (leucograma total e diferencial), lobo pulmonar inferior direito (histopatológico qualitativo), lavado broncoalveolar (BAL; contagem total e diferencial) e lavado medular femural (células hematopoéticas totais) (item 4.8).

O grupo denominado “Basal” corresponde aos animais não induzidos à inflamação alérgica pulmonar OVA-induzida, cujos mesmos parâmetros foram obtidos.

- **Lavado broncoalveolar (BAL) – contagens total e diferencial dos leucócitos**

A análise dos dados do número total de leucócitos recuperados no lavado broncoalveolar dos animais, analisada estatisticamente por ANOVA de uma via bicaudal seguida do pós-teste de Tukey, revelou que os animais do grupo controle apresentaram uma maior migração celular para o pulmão, tanto em relação aos animais não alérgicos (basais) quanto em relação aos animais dos grupos experimentais OVA-sensibilizados ($F= 25,554$; $df=4,49$; $p<0,0001$ quando comparados os animais do grupo CC com os demais; $n=12$ animais/grupos experimentais; $n=6$ animais/grupo Basal). Estes resultados são demonstrados pela **Tabela 22** e pela **Figura 27**.

Tabela 22 – Efeitos do estresse pré e/ou pós-natal sobre o total de leucócitos recuperados no lavado broncoalveolar (BAL).

	Grupo				
	CC ¹ n=12	EC ² n=12	CE ³ n=12	EE ⁴ n=12	Basal ⁵ n=6
Leucócitos (x10⁴céls/mL)	21,29±1,42*	8,56±0,71#	10,46±1,36#	8,46±1,04#	6,75±0,36

Os dados representam a média ± erro padrão da média (SEM).

¹ CC = animais não estressados nem pré nem pós-natalmente; ² EC = animais estressados pré-natalmente; ³ CE = animais estressados pós-natalmente; ⁴ EE = animais estressados pré e pós-natalmente; ⁵ BASAL = animais controles não estressados nem com inflamação alérgica pulmonar OVA-induzida.

* $p<0,0001$ em relação ao grupo Basal;

$p<0,0001$ em relação ao grupo CC.

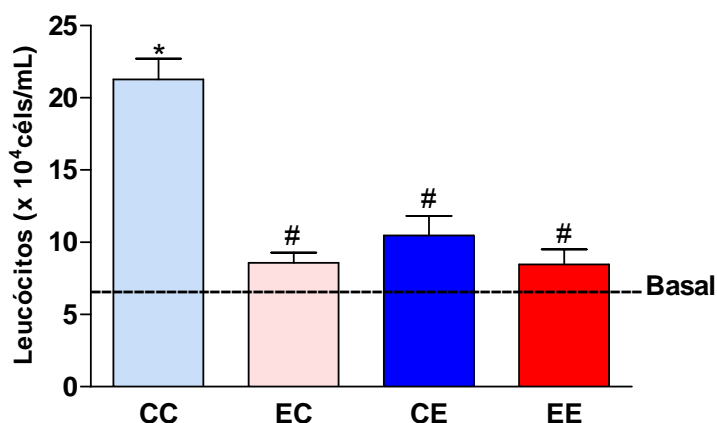


Figura 27. Efeitos do estresse pré e/ou pós-natal sobre o total de leucócitos recuperados no lavado broncoalveolar (BAL).

* $p<0,0001$ em relação ao grupo Basal;

$p<0,0001$ em relação ao grupo CC.

Esta expressiva contagem de leucócitos presentes no BAL dos animais do grupo CC mostrou-se, de fato, decorrente da migração de células tipicamente inflamatórias: eosinófilos e neutrófilos, quando comparados tanto com grupo basal quanto com grupos experimentais (ANOVA seguida de Tukey; Eosinófilos: $F=18,109$; $df=4,30$; Neutrófilos: $F=16,394$; $df=4,25$; ambos $p<0,001$ quando comparados os animais do CC com os demais.

Quando consideramos os macrófagos, apenas o grupo EC apresentou-se significativamente diminuído em relação aos animais do grupo CC (Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn; $KW=12,786$; $p<0,01$). Já para linfócitos, ambos os grupos EC e EE apresentaram-se diminuídos em relação aos animais do grupo CC (Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn; $KW=16,399$; $p<0,01$). Além disto, a análise de macrófagos e de linfócitos evidenciou que nenhum grupo diferiu significativamente dos animais do grupo basal.

Estes resultados são demonstrados pela **Tabela 23** e pela **Figura 28**.

Tabela 23 – Efeitos do estresse pré e/ou pós-natal sobre o diferencial de leucócitos recuperados no lavado broncoalveolar (BAL).

Leucócitos ($\times 10^4$ céls/mL)	Grupo				
	CC ¹ n=12	EC ² n=12	CE ³ n=12	EE ⁴ n=12	Basal ¹⁵ n=6
Eosinófilos	1,96 \pm 0,44*	0,48 \pm 0,07#	0,25 \pm 0,07#	0,40 \pm 0,02#	0,00 \pm 0,00
Neutrófilos	3,20 \pm 0,47*	1,20 \pm 0,15#	1,02 \pm 1,27#	0,99 \pm 0,14#	0,30 \pm 0,05
Macrófagos	10,87 \pm 1,83	4,26 \pm 0,50#	5,75 \pm 1,16	6,80 \pm 1,00	5,78 \pm 0,36
Linfócitos	3,75 \pm 0,51	1,95 \pm 0,20#	2,62 \pm 0,61	2,54 \pm 0,12#	1,21 \pm 0,07

Os dados representam a média \pm erro padrão da média (SEM).

¹ CC = animais não estressados nem pré nem pós-natalmente; ² EC = animais estressados pré-natalmente; ³ CE = animais estressados pós-natalmente; ⁴ EE = animais estressados pré e pós-natalmente; ⁵ BASAL = animais controles não estressados nem com inflamação alérgica pulmonar OVA-induzida.

* $p<0,001$ em relação ao grupo Basal;

$p<0,001$ em relação ao grupo CC

Lavado broncoalveolar (BAL) - leucograma diferencial

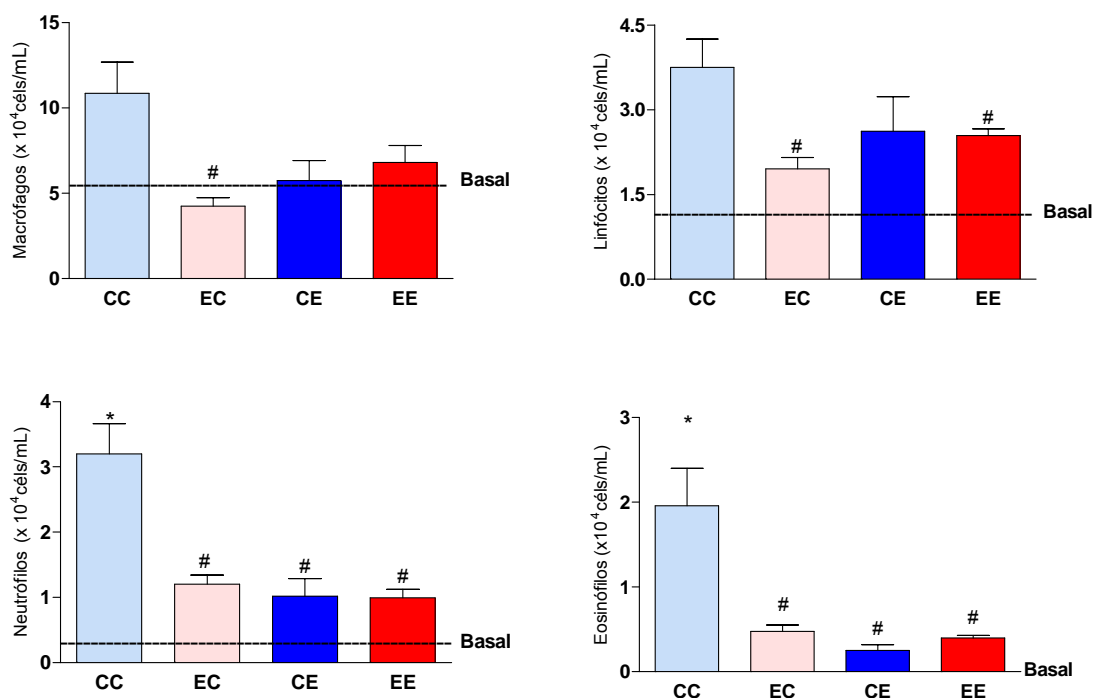


Figura 28. Efeitos do estresse pré e/ou pós-natal sobre o diferencial de leucócitos recuperados no lavado broncoalveolar (BAL).

Já a contagem total de leucócitos sangüíneos refletiu o padrão de migração celular evidenciada no BAL. Neste sentido, os grupos CE e EE apresentaram as maiores contagens de leucócitos, tanto em relação aos animais do grupo CC quanto em relação aos animais do grupo Basal (Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn; KW=19,313; p<0,05).

Estes resultados são demonstrados pela **Tabela 24** e pela **Figura 29**.

Tabela 24 – Efeitos do estresse pré e/ou pós-natal sobre o leucograma total sangüíneo.

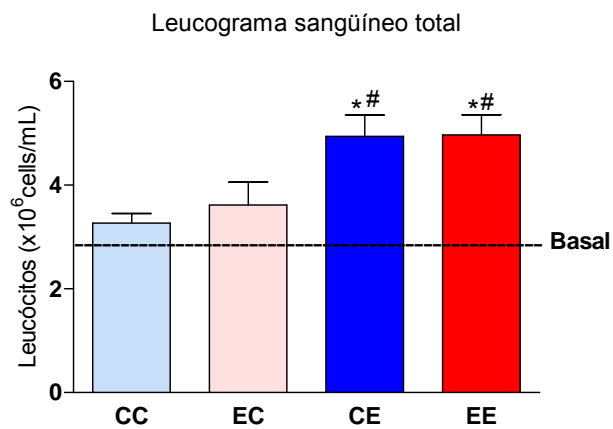
	Grupo				
	CC ¹ n=12	EC ² n=12	CE ³ n=12	EE ⁴ n=12	Basal ⁵ n=6
Leucócitos (x10⁶ céls/mL)	3,27±0,19	3,62±0,44	4,94±0,41*#	4,97±0,39*#	2,88±0,13

Os dados representam a média ± erro padrão da média (SEM).

¹ CC = animais não estressados nem pré nem pós-natalmente; ² EC = animais estressados pré-natalmente; ³ CE = animais estressados pós-natalmente; ⁴ EE = animais estressados pré e pós-natalmente; ⁵ BASAL = animais controles não estressados nem com inflamação alérgica pulmonar OVA-induzida.

* p<0,05 em relação ao grupo Basal;

p<0,05 em relação ao grupo CC.

**Figura 29.** Efeitos do estresse pré e/ou pós-natal sobre o leucograma total sangüíneo.

De fato, encontramos uma correlação direta entre os resultados já reportados (BAL – total e diferencial e, leucograma total) e os resultados do leucograma sangüíneo diferencial. Onde, os animais do grupo CC apresentaram aumento do percentual de neutrófilos (em relação aos animais do grupo Basal e em relação aos animais dos grupos CE e EE) e de eosinófilos (em relação aos animais do grupo Basal e em relação aos animais dos grupos EC e EE); assim como diminuição nas contagens de linfócitos (em relação a todos os demais grupos) (Linfócitos: $F=10,410$; $df=4,39$; $p<0,01$; Neutrófilos: $F=3,572$; $df=4,39$; $p<0,05$; Bastonetes: $KW=6,294$; $p>0,05$; Eosinófilos: $KW=26,815$; $p<0,01$; Basófilos: $F=0,914$; $df=4,40$; $p>0,05$).

Estes dados são mostrados pela **Tabela 25**.

Tabela 25 – Efeitos do estresse pré e/ou pós-natal sobre o leucograma diferencial sangüíneo.

Leucócitos (%)	Grupo				
	CC	EC	CE	EE	Basal
Linfócitos	51,77±3,48*	64,63±2,48#	69,63±1,76#	69,80±1,92#	67,83±1,45
Neutrófilos	30,00±2,83*	25,12±2,64	21,00±1,51#	20,60±1,60#	23,50±1,26
Bastonetes	1,66±0,33	1,43±0,20	1,09±0,37	0,80±0,25	1,00±0,26
Eosinófilos	9,44±0,93*	3,50±0,060#	5,44±0,98*	3,40±0,52#	0,66±0,21
Basófilos	0,22±0,15	0,25±0,16	0,09±0,09	0,00±0,00	0,20±0,20

Os dados representam a média ± erro padrão da média (SEM).

* $p<0,05$ em relação ao grupo Basal;

$p<0,05$ em relação ao grupo CC

A **Figura 30** ilustra estes dados.

Leucograma sangüíneo diferencial

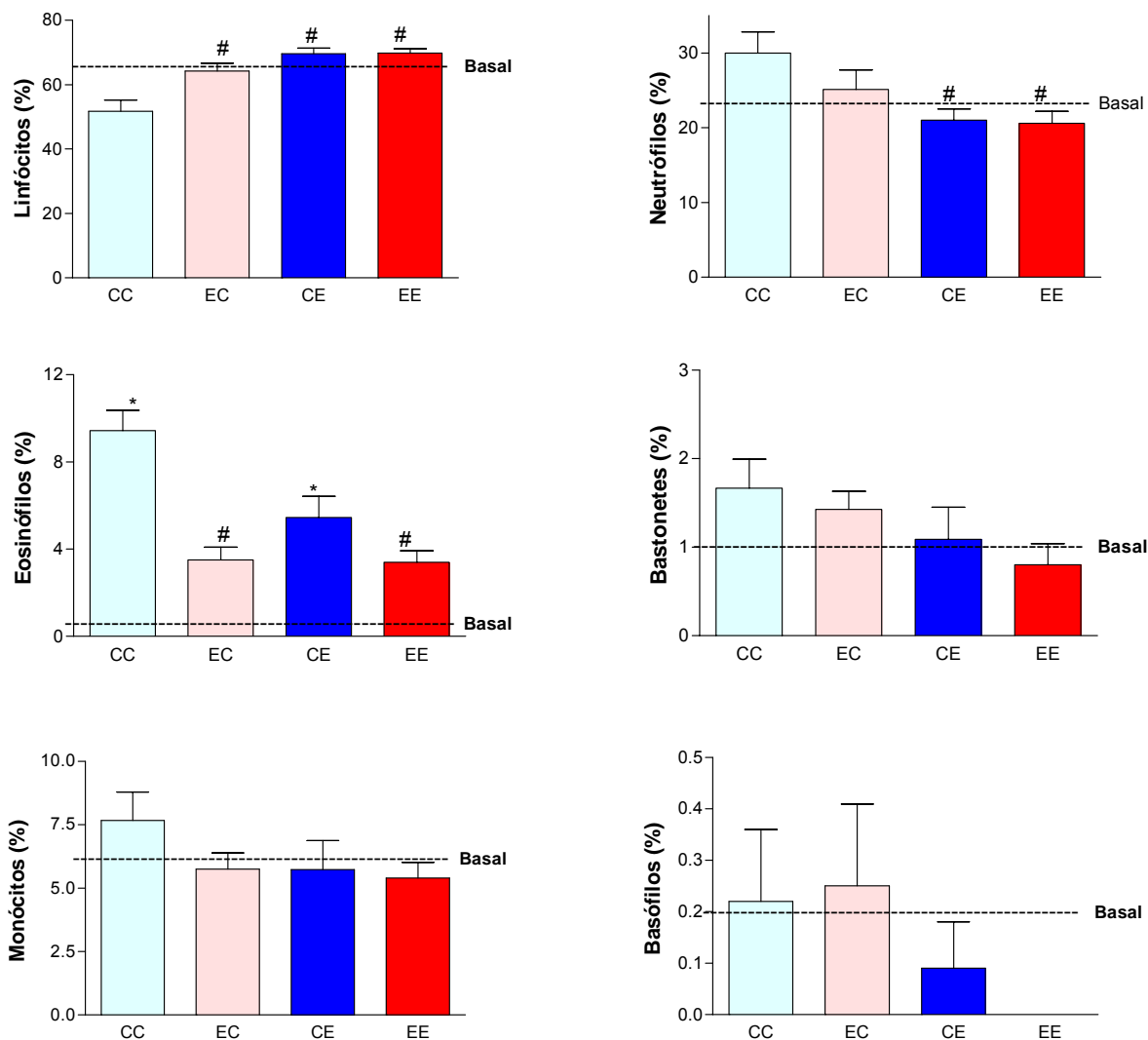


Figura 30. Efeitos do estresse pré e/ou pós-natal sobre o leucograma sangüíneo diferencial (%).

A pergunta seguinte, portanto, visou averiguar se esta redistribuição de leucócitos do sangue para o foco inflamado (pulmão) era igualmente refletida por uma mobilização hematopoética (contagem total de células da medula óssea). De fato, encontramos um aumento significativo do número total de células hematopoéticas em todos os grupos induzidos à inflamação alérgica pulmonar em relação aos animais do grupo Basal. Ainda, parece que, corroborando os dados já descritos do BAL e sangue, os animais do grupo CC liberaram mais células da

medula óssea para o foco inflamatório, o que se explica pela redução estatisticamente significativa quando comparados com os animais dos grupos estressados pré e/ou pós-natalmente ($F=11,670$, $df=4,46$; $p<0,05$). A **Tabela 26** demonstra estes dados.

Tabela 26 – Efeitos do estresse pré e/ou pós-natal sobre a contagem total de células hematopoéticas (medula óssea).

	Grupo				
	CC ¹ n=12	EC ² n=12	CE ³ n=12	EE ⁴ n=12	Basal ⁵ n=6
Células (x10⁶/mL)	31,52±2,99*	53,05±5,39*#	55,95±5,86*#	46,96±4,86*#	10,63±1,20

Os dados representam a média ± erro padrão da média (SEM).

¹ CC = animais não estressados nem pré nem pós-natalmente; ² EC = animais estressados pré-natalmente; ³ CE = animais estressados pós-natalmente; ⁴ EE = animais estressados pré e pós-natalmente; ⁵ BASAL = animais controles não estressados nem com inflamação alérgica pulmonar OVA-induzida.

* $p<0,05$ em relação ao grupo Basal;

$p<0,05$ em relação ao grupo CC.

A **Figura 31** ilustra estes resultados.

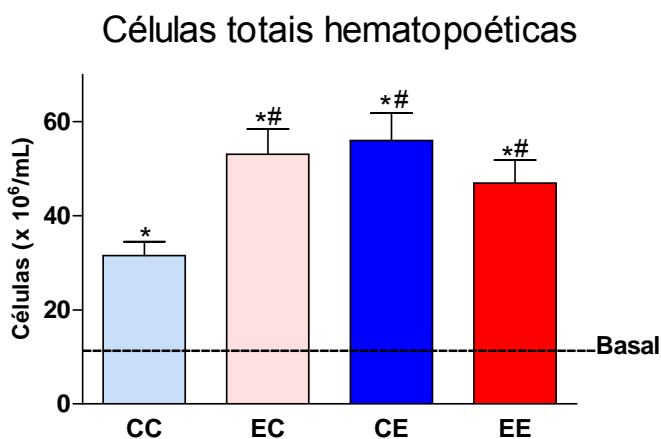


Figura 31. Efeitos do estresse pré e/ou pós-natal sobre a contagem total de células hematopoéticas (medula óssea).

Por fim, após a coleta do BAL, extraiu-se o lobo inferior direito pulmonar. As amostras, depois de fixadas em formaldeído 4%, foram microprocessadas e coradas pelo método de Hematoxilina e Eosina (HE). As lâminas obtidas foram analisadas qualitativamente em microscopia ótica.

De certo modo, pode-se dizer que todos os grupos OVA-inflamados apresentaram um moderado grau de infiltrado celular, especialmente adjacente aos vasos sangüíneos (evidenciando o processo de diapedese) e às estruturas respiratórias propriamente ditas como os alvéolos (local de exposição ao alérgeno). Mais do que isto, verificou-se um expressivo aumento de eosinófilos, o que explicita o perfil inflamatório asmático anafilático (diferentemente de asma LPS-induzida, por exemplo).

Por outro lado, encontramos áreas pulmonares semelhantes às vistas em animais basais. Tais achados, por sua vez, podem refletir características de dispersão de resultados típicas da linhagem murina *Swiss* deste trabalho, em se tratando de uma linhagem não isogênica e/ou; uma certa inabilidade da escolha de desafios inalatórios por câmara de microdispersão de partículas. Ou seja, não temos como quantificar a dose de alérgeno inalada. Ainda, nos abstermos de análises histopatológicas que não o infiltrado imune (como formação de edema, produção de muco, etc), devido à coleta pulmonar ser realizada após a lavagem broncoalveolar (que não modifica histopatologicamente leucócitos infiltrados ao tecido pulmonar mas pode mascarar a presença de muco ou produzir extravasamento semelhante ao evidenciado em casos de edema).

Contudo, via de regra, as fotomicrografias a seguir (**Figuras 32 e 33**) ilustram qualitativamente a eficácia do modelo empregado na indução de asma experimental.

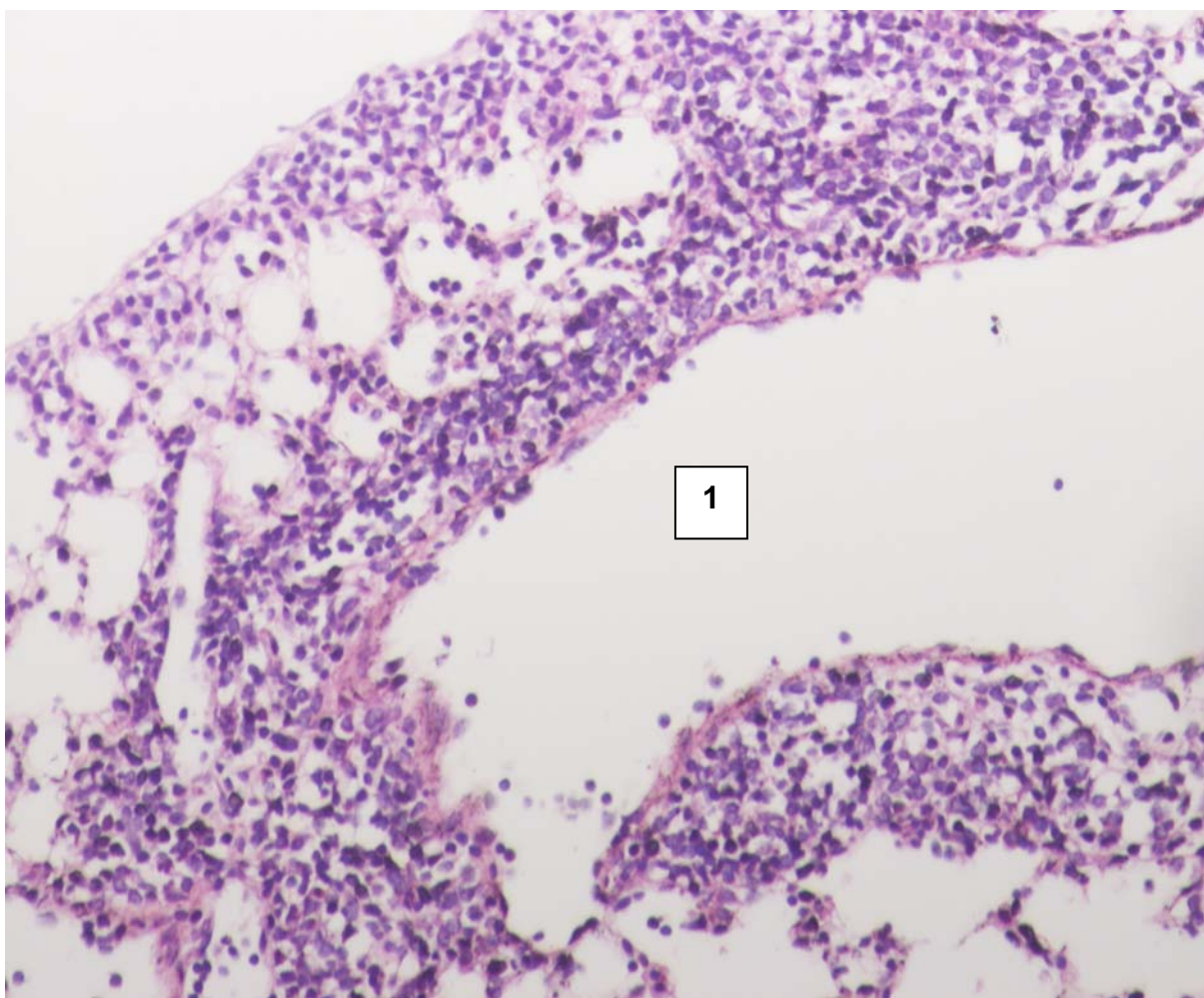


Figura 32. Corte histológico de pulmão (200x – microscopia óptica), onde se evidencia uma árvore brônquica (1) de animal induzido à asma experimental (OVA), com maciça infiltração leucocitária (roxo).443`

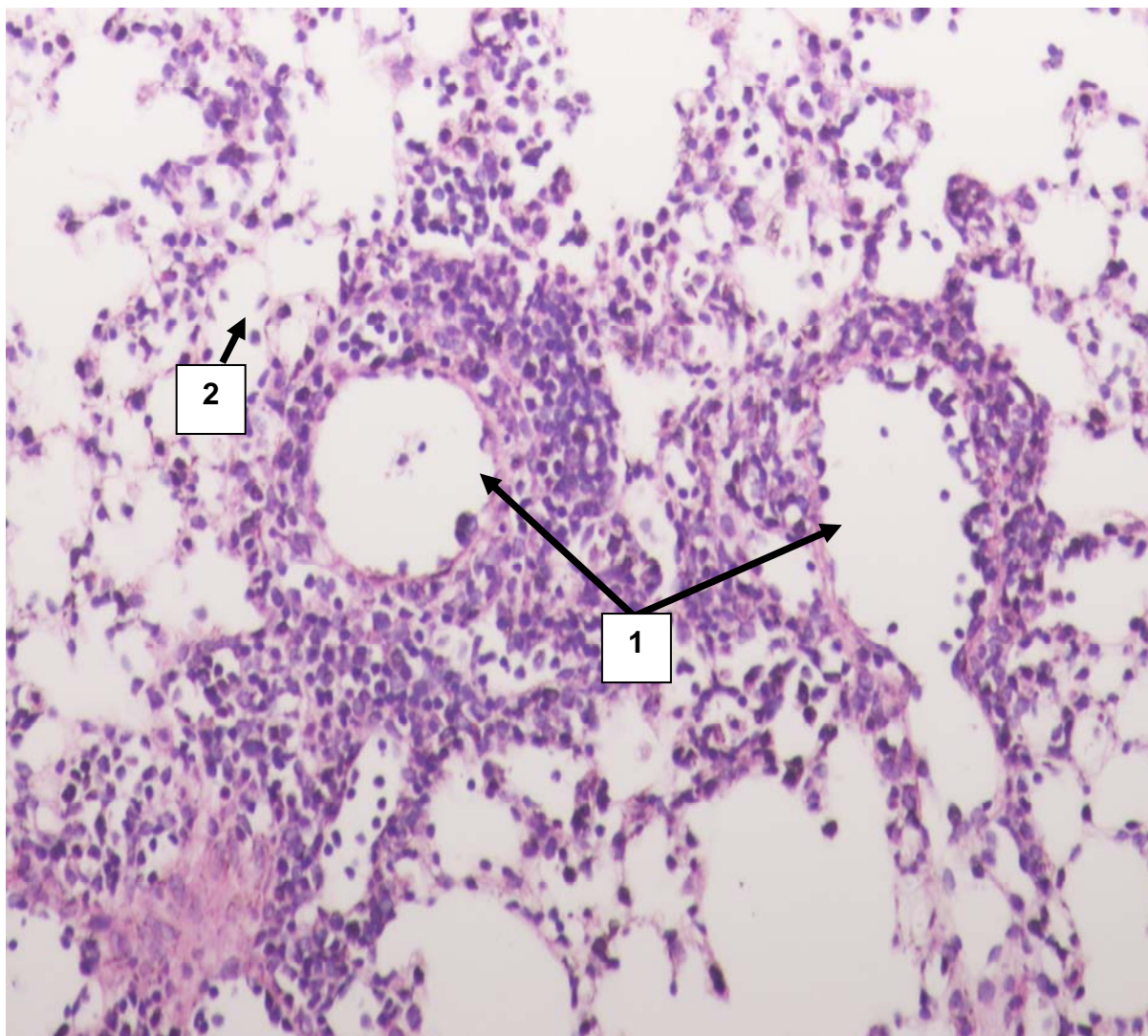


Figura 33 Corte histológico de pulmão (200x – microscopia óptica), onde se evidencia bronquíolos (1) e alvéolos (2) de animal induzido à asma experimental (OVA), com maciça infiltração leucocitária.

A seguir, as fotomicrografias representadas pelas **Figuras 34, 35 e 36**, demonstram a dispersão de resultados, com áreas pulmonares semelhantes à normalidade e outras características do processo inflamatório.

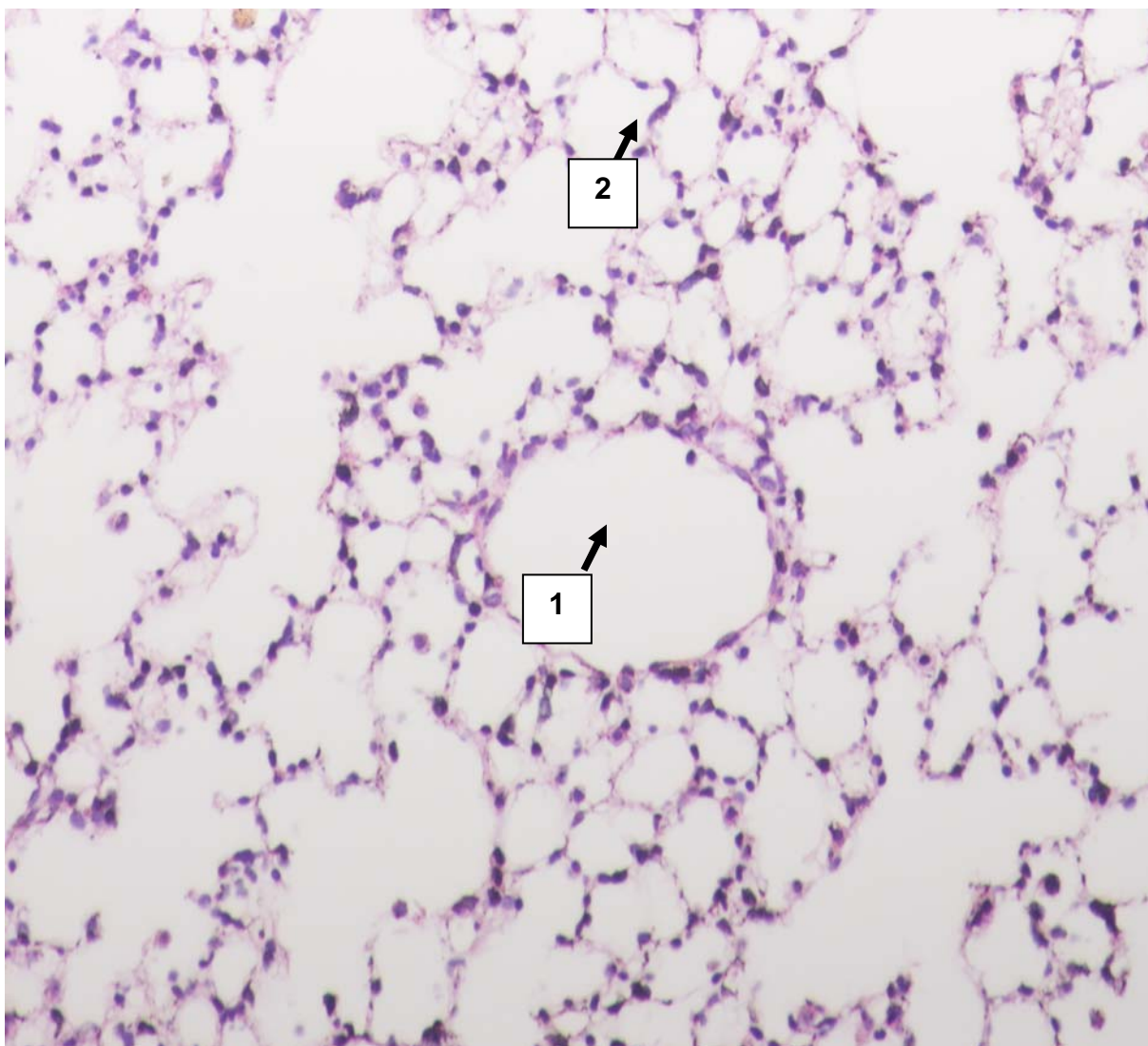


Figura 34. Corte histológico de pulmão (200x – microscopia óptica), onde se evidencia um bronquíolo e alvéolos de animal induzido à asma experimental (OVA), assemelhando-se à normalidade, com discreta infiltração de leucócitos.

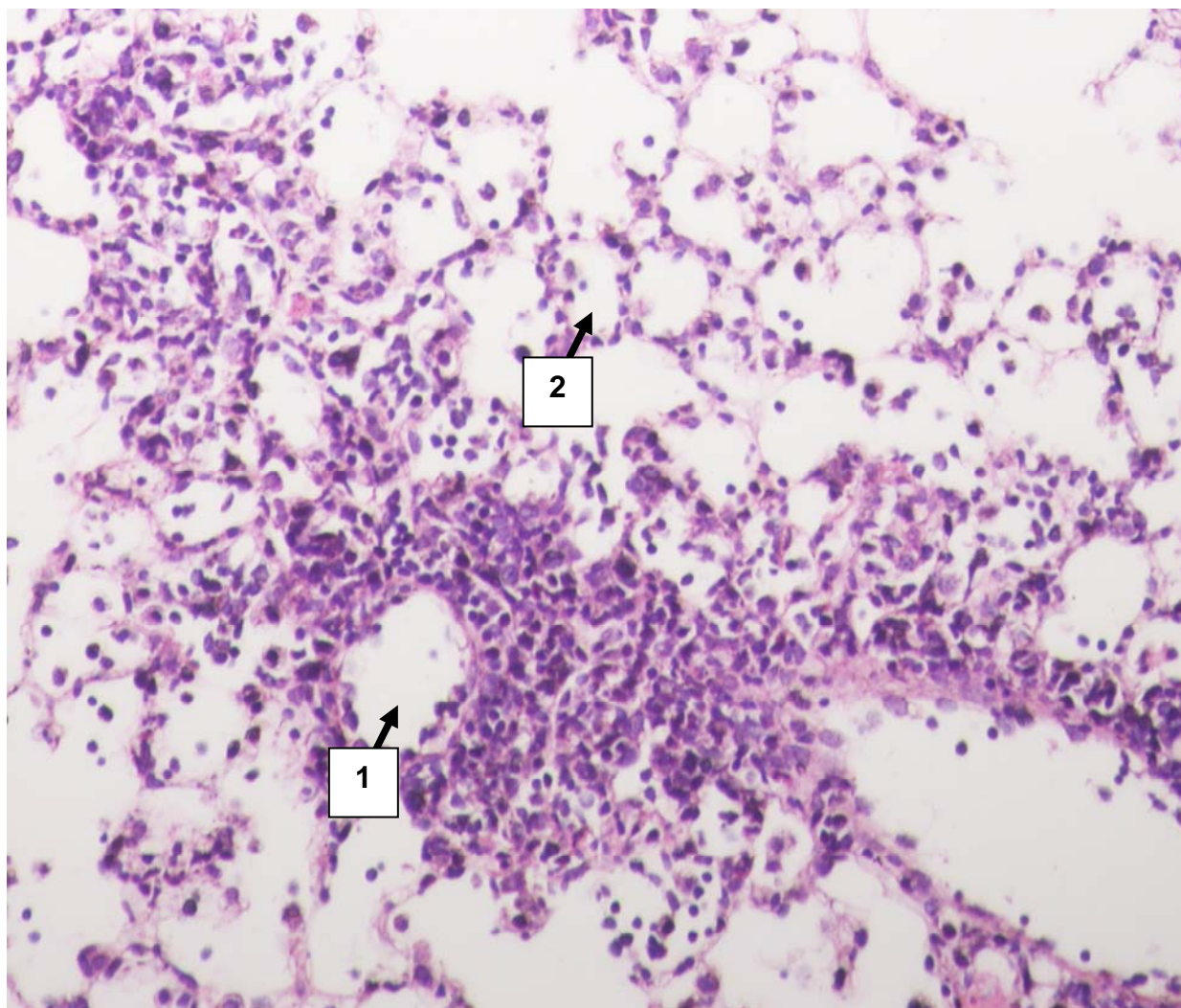


Figura 35. Corte histológico de pulmão (200x – microscopia óptica), onde se evidencia um bronquíolo (1) e alvéolos (2) de animal induzido à asma experimental (OVA), com maciça infiltração de leucócitos.

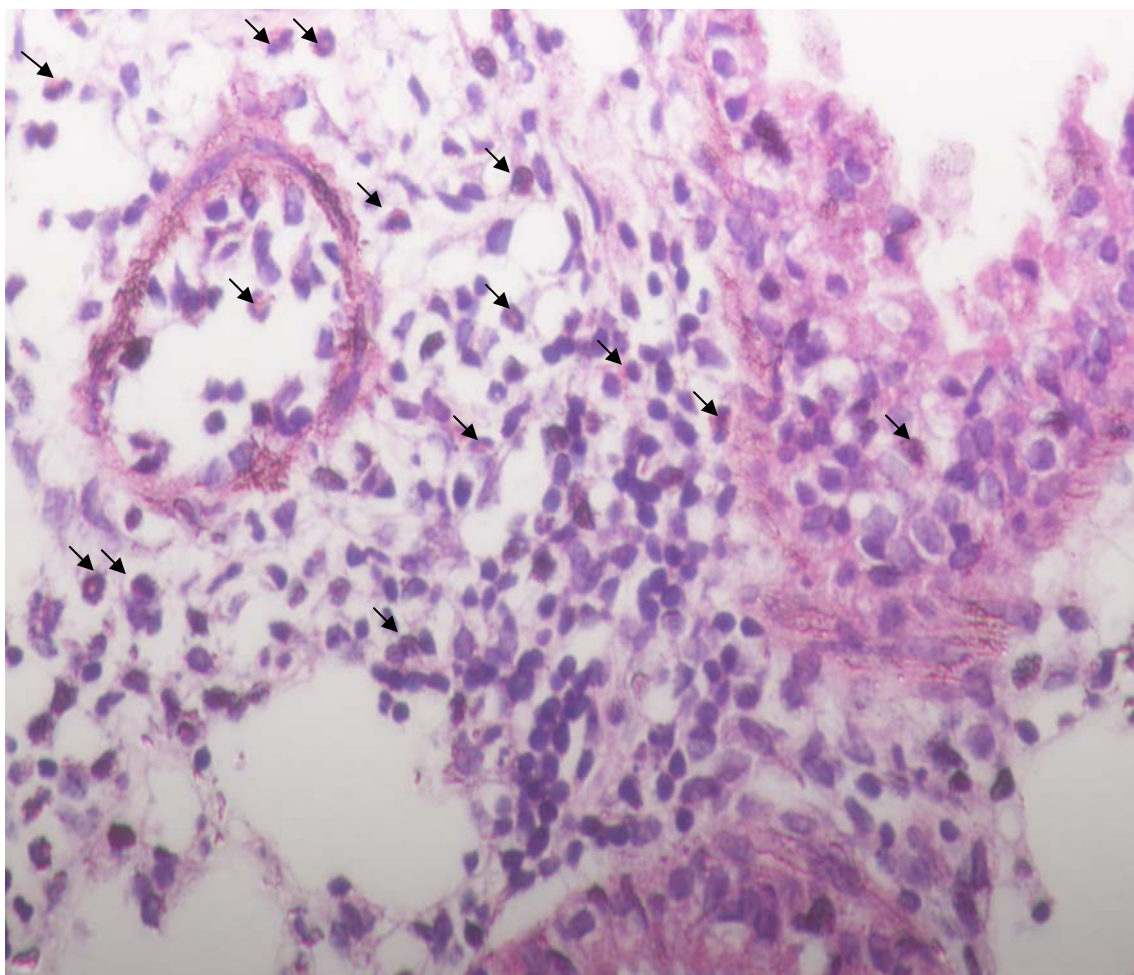


Figura 36. Corte histológico de pulmão (400x – microscopia óptica), de animal induzido à asma experimental (OVA), com maciça infiltração leucocitária, inclusive, nota-se a presença de eosinófilos.

7 DISCUSSÃO

7.1 Avaliações peri-natais

Os resultados das avaliações peri-natais, indicam que a imposição do estressor (*footshock*) no terço final gestacional, foi incapaz de alterar: 1) o consumo de água e ração das gestantes em diferentes períodos de análise; 2) a data de parição; 3) o número de filhotes nascidos ou sua relação macho/fêmea; 4) o peso total das proles; 5) o desenvolvimento físico e reflexológico da prole.

Realizamos a verificação do consumo de água e ração de ambos os grupos (controle e experimental) no período pré-exposição ao estressor; mostramos serem os resultados de ambos os grupos homogêneos e semelhantes entre si. Esse consumo foi também tomado durante o período de exposição ao estresse pré-natal, para analisar se os possíveis efeitos a serem encontrados na esfera neuroimune seriam derivados da exposição materna ao estressor ou a modificações metabólicas/ endócrinas advindas das mães em decorrência de um maior ou menor consumo de água e ração decorrente desta exposição (DALLMAN *et al*, 2003). Finalmente, fizemos essa análises para verificar se a aplicação do estresse no terço final da gestação alteraria o comportamento alimentar das mães no período pós-parto.

A ocorrência de partos prematuros/ tardios não foi estatisticamente significativa entre os grupos; contudo, vale aqui a ressalva de que em experimentos prévios realizados em nossos laboratórios (FONSECA, 2005 e 2002) os partos ocorreram entre o 19º e o 21º dias gestacionais, sendo apenas as proles dos partos ocorridos neste último dia considerados para a experimentação. No presente trabalho, a média dos partos deu-se no 19º dia gestacional, tanto nas fêmeas do grupo controle como naquelas submetidas ao estresse pré-natal.

Esta discrepância de dados chamou-nos a atenção e, portanto, passamos a verificar a data do parto a termo encontrada nos animais da mesma linhagem no setor de criação do biotério de nosso Departamento. Lá, todas as camundongos fêmeas primíparas também apresentavam data de parto aos 19º dias gestacionais,

como observado nesse experimento. Apenas as fêmeas multíparas podiam apresentar, ocasionalmente, partos com 20 ou 21 dias.

Estes resultados de data de parição são corroborados pelas referências da literatura que embasam o presente trabalho. Conforme bibliografia de animais de laboratório, o tempo médio de gestação de camundongos de laboratório (*Mus musculus* e *Mus domesticus*) é de 19 dias, podendo a gestação abranger de 18 a 21 dias (HAFEZ, 1970; ASDELL, 1964). Dados semelhantes são apresentados por outras referências mais recentes, que citam o período de gestação como sendo de 19 a 20 dias (HOGAN *et al*, 1986) ou ainda de 19 a 21 dias (DE LUCA *et al*, 1996; HARKNESS, 1993).

No contexto das avaliações peri-natais, os demais parâmetros obtidos após a exposição ou não das gestantes às sessões de choque parecem descartar a possibilidade de efeitos deletérios diretos exercidos pelos choques nas mães. Isto porque, embora não quantificado, todas as fêmeas mantiveram seu comportamento de construção de ninhos, colocação dos filhotes nos mesmos e comportamento de lordose para a amamentação. Ainda, tanto as fêmeas como também suas proles apresentavam-se à inspeção com bom estado geral, boa elasticidade cutânea, pelagem homogênea, ausência de piloereção e presença de comportamento de auto-limpeza. Trabalhos anteriores realizados em nossos laboratórios após manipulações pré-natais relataram resultados idênticos (FONSECA, 2005 e 2002; PALERMO-NETO, MASSOCO e FAVARE, 2001)

Os dados, portanto, sugerem que os efeitos imunológicos buscados nos experimentos que se seguiram, foram, muito provavelmente, decorrentes de modulações neuroimunes nos filhotes e independentes de fatores orgânicos diretos prejudiciais ocorridos na mães em decorrência da aplicação das sessões de choque.

7.2 Avaliações imunes

Tomados em seu conjunto, os dados mostram que a administração de choques às patas, quer no período pré-natal, quer no pós-natal como desafio, foi incapaz de modificar os parâmetros imunes considerados, a saber: 1) peso relativo das adrenais, 2) celularidade total da medula óssea, 3) fenotipagem e 4) viabilidade de

linfócitos provenientes do sangue periférico, 5) proliferação de esplenócitos-linfócitos frente a estímulos *in vitro* (cultura celular).

1) Peso relativo das adrenais:

É fato aceito pela comunidade científica que o estresse acarreta a liberação de corticóides, inclusive com hipertrofia das adrenais como descrito por Selye (item 2.1). Contudo, lembramos que as avaliações pós-natais consistiram do emprego de uma sessão única de choques antes dos experimentos, o que sugere a liberação de corticosterona, sem, obviamente, alteração morfológica das glândulas.

Porém, estudos prévios desenvolvidos em nossos laboratórios demonstraram que, a prole de machos submetidos ao mesmo modelo de estresse pré-natal por nós utilizado, apresentavam aos 30 dias de vida, diminuição dos níveis circulantes de corticosterona em relação a animais do grupo controle (FONSECA, 2005), resultado, esse, corroborado por outros estudos pré-natais (KAY *et al*, 1998) e peri-natais (LOBÃO-PINHEIRO, resultados ainda não publicados).

Considerando-se o papel das adrenais, elo fundamental da cadeia de eventos que envolvem a resposta desenvolvida pelo eixo HPA sugere-se, que interferências peri-natais poderiam modular via *down-regulation* a produção hormonal. Decidimos, assim, aferir o peso relativo das adrenais das proles dos animais de todos os grupos em estudo. A análises desses resultados não mostrou diferenças estatisticamente significantes, sugerindo que a diminuição dos níveis de corticosterona sérica dos filhotes teria sido modulada apenas por uma menor atividade das adrenais dos filhotes, isto é, na ausência de diminuição de peso relativo (hipotrofia) das adrenais.

2) Celularidade total de medula óssea:

Sabe-se que a atividade hematopoética pode ser comprometida através de mudanças induzidas nos sistemas neuroendócrino e/ou imune. Neste sentido, a modulação da atividade de células hematopoéticas por glicocorticóides, catecolaminas ou peptídeos opioides, constitui uma importante via através da qual se faz a comunicação neuroimunológica (BESEDOVSKY *et al.*, 1985; BLALOCK, 1994^{a,b}; WEIGENT e BLALOCK, 1995). Ainda, dados obtidos da literatura, *in vivo*, indicam que o tono simpático atuando sobre a medula óssea suprimiria a produção de granulócitos e macrófagos e ativaria a produção de linfócitos (MAESTRONI *et al*, 1992; MAESTRONI e CONTI, 1994^{a,b}; MAESTRONI *et al.*, 1998) e, ainda que a

atividade hematopoética poderia ser modulada também *in vitro* pelas catecolaminas (MIYAN et al., 1998; ELENKOV, 2000).

Neste contexto, Tang e col. (1999) observaram que a exposição ao frio aumentou em 36% e que uma infecção por *Pseudomonas aeruginosa* gerou um aumento de 131% no *turnover* de NE na medula óssea de roedores (TANG et al., 1999). Deste modo, buscamos por possíveis variações na celularidade de medula óssea das proles de animais de nossos grupos de estudo. Nossos resultados sugerem que o modelo de estresse aqui aplicado quer cronicamente no período uterino, quer na fase pré-púbere (30 dias com uma única sessão de choques às patas) com uma única sessão de choques às patas, não modificou as contagens totais de células medulares.

3) Fenotipagem dos linfócitos do sangue periférico:

Algumas publicações sugerem que a exposição pós-natal e aguda ao estresse possa gerar modificação das subpopulações de linfócitos no sangue periférico (PAZIRANDEH et al., 2002; BENSHP et al, 1996; DHABHAR et al., 1994; STRATAKIS e CHROUSOS, 1995). De fato, é descrito por Dhabhar e McEwen que essa ocorrência dever-se-ia, principalmente, à redistribuição específica dos linfócitos do sangue periférico para outros compartimentos imunes (DHABHAR e MCEWEN, 1997). São escassos os estudos que analisaram esta questão para a variável estresse pré-natal; dentre os trabalhos que guardam similaridade com nosso estudo, os resultados neles contidos, corroboram com os presentemente apresentados (KAY et al., 1998). Em nossos experimentos, não encontramos diferenças significantes quanto às subpopulações de linfócitos do sangue periférico ao considerarmos tanto o estresse pré quanto com o pós-natal.

Quanto ao estresse pós-natal, sabe-se que nem toda espécie e sexo de animais responde a um determinado estressor da mesma maneira; nem todo estressor produz o mesmo padrão de resposta neuroquímica e; nem toda “função imune” é igualmente afetada pela aplicação de um mesmo agente estressor. Logo, parece-nos possível que o modelo de estresse pós-natal (*footshock*) em questão, não teria sido suficientemente capaz de modular a redistribuição celular para outros compartimentos imunes.

4) viabilidade dos linfócitos do sangue periférico:

Quanto aos resultados dos experimentos para verificação de processo apoptótico/ necrótico por anexina-FITC e PI, podemos sugerir que a exposição ao estresse em útero ou aos 30 dias de vida não contribuiu para ocorrência do mesmo. De fato, nossos dados, são corroborados pela publicação de Lang e grupo, que mostraram *in vitro* que as catecolaminas quando incubadas com hemácias inibiram a entrada de cálcio nestas células, via remoção de ânions cloreto, além de prevenirem a exposição da fosfatidilserina. Ou seja, atuaram de forma antiapoptótica (LANG *et al.*, 2005).

Outro estudo *in vitro*, publicado em 1999, sugere que a incubação de linfócitos do sangue periférico e de esplenócitos com corticosterona não resultou em alteração do perfil de viabilidade celular (HOFFMAN-GOETZ e ZAJCHOWSKI, 1999). Neste sentido e como já mencionado, não observamos alterações *in vivo* da viabilidade dos linfócitos provenientes do sangue periférico nos animais de nossos grupos de trabalho. Estes mesmos autores encontraram resultados similares aos nossos, quando avaliaram os efeitos da exposição *in vivo*, de linfócitos-esplenócitos e timócitos de camundongos a hormônios do estresse liberados pelo exercício físico (HOFFMAN-GOETZ *et al.*, 1999). Corroborando ainda com nossos achados, um estudo empregando a mesma técnica de análise de viabilidade celular (Anexina-FITC x PI), mostrou que a frequência de células necróticas e/ou apoptóticas não se alterava significativamente quando as células eram cultivadas *in vitro* na presença de diversas concentrações de NE ou dopamina, conjuntamente ou não com dexametasona (glicocorticóide) (NAVARRO, 2005).

5) proliferação de esplenócitos-linfócitos frente a estímulos *in vitro* (cultura celular):

Nos estudos de proliferação de linfócitos mostramos ausência de diferenças significantes quanto ao percentual de proliferação de linfócitos esplênicos quando considerada a aplicação de estresse pré ou pós-natal. O mesmo foi evidenciado em outro estudo para o estresse pré-natal, quando se avaliou a proliferação de linfócitos esplênicos estimulados com PHA (KAY *et al.*, 1998), ou com ConA (KLEIN e RAGER, 1995).

Vale salientar que as publicações já citadas anteriormente e cujos resultados não corroboram com os nossos, incluem variáveis experimentais diferentes como, por exemplo: uso de sujeitos experimentais de diferentes linhagens (camundongos) ou espécies (ratos e sangue humano); tipo de estresse empregado (psicológico, de restrição, exercícios, variável, etc), períodos gestacionais em que o estresse foi vivenciado (extremamente variável dentre as publicações) e tempos de avaliação quando da reexposição a um estressor (imediatamente após a exposição ao estressor, 1h após, 24h após), etc.

Todavia, evidenciou-se, neste trabalho, que a exposição dos linfócitos esplênicos à dose milimolar (10^{-3} M) de NE ampliou significativamente a taxa mitótica, sugerindo, este fato, que o neurotransmissor module, de alguma forma, este processo.

Cabem algumas questões neste ponto da discussão: por quê nossos dados provenientes da cultura de esplenócitos-linfócitos após exposição à NE não se mostraram na forma sigmóide clássica das curvas dose-efeito farmacológicas? Ou seja, por quê não atingimos o “efeito máximo” (platô) nestes experimentos? Primeiro, considere-se que realizamos a leitura em 4 dias de proliferação celular, justamente, por saber que até este momento, incrementos replicativos não acarretariam exaustão do meio de cultura. Deste modo, não há como querer atingir a taxa máxima de replicação celular, pois na fisiologia normal as células imunes avaliadas foram selecionadas evolutivamente justamente para serem capazes de progressão clonal. Quando muito, poderíamos alcançar uma taxa mitótica em que o meio de cultura estaria exaurido. Mais do que isto, dar continuidade no aumento das concentrações de NE para obter as curvas de dose-resposta, seria incoerente, pois concentrações desse neurotransmissor superiores a mM (10^{-3} M) são descritas como não fisiológicas, isto é, impossíveis de serem atingidas até mesmo em situações de grandes descargas adrenérgicas como, por exemplo, frente a um forte estímulo estressor.

Ora, e como explicar que a NE, *per se*, tenha sido capaz de modular de forma tão expressiva proliferação celular, como visto em nossos resultados?

É sabido que vários órgãos linfóides como timo, baço, linfonodos e medula óssea são inervados por fibras simpáticas. A inervação noradrenérgica do tecido linfóide parece ser regional e específica: geralmente zonas de células T são ricamente inervadas, enquanto zonas foliculares e nodulares de desenvolvimento e

maturação de células B possuem poucas fibras do SNAS (FELTEN et al, 1985). Focando os esplenócitos (as células por nós estudadas), sabe-se que aproximadamente 98% do nervo esplênico constitui-se de fibras nervosas simpáticas (ELENKOV et al, 2000). O sentido destas inervações fica mais evidente se lembrarmos que todos os leucócitos aparentemente expressam β_2 AR, com exceção apenas dos subclones do tipo Th₂ CD4+. Sabe-se, porém, que mesmo estas células Th₂ CD4+, são reguladas por estímulos adrenérgicos via liberação de citocinas em decorrência da sensibilização pelas catecolaminas das células que contém os β_2 AR (KOHM e SANDERS, 2000).

Já a presença de receptores α -adrenérgicos em leucócitos ainda não é conclusiva. Alguns autores sugerem que sejam expressos apenas em células mononucleares (MN; linfócitos, monócitos e macrófagos) presentes em certos compartimentos orgânicos como nos espaços alveolar e peritoneal ou na presença de certas condições patológicas (ELENKOV et al., 2000) ou, ainda sob influência dos glicocorticóides, dos agonistas β -adrenérgicos e das citocinas (KAVELAARS, 2002).

Ora, se já consideramos a ampla inervação e presença de receptores, a questão centra-se agora nos efeitos induzidos pela estimulação NE-receptor adrenérgico.

A estimulação de β_2 AR tem sido descrita como um meio através do qual a NE modula a hematopoiese, a linfopoiese, a timopoiese, o *homming* dos linfócitos, o fenótipo de membrana de leucócitos e, ainda, a função de células maduras (SANDERS et al., 2001).

O grupo de pesquisas liderado por Genaro, publicou uma série de estudos, onde, em uma cultura de esplenócitos, a NE e o agonista isoproterenol foram capazes de modular, de forma dose-dependente, o incremento da proliferação de linfócitos B (LPS), porém com decréscimo das células T (ConA) (EDGAR et al, 2003 e 2002). Discutindo estes resultados, alguns autores mostraram em estudos conduzidos nos últimos 30 anos, ser a estimulação de β_2 AR capaz de diminuir a proliferação de células T-CD4+ via elevações nas concentrações intracelulares de AMPc (adenosina monofosfato cíclico), maior ativação de PKA (fosfoquinase A) e, possivelmente, de efeitos em elementos do citoesqueleto. Porém, publicações recentes vêm sugerindo uma nova visão: a NE atuaria diminuindo a taxa mitótica

exclusivamente de linfócitos T não ativados, aumentando significativamente, entretanto, a proliferação destas células quando ativadas (KOHM e SANDERS, 2000).

De fato, demonstrou-se em estudos *in vitro* que a aplicação NE foi capaz de induzir um aumento na ativação dos linfócitos, visto pelo aumento da frequência de linfócitos T CD4+ expressando o marcador de ativação recente CD69. Apesar de não terem sido encontradas diferenças significativas de CD25 (cadeia α , específica do receptor de IL-2) detectou-se um aumento na expressão de RNAm para IL-2 (NAVARRO, 2005), uma citocina importante para a proliferação linfocitária e uma das primeiras citocinas a serem produzidas quando da ativação dos linfócitos (KOHM e SANDERS, 2000; ROIT, 2001; JANEWAY, 2001). A análise destes dados pelos autores mostrou que o pico de expressão de CD25 ocorreu 48 horas após o estímulo. Porém, esta expressão de CD25 não foi avaliada nos experimentos de cultura dos autores em questão (NAVARRO, 2005).

Os estudos de Navarro e colaboradores dedicados ao papel da NE sobre células mononucleares do sangue periférico permitiram a obtenção de resultados que auxiliam a verticalização da discussão de nossos resultados. Demonstraram que a NE induzia um aumento da frequência de subpopulações de linfócitos T expressando IFN- γ , TNF- α , IL-6 e IL-10. Além disso, detectaram um aumento de RNAm de IL-2, IL-4, IL-5 e IL-13, sugerindo um duplo papel para a NE sob as citocinas tanto de padrão Th₁ quanto Th₂ (NAVARRO, et al, 2005).

Neste sentido, um estudo demonstrou que a expansão celular antígeno-induzida de células foliculares e, também, a formação de centros germinativos esplênicos são reduzidos pela depleção de NE em camundongos e, que estes efeitos podem ser prevenidos pela administração prévia de agonistas β_2 -adrenérgicos (KOHM e SANDERS, 1999).

Finalmente, o mais instigante deste trabalho foi a ausência de diferenças estatisticamente significantes entre os resultados obtidos dos animais dos grupos por nós estudados (CC, CE, EC, EE). Trabalhos prévios realizados em nossos laboratórios com os mesmo grupos experimentais (CC, CE, EC, EE), e também utilizando o modelo de *footshock*, mostraram, aos 37 dias de vida, que apenas animais do grupo CE apresentavam redução do percentual de espraio de macrófagos peritoneais previamente ativados por inoculação i.p. de onco-BGC. Nessa ocasião, não se relataram alterações nos demais parâmetros (índice de

fagocitose ou produção de óxido nítrico) ou quaisquer mudanças de atividade nas células provenientes dos demais grupos. Já quando avaliada a produção de peróxido de hidrogênio, observou-se redução da concentração da mesma nos animais do grupo CE e, aumento naqueles do grupo EE (FONSECA, 2002).

Entretanto, idêntico estresse pré ou pós-natal agora empregado foi incapaz de alterar os parâmetros de imunidade avaliados (linfócitos), mesmo que efetivo em alterar parâmetros de imunidade inata. Qual a razão desta discrepância? Algumas possibilidades seriam:

1) a existência de vias de redundância que impediriam modificações nos linfócitos em decorrência do estresse, pela importância ímpar dos mesmos na regulação da imunidade (via balanço Th1-Th2).

2) inaptidão do modelo de estresse empregado para produzir modificações;

3) avaliação dos parâmetros de imunidade adaptativa sem a prévia indução de adaptação, ou seja, sem desafio imunológico; nesse caso, teríamos realizado os experimentos deixando de criar um ambiente propício para que eventuais alterações dos parâmetros de linfócitos fossem evidenciadas.

Sustentando a primeira hipótese, encontramos uma publicação de 2003 na *Brain, Behavior and Immunity*, que detalha o perfil imunológico de um camundongo nocaute de β_2 AR que, ao contrário das expectativas dos autores, não apresentou diferenças em quaisquer dos parâmetros avaliados em relação aos animais do grupo controle: peso corporal; peso relativo de baço, timo, ou linfonodos; celularidade total ou fenotipagem de baço, timo, linfonodos ou medula óssea; produção de Ac's primários e secundários frente à imunização (medido por até 11 semanas); avidéz por IgG; etc. Segundo os autores, mecanismos de compensação *in vivo* teriam causado esse efeito, sem envolver *upregulation* de outros receptores adrenérgicos. Contudo, esse mecanismo compensatório não foi observado quando as células β_2 AR-deficientes foram avaliadas *in vitro* (SANDERS et al., 2003).

Em função da segunda hipótese apresentada delineou-se o experimento do “estresse do metrô de NI”. Ou seja, antes de dar continuidade às análises dos linfócitos em modelos de desafio imune (respondendo à terceira hipótese levantada), buscamos averiguar a efetividade do modelo estressor. Tomando por sua aceitação científica, o modelo descrito por Dhabhar e McEwen (1997) pareceu-nos útil e replicável visto ter uma metodologia simples e passível de extrapolação dos resultados para a vivência humana.

O principal objetivo da realização deste teste piloto foi realizar, através da análise de uma variável comum aos outros experimentos descritos (a fenotipagem), uma comparação entre os efeitos dos dois modelos (*footshock* versus “metrô de NI”). Para isso, foi necessário averiguar se o “estresse do metrô de NI” produzia resultados similares aos relatados na literatura (DHABHAR e MCEWEN, 1997), também nos animais da linhagem de camundongo empregada neste trabalho. Isto foi realizado pois, estudos dos autores supra referidos demonstraram que mediante à submissão ao “estresse do metrô de NI” os resultados poderiam ser distintos conforme a linhagem de ratos empregada (3 linhagens analisadas)(DHABHAR et al., 1995). Resultados semelhantes foram obtidos por outro grupo, quando comparadas 5 linhagens de ratos (GOMÉZ, KLOET e ARMARIO, 1998). Além disto, não encontramos na literatura relatos do emprego desta metodologia em experimentos com camundongos.

Os dados detalhados no item 5.10 deste trabalho mostram que, de fato, a aplicação por 2h do modelo do “estresse do metrô de NI” modula, também em nossos animais (camundongos da linhagem *Swiss*), a redistribuição celular proposta pelos idealizadores do modelo. Porém, numa perspectiva mais verticalizada, mostramos não apenas que há uma redução total do leucograma decorrente da migração de linfócitos como, também, que a diapedese de células B é a principal responsável por esta redução. Mais do que isso, mostramos que as alterações ocorrem apenas no grupo de animais avaliados imediatamente após o término da exposição ao estressor (0h); retornando os percentuais a valores próximos aos dos animais do grupo controle 1h após a aplicação do estresse. Mostramos, ainda, que apenas o grupo analisado imediatamente após o estresse (0h) apresentou significativo aumento de células T citotóxicas, com incremento não significativo de células T auxiliares, em relação aos animais dos demais grupos.

Deste modo, justificamos a segunda hipótese por nós levantada, ao creditarmos parte da ausência de resultados estatisticamente significantes entre as análises de parâmetros de linfócitos de animais estressados ou não pré e/ou pós-natalmente, pela ineficiência do modelo de estresse por *footshock* inicialmente empregado.

Neste sentido, optamos por manter o protocolo pré-natal descrito, considerando-se as publicações já mencionadas que corroboram com nossos achados e, também, por ser uma metodologia já estabelecida em nosso laboratório.

Porém, optamos por empregar o modelo do “estresse do metrô de NI” como novo desafio para avaliação de efeito na vida adulta dos animais. Esse estresse foi empregado imediatamente antes de uma imunização e de um *booster* com OVA. Logo, com este novo delineamento experimental, buscamos neste momento por respostas enfocando a terceira hipótese discutida acima, ou seja: a avaliação de parâmetros de imunidade adaptativa (agora não apenas os linfócitos) na vigência do desafio imune (asma experimental induzida por OVA).

7.3 Inflamação alérgica pulmonar – asma OVA-induzida

No presente trabalho, verificou-se uma redução significativa no número de células totais no lavado broncoalveolar (BAL) dos animais de todos os grupos experimentais (EC, CE e EE); correlacionado às diminuições nas contagens diferenciais de macrófagos, linfócitos, neutrófilos e eosinófilos, em relação aos animais do grupo controle (CC). Esses resultados sugerem um quadro inflamatório pulmonar de menor severidade em decorrência da imposição dos animais aos estressores pré e/ou pós-natais.

Observou-se, também, um aumento significativo do leucograma sangüíneo total nos animais dos grupos estressados pós-natalmente (CE e EE) em relação aos animais do grupo controle (CC) e do grupo Basal, sugerindo uma menor mobilidade dos leucócitos deste compartimento para o alvo inflamatório. Além disso, o percentual de células inflamatórias implicadas na asma experimentalmente induzida nos animais dos grupos experimentais (EC, CE e EE), como eosinófilos e neutrófilos circulantes, apresentou-se significativamente diminuído em comparação àqueles observados nos animais do grupo controle (CC), assemelhando-se os achados dos grupos EC, CE e EE, por sua vez, aos animais do grupo Basal. Como consequência, encontramos uma significativa diminuição percentual dos linfócitos circulantes dos animais do grupo controle (CC) em comparação aos animais do grupo Basal (note-se a diminuição relativa, devido ao aumento no percentual de células inflamatórias); bem como um aumento significativo destas células (semelhante à contagem observada nos animais não inflamados) em todos os grupos estressados (EC, CE e EE) em relação aos animais do grupo controle (CC).

Quanto à contagem total de células hematopoéticas medulares, todos os grupos induzidos à inflamação alérgica pulmonar (CC, EC, CE e EE) apresentaram aumento significativo das mesmas em relação ao grupo basal; sugerindo esses achados que o quadro asmático OVA-induzido foi efetivo em gerir a produção de citocinas e de outros mediadores (como fatores estimuladores de colônias), que por sua vez estimularam a hematopoiese. Não obstante, os resultados deste experimento indicaram um aumento significativo do número de células na medula óssea dos animais estressados em relação aos animais controles (CC). Apontando, esse fato, uma menor mobilização imune deste compartimento para o foco inflamatório, apenas nos animais estressados em relação aos do grupo controle (CC), como demonstram os demais resultados.

Finalmente, apesar de se tratar de dados qualitativos, a análise histopatológica pulmonar sugere a eficiência em todos os grupos estudados do modelo empregado para a indução da resposta alérgica inflamatória pulmonar. As fotomicrografias ilustrativas deste experimento evidenciam um intenso infiltrado imune, inclusive com marcante presença de eosinófilos, nos pulmões.

Tomados em seu conjunto, os dados sugerem que, a variável “estresse”, atue prevenindo o agravamento do quadro inflamatório pulmonar.

Ora, como já discorrido na parte introdutória quando abordamos asma, diversos autores sugerem a implicação de estressores como fatores para desencadeamento ou agravamento da inflamação alérgica pulmonar, sejam eles pré-natais (VON HERTZEN, 2002; HOLT, 1999; NOGUEIRA et al., 1999) ou pós-natais (LIGEIRO DE OLIVEIRA et al, 2008; CHEN e MILLER, 2007; CHEN et al., 2007; TILLIE-LEBLOND et al., 2005; LIGEIRO DE OLIVEIRA et al, 2004).

Segundo Chen e Miller (2007), há um paradoxo teórico na discussão do paradigma estresse-asma. Como já dito, as principais vias de responsividade a estressores são o eixo HPA e o SNAS, ou seja, a liberação de glicocorticóides e de adrenalina e noradrenalina. Assim, num contexto de asma, teríamos, ao menos, teoricamente: altos níveis de corticóides que atuariam inibindo o processo inflamatório e também uma ativação adrenérgica que atuaria gerando broncodilatação (receptores β_2 adrenérgicos). Nesse sentido, os glicocorticóides e análogos da adrenalina com ação β_2 adrenoceptore são aplicados na clínica como

fármacos usados no tratamento sintomático da asma (CHEN e MILLER, 2007; SEGERSTROM et al., 2004).

Outros trabalhos, no entanto, mostram a existência de uma correlação positiva entre estresse e asma; essas publicações recentes que sugerem que pode haver dessensibilização ou *down-regulation* dos receptores que são ativados pelos hormônios do estresse após a exposição repetida aos estressores, fato que, por sua vez, culminaria na potenciação dos quadros asmáticos (CHEN e MILLER, 2007; ROSEMBERG et al., 2007). Neste contexto, parece que as β -arrestinas (moléculas que se ligam intracelularmente à proteína G) são as principais responsáveis pela diminuição de receptores à membrana celular e, portanto, potenciação do quadro asmático. Uma vez que o GPCR (receptor acoplado à prot. G) é ativado, desencadeia-se uma cascata de eventos bioquímicos que culminam na ligação intracelular de β -arrestina ao receptor e, este evento acarreta a internalização do mesmo (GUREVICH e GUREVICH, 2006).

No caso específico da asma, publicações recentes descrevem que as β -arrestinas estão vinculadas aos receptores β_2 -adrenérgicos, ou seja, há internalização destes receptores e, por conseguinte, menor capacidade à broncodilatação mediados pela via adrenérgica (MA e PEI, 2007; PREMONT e GAINETDNOV, 2007). Numa visão ainda mais verticalizada, McGraw e colaboradores (2006) demonstraram que os receptores para o mediador inflamatório prostaglandina E_2 , em seu subtipo EP_1 , nas vias aéreas, formam um complexo heterodimérico (oligômero) com os receptores β_2 -adrenérgicos. Como consequência, a ativação pró-inflamatória dos receptores EP_1 modularia uma modificação conformacional dos β_2AR , o que, por sua vez, diminuiria funcionalmente a responsividade deste receptor através da interação com a proteína G (MCGRAW et al., 2006), ou seja, amplificaria a sintomatologia asmática pulmonar.

Contudo, os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a exposição ao estressor, tanto pré quanto pós natal, atuaram prevenindo ou diminuindo de alguma forma a migração celular durante o quadro asmático. Para discussão destes dados, precisamos, inicialmente, definir como se dá a sensibilização a um alérgeno, com a consequente formação de imunidade mediada por anticorpos se dá para, então, analisarmos os resultados obtidos em nosso modelo.

Simplificadamente: uma vez no organismo (inoculado ou inalado) o alérgeno é capturado por células dendríticas (DCs) sendo por estas, processado e apresentado às células T auxiliares (Th – *helper*) (LEMANSKE, 2001). As células Th₁ em geral iniciam e coordenam as respostas imunes celulares através de citocinas como IL-2 e IFN- γ . Em contraste, as células Th₂ promovem através de citocinas como IL-4, IL-5 e IL-13 a proliferação clonal e a diferenciação dos linfócitos B a plasmócitos (produtores de anticorpos – IgE), que passam a orquestrar a resposta típica à asma (CHEN e MILLER, 2007).

Neste sentido, a marcante diferença de nosso modelo, é que empregamos a variável estresse pós-natal imediatamente antes da imunização, enquanto a imensa maioria dos dados da literatura considera o estressor antes dos desafios desencadeadores da resposta inflamatória em animais previamente imunizados.

Discutindo a relação “exposição ao estressor x eixo neuroimune” encontramos em diversas publicações que a exposição aguda a um estressor, através principalmente de seu mediador imediato (a NE), propicia o denominado “eustresse”. Ora, analisemos o cenário evolutivo darwiniano das respostas a um estressor agudo (exposição ao predador, por exemplo): a ativação adrenérgica expressiva acarreta as modificações fisiológicas de midríase, sudorese, aumento da capacidade cardio-respiratória, etc.; culminando no clássico modelo de “luta ou fuga” descrito por Cannon e Selye. Mas como estaria a atividade do sistema imune frente a esta mesma ativação adrenérgica? De nada adiantaria lutar ou fugir de um predador e vir a óbito horas mais tarde de infecção decorrente de patógenos inoculados justamente por escoriações oriundas do processo de “luta ou fuga”. Dentro desta lógica, parece óbvio imaginar que há, dentro deste contexto imune inflamatório vinculado à patógenos, um balanço Th₁-Th₂ voltado à imunidade inata (Th₁), o que desfavorece o contexto alérgico (Th₂).

Por outro lado há de pontuar que empregamos previamente à imunização e ao *booster* uma exposição por 2h ao estressor, o que sugere já haver neste período aumento dos níveis séricos de corticosterona. Há muito tempo já se discute que os glicocorticóides são hábeis em inibir a produção de IL-12 em monócitos humanos e, aumentar a capacidade de síntese IL-4 por parte de linfócitos T CD4+ (BLOTTA et al., 1997; LARSSON e LINDEN, 1998). Visto que IL-12 atua aumentando a produção de IFN- γ nas células T e NK (HOLT, 1999), esta inibição mediada pelos glicocorticóides da produção de IL-12 é considerada o maior mecanismo pelo qual

eles induzem o balanço em direção a Th_2 (TRICHERI, 1995; DEKRUYFF et al, 1998).

Porém, lembremos da ordem “cronológica” dos eventos que culminam na formação de imunidade adaptativa a um alérgeno. Primeiro há o reconhecimento pelas DCs do alérgeno, para só então, haver a participação das células T. Neste sentido, um estudo de Mainali e Tew demonstrou com detalhes que os corticosteróides podem influenciar a apoptose de DCs ou ainda interferir com o estágio de maturação destas células (MAINALE e TEW, 2004). Neste sentido, podemos sugerir que no momento da sensibilização ao alérgeno (OVA) o estresse do metrô de NI tenha levado a um aumento dos níveis de corticosterona e, que este aumento, poderia ter alterado tanto a maturação das DCs como a meia-vida das mesmas.

Assim sendo, sugerimos que o ponto-chave desta discussão centra-se no papel do estressor pós-natal como atenuante do processo de formação de imunidade adaptativa frente ao alérgeno.

Mas e o que dizer sobre o papel do estressor pré-natal?

Diversos estudos apontam que o estresse pré-natal crônico propicia uma sustentação excessiva da secreção de corticosterona, afetando especialmente o balanço Th_1 - Th_2 e, assim, aumentando a susceptibilidade pós-natal à asma e à atopia em indivíduos geneticamente predispostos (LEENA e VON HERTZEN, 2002). Estes fatos estariam, por sua vez, associados à diminuída capacidade fetal de produção de IFN (HOLT, 1999; PRESCOTT et al., 1999).

Neste sentido, existem crescentes provas de que o desenvolvimento do sistema imune do feto é controlado pela imunidade materna, e que o resultado desta interação feto-maternal tem um forte impacto sobre a ocorrência de alergias na vida adulta da prole. Foi demonstrado que alérgenos específicos de células T já estão presentes ao nascimento (KOPP et al., 2001) e que o risco de desenvolver alergias está inversamente associado à capacidade do feto em secretar IFN- α durante a estimulação mitogênica de seus leucócitos esplênicos (GEREDA et al., 2000). Uthoff et al. (2003) demonstraram que exposição ao alérgeno durante a gravidez tem um forte impacto na sensibilização alérgica da prole. Segundo estes autores, pode-se distinguir a relação feto-maternal imune entre efeitos pró-alérgicos das células T CD4+ maternas e efeitos imuno-supressores mediados via anticorpos maternos alérgeno-específico IgG.

Entretanto, novamente recaímos sobre o possível papel do estressor nas DCs; o estudo *in vitro* de Mainali e col. (2005) indicou que as DCs presentes no cordão umbilical eram sensíveis à dexametasona. Resumidamente, os autores demonstraram que a adição de dexametasona à culturas de pré-DCs obtidas do cordão umbilical, foi capaz de aumentar a apoptose destas células, suprimir sua diferenciação à células CD1a+, inibir a expressão de CD86 reduzindo, por sua vez, a subsequente expressão de CD83, suprimir a secreção de IL-6 e, aumentar a secreção de IL-10 e ainda, de reduzir a estimulação de células T mediada por DCs. (MAINALI et al., 2005).

Embora a discussão do paradigma Th₁-Th₂, permeie as discussões científicas acerca deste tema, ela começa a se tornar, se não obsoleta, pelo menos superficial. Isso porquê, as células do tipo T CD4+ (*helper*) são tidas como células T efectoras e, sua ação é regulada por pelo menos 4 subtipos de células regulatórias: 1- células Th₃ (secretam especialmente citocinas TGF-β e IL-10) (CHEN et al., 1994); 2- células Tr e Tr₁ (IL-10) (AKBARI et al., 2002; COTREZ et al., 2000); 3- células CD4+CD25+ (TGF-β e IL-10) (SHIMIZU, et al., 2002; JONULEIT et al., 2001; SAKAGUCHI et al., 1995; POWRIE et al., 1994) e, 4- células NKT (IFN-α, IL-4 e IL-13) (WILSON e DELOVITCH, 2003; HELLER et al., 2002; WILSON et al., 1998).

Note-se que, nos três primeiros subtipos celulares de Treg descritos, a citocina IL-10 aparece como recorrente (está presente em todas as 3 modalidades celulares). Somado a isto, o estudo de Mainali e col. demonstrou também, que um aumento dos níveis de corticóides é capaz de produzir um aumento desta citocina na mãe interferindo com o feto.

Discutindo o papel da IL-10 no contexto de estresse pré-natal, sabe-se que esta citocina é detentora de propriedades regulatórias supressivas, isto é, capaz de tornar anérgicas as células T efectoras (no caso, T *helper*). Isto significa que atua fisiologicamente inibindo a formação de quadros autoimunes. Inicialmente, as células T regulatórias e suas citocinas eram estudadas apenas no contexto de tolerância à autoimunidade; contudo, descreve-se hoje em detalhes que esta indução de tolerância imune IL-10-dependente deva ocorrer igualmente na periferia (extra-timo), em especial em termos de responsividade a antígenos dos tratos respiratório e intestinal. De fato, encontram-se nestes locais uma infinidade de antígenos não

patogênicos (justamente, inibição de desenvolvimento de alergias respiratórias ou intestinais) (ABKARI et al., 2002).

Logo, parece-nos plausível supor que, o mecanismo de indução de tolerância mediado pela IL-10 possa ser afetado pelo estresse devido ao fato das células T regulatórias apresentarem tanto receptores adrenérgicos quanto aos corticóides e uma ação como esta poderia modular de forma diferenciada a ativação destas células, com conseqüente influência sobre as células efectoras.

Fora deste contexto, descrevemos previamente a existência de células T regulatórias denominadas NKT, cuja atuação se dá por IFN- α , IL-4 e IL-13. Outra hipótese corrente na literatura acerca da asma sugere que o aumento da produção destas citocinas induzia a diferenciação de células T *naïve* para Th₂, o que propiciaria o quadro asmático (ABKARI et al., 2003). Apesar do papel exato destas células ainda não ser conhecido no processo asmático, alguns estudos têm demonstrado que suas citocinas IFN- α , IL-4 e IL-13 são indispensáveis para determinar a severidade do quadro inflamatório (HERRICK e BOTTOMLY, 2003; BROWN et al., 1996).

Considerando os dados acima apresentados, apesar de não termos ainda dosado as citocinas, um ponto interessante para a discussão de nossos resultados advém de estudos recentes que demonstraram que células dendríticas (DCs) presentes nos linfonodos brônquicos de camundongos expostos a alérgenos respiratórios são capazes de secretar IL-10, a qual atuaria neste contexto como molécula inibitória, bloqueando o desenvolvimento da asma (ABKARI et al., 2003; ABKARI et al., 2002).

Reunindo a discussão de todos estes dados no caso específico da inflamação alérgica-pulmonar OVA induzida, dados da literatura têm demonstrado que após a exposição ao antígeno por três dias consecutivos (como em nosso modelo), poderia haver hiporesponsividade das células T, associada ao desenvolvimento das células Tr. Demonstrou-se, que a produção de IgE OVA-específica é reduzida após os três dias consecutivos de exposição antigênica, embora a produção de IgG₁ e IgG_{2a} tenha aumentado; indicando um desvio ou *split* de tolerância (TSITOURA et al., 1999). Em continuidade, esse estudo demonstrou que essa tolerância respiratória ou desvio imune à OVA, inibiu muito significativamente o desenvolvimento subseqüente da inflamação das vias aéreas (TSITOURA et al., 2000).

Assim, entendemos que estudos mais verticalizados acerca das diferentes populações de linfócitos e suas respectivas citocinas e anticorpos, implicadas no modelo por nós estudado precisam ser realizados, uma vez que eles poderão ajudar na compreensão de nossos resultados.

Porém, é de relevância lembrar que os animais dos grupos experimentais (EC, CE e EE) apresentaram uma menor contagem total de leucócitos no BAL em relação aos do grupo controle (CC), além de menor contagem diferencial destas células no tocante ao perfil inflamatório. Não obstante, encontrou-se no leucograma sanguíneo total dos animais dos grupos estressados pós-natalmente (CE e EE) um maior número de células, e de perfil com maior número de linfócitos, assim como nos animais do grupo basal. Logo, a presença do estressor neste contexto, parece ter interferido com o trânsito destas células para o foco inflamatório.

8 CONCLUSÕES

Os dados obtidos sugerem que:

1) a aplicação de estresse pré-natal empregado (choques às patas no terço final gestacional), seja incapaz de alterar os parâmetros reprodutivos e gestacionais;

2) as variáveis estresse pré e/ou pós-natal (por choques inescapáveis nas patas), não modularam os parâmetros imunes analisados: peso relativo das adrenais, celularidade da medula óssea, subpopulações de linfócitos por fenotipagem, viabilidade de linfócitos periféricos ou proliferação de linfócitos-esplenócitos em cultura celular;

3) a NE modulou (aumentando) a proliferação de linfócitos esplênicos;

4) o modelo do “estresse do metrô de NI” aplicado no período pós-natal foi também capaz de produzir, em camundongos, uma redistribuição celular, do sangue para outros compartimentos imunes;

5) os estressores aplicados nos períodos pré e/ou pós natais, reduzem a resposta alérgica pulmonar OVA-induzida.

Tomados em seu conjunto e analisados através de uma perspectiva neuroimune, os presentes resultados sugerem que a aplicação de estressores nos períodos pré e/ou pós-natal produzam efeitos significativos sobre a atividade de linfócitos. Estes efeitos, no entanto, variam conforme o modelo de estresse empregado e o tipo de desafio imune analisado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADER, R. On the development of psychoneuroimmunology, **European Journal of Pharmacology** 405: 167-176; 2000.

AMMIT, A.J. The role of mRNA stability in airway remodelling. **Pulmonary Pharmacology and Therapeutics** 18(6): 405-415; 2005.

ASDELL, S.A. Patterns of mammalian reproduction. 2a Ed. **Cornell University Press**, Ithaca, 1964.

ASQUITH, B.; DEBACQ, C.; FLORINS, A.; GILLET, N.; SANCHEZ-ALCARAZ, T.; MOSLEY, A.; WILLEMS, L. Quantifying lymphocyte kinetics in vivo using carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE). **Proceedings in Biological Sciences** 273: 1165 – 1171; 2006.

AUSTIN, M.P.; LEADER, L.R.; REILLY, N. Prenatal stress, the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, and fetal and infant neurobehavior. **Early Human Development** 81: 917 – 926; 2005.

BACCAN, G.C. Estresse e fagocitose: papel da corticosterona e catecolaminas na fagocitose imunológica desempenhada por macrófagos murinos. **Tese de Doutorado**. 145 f. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. 2004.

BARKER, D.J.P. The origins of the developmental origins theory. Symposium. **Journal of Internal Medicine** 261:412-417; 2007.

BARKER, D.J.P.; Osmond, C.; LAW, C.M. The intrauterine and early postnatal origins of cardiovascular disease and chronic bronchitis. **Journal of Epidemiology and Community Health** 43: 237-240; 1989.

BASSO, A.S.; COSTA-PINTO, F.A.; BRITTO L.R.; DE SÁ-ROCHA, L.C.; PALERMONETO, J. Neural pathways involved in food allergy signaling in the mouse brain: role of capsaicin-sensitive afferents. **Brain Research** 1009(1-2): 181-188; 2004.

BASSO, A.S.; COSTA-PINTO, F.A.; RUSSO, M.; DE SÁ-ROCHA, L.C.; PALERMONETO, J. Neural correlates of IgE-mediated food allergy. **Journal of Neuroimmunology** 140(1-2): 69-77; 2003.

BAUER, M. E.; PERKS, P.; LIGHTMAN, S. L.; SHANKS, N. Are adhesion molecules involved in stress-induced changes in lymphocyte distribution? **Life Sciences** 69: 1167 – 1179; 2001.

BEANE, M.L.; COLE, M.A.; SPENCER, R.L.; RUDY, J.W. Neonatal handling enhances contextual fear conditioning and alters corticosterone stress responses in young rats. **Hormonal Behavior** 41: 33 – 40; 2002.

BEHBAHANI, H.; RICKLE, A.; CONCHA, H.; ANKARCRONA, M.; WINBLAD, B.; COWBURN, R.F. Flow cytometry as a method for studying effects of stressors on primary rat neurons. **Journal of Neuroscience Research** 82(3): 432-441; 2005

BÉJEAN, S.; SULTAN-TAÏEB, H. Modeling the economic burden of diseases imputable to stress at work. **The European Journal of Health Economics**. 6(1): 16 – 3; 2005.

BELLINGER, D.L.; LORTON, D.; HAMILL, R.W.; FELTEN, S.Y.; FELTEN, D.L. Acetylcholinesterase staining and choline acetyltransferase activity in the young adult rat spleen: lack of evidence for cholinergic innervation. **Brain Behavior and Immunity** 7(3): 191-204; 1993.

BELVESI, M.G. Regulation of inflammatory cell function by corticosteroids. **Proceedings of the American Thoracic Society** 1(3): 207-214; 2004.

BENSCHOP, R.J.; RODRIGUEZ-FEUERHAHN, M.; SCHEDLOWSKI, M. Catecholamine-Induced Leukocytosis: Early Observations, Current Research, and Future Directions. **Brain, Behavior and Immunity** 10: 77 – 91; 1996.

BERKENBOSH, F.; WOLVERS, D.A.; DERIJK, R. Neuroendocrine and immunological mechanisms in stress-induced immunomodulation. **Journal of Steroidal Biochemistry and Molecular Biology**. 40: 639 – 647; 1991.

BESEDOVSKY, H.; DEL REY, A.; SORKIN, E.; Immune-endocrine interactions. **Journal of Immunology** 135: 750S-754S; 1985.

BESEDOVSKY, H.; DEL REY, A.; SORKIN, E.; DA PRADA, M.; BURRI, R.; HONEGGER, C. The immune response evokes changes in brain noradrenergic neurons. **Science** 221(4610): 564-566; 1983.

BESEDOVSKY, H.; SORKIN, E.; FELIX, D.; HAAS, H. Hypothalamic changes during the immune response. **European Journal of Immunology** 7(5): 323-325; 1977 .

BESEDOVSKY, H.; SORKIN, E.; KELLER, M.; MULLER, J. Changes in blood hormone levels during the immune response. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine** 150(2): 466-70; 1975.

BLALOCK, J.D. Opinion: The Immune System as a Sensory Organ. **The Journal of Immunology** 132(3): 1067-1070; 1984.

BLOTTA, M.H.; DEKRUYFF, R.H.; UMETSU, D.T. Corticosteroids inhibit IL-12 production in human monocytes and enhance their capacity to induce IL-4 synthesis in CD4+ lymphocytes. **Journal of Immunology** 158: 5589-5595; 1997.

BOO, H.A.; HARDING, J.E. The developmental origins of adult disease (Barker) hypothesis. **Australian and New Zealand Journal of Obstetrics and Gynaecology** 46: 4-14; 2006.

BORGER, P.; HOEKSTRA, Y.; ESSELINK, M.T.; POSTMA D.S.; ZAAGSMA, J.; VELLENGA, E.; KAUFFMAN, H.F. Beta-adrenoceptor-mediated inhibition of IFN-gamma, IL-3, and GM-CSF mRNA accumulation in activated human T lymphocytes

is solely mediated by the beta2-adrenoceptor subtype. **American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology** 19(3): 400-407; 1998.

BOUSQUET, J.; BOUSHEY, H.A.; BUSSE, W.W.; CANONICA, G.W.; DURHAM, S.R.; IRVIN, C.G.; KARPEL, J.P.; VAN CAUWENBERGE, P.; CHEN, R.; IEZZONI, D.G.; HARRIS, A.G. Characteristics of patients with seasonal allergic rhinitis and concomitant asthma. **Clinical and Experimental Allergy** 34(6): 897-903; 2004.

BRAKEFIELD, P.M.; GEMS, D.; COWEN, T.; CHRISTENSEN, K.; GRUBECK-LOEBENSTEIN, B.; KELLER, L.; OEPPEN, J.; RODRIGUEZ-PENA, A.; STAZI, M.A.; TATAR, M.; WESTENDROP, R.G.J. What are the effects of maternal and pre-adult environments on ageing in humans, and are there lessons from animal models? **Mechanisms of Ageing and Development** 126: 431-438; 2005.

BROWN, R.W.; DIAZ, R.; ROBSON, A.C.; KOTELEVTSSEV, Y.V.; MULLINS, J.J.; KAUFMAN, M.H. The ontogeny of 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 and mineralocorticoid receptor gene expression reveal intricate control of glucocorticoid action development. **Endocrinology** 137: 794 – 797; 1996.

BULLOCH, K.; MOORE, R.Y. Innervation of the thymus gland by brain stem and spinal cord in mouse and rat. **American Journal of Anatomy** 162(2): 157-166; 1981.

BURRI, P.H. Fetal and postnatal development of the lung. **Annual Reviews in Physiology Annual Reviews in Physiology** 46: 617-628; 1984.

CARLSON, S.L.; FELTEN, D.L.; LIVNAT, S.; FELTEN, S.Y. Alterations of monoamines in specific central autonomic nuclei following immunization in mice. **Brain Behavior and Immunity** 1: 52-63; 1987.

CASTELNUOVO, R. O prazer fundamental. **Viver Mente e Cérebro - Scientific American** 148: 64 – 67; 2005.

CADET, R.; PRADIER, P.; DALLE, M.; DELOST, P. Effects of prenatal maternal stress on the pituitary adrenocortical reactivity in guinea-pig pups. **Journal of Developmental Physiology** 8: 467 – 475; 1986.

CANO, G.; SVED, A.F.; RINAMAN, L.; RABIN, B.S.; CARD, J.P. Characterization of the Central Nervous System Innervation of the Rat Spleen Using Viral Transneuronal Tracing. **The Journal of Comparative Neurology** 439: 1-18; 2001.

CARA, D.C.; CONDE, A.A.; VAZ, N.M. Immunological induction of flavor aversion in mice. **Brasilian Journal of Medical and Biological Research** 27(6): 1331-1341; 1994.

CAZAUX^a, C.; STERIN-BORDA, L. GORELIK, G.; CREMASCHI, G. Down-regulation of beta-adrenergic receptors induced by mitogen activation of intracellular signaling events in lymphocytes. **FEBS Letters** 364(2): 120-124; 1995.

CAZAUX^b, C.; STERIN-BORDA, L. GORELIK, G.; CREMASCHI, G. Relation between cell proliferation and beta adrenergic receptor expression in activated T lymphocytes. **International Journal of Immunopharmacology** 16(12): 1043-1052; 1994.

CHALLIS, J.R.; MATTHEWS, S.G.; VAN MEIR, C.; RAMIREZ, M.M. Current topic: the placental corticotrophin-releasing hormone-adrenocorticotrophin axis. **Placenta** 16(6): 481 – 502; 1995.

CHEN, E.; MULLER, G.E. Stress and inflammation in exacerbation of asthma. **Brain, Behavior and Immunity**, 21(8): 993-999; 2007.

CHEN, E.; CHIM, L.S.; STRUNK, R.C.; MULLER, G.E. The role of the social environment in children and adolescents with asthma. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine** 176(7): 644-649; 2007.

COSTA-PINTO, F.A. Correlatos neurais e comportamentais da asma alérgica experimental em camundongos. **Tese de Doutorado**. 133 f. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo, São Paulo. 2004.

DALLMAN, M.F.; PECORARO, N.; AKANA, S.F.; LA FLEUR, S.E.; GOMEZ, F.; HOUSHYAR, H.; BELL, M.E.; BHATNAGAR, S.; LAUGERO, K.D.; MANALO, S. Chronic stress and obesity: a new view of "comfort food". **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States** 100: 11696 – 11701; 2003.

DARWIN, C. A expressão das emoções nos homens e nos animais. **Companhia das Letras**. 384 pgs. 2000.

DE LUCA, R.R.; ALEXANDRE, S.R.; MARUQUES, T.; SOUZA, N.L.; MERUSSE, J.L.B.; NEVES, S.P. Manual para técnicos em bioterismo. 2ª Ed. **Winner Graph**, Sao Paulo, 1996.

DEL PRETE, G. Human Th1 and Th2 lymphocytes: their role in the pathophysiology of atopy. **Allergy** 47: 450-455; 1992.

DHABHAR, F. S. Stress, leukocyte trafficking, and the augmentation of skin immune function. **Annuary of New York Academy of Sciences**, 992: 205-217; 2003.

DHABHAR, F. S. Stress-induced augmentation immune function – the role of stress hormones, leukocyte trafficking and cytokines. **Brain, Behavior and Immunity** 16: 785-798; 2002.

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, Behavior and Immunity**, 11: 286 – 306; 1997.

DHABHAR, F. S.; MILLER, A.H.; MCEWEN, B. S.; SPENCER, R.L. Effects of stress on Immune Cell Distribution. Dynamics and Hormonal Mechanisms. **The Journal of Immunology** 5512-5527; 1995.

DHABHAR, F. S.; MILLER, A.H.; STEIN, M.; MCEWEN, B. S.; SPENCER, R.L. Diurnal and acute stress-induced changes in distribution of peripheral blood leukocyte subpopulations. **Brain, Behavior and Immunity** 8: 66 – 79; 1994.

DINARELLO, C.A.; SAVAGE, N. Interleukin-1 and its receptor. **Critical Reviews in Immunology**. 9(1):1-20, 1989.

EDGAR, V.A.; SILBERMAN, D. M.; CREMASCHI, G.A.; ZIEHER, L.M.; GENARO, A.M. Altered lymphocyte catecholamine reactivity in mice subjected to chronic mild stress. **Biochemical Pharmacology** 65: 15-23; 2003.

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

ELENKOV, I.J.; WILDER, R.L.; CHROUSOS, W.G.P.; VIZI, E.S. The Sympathetic Nerve – An Integrative Interface between Two Supersystems: The Brain and the Immune System. **Pharmacological Reviews** 52: 595 – 637; 2000

ENGLER, H. Effects of repeated social stress on leukocyte distribution in bone marrow, peripheral blood and spleen. **Journal of Neuroimmunology** 148, 106 – 115; 2004.

FASOULIOTIS, S. J., ACHIRON, R., KIVILEVITCH, Z., & YAGEL, S. The human fetal venous system: normal embryologic, anatomic, and physiologic characteristics and developmental abnormalities. **Journal of Ultrasound and Medicine** 21(10): 1145–1158; 2003

FELTEN, D.L.; FELTEN, S.Y.; CARLSON, S.L.; OLSCHOWKA, J.A. LIVNAT, S. Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid tissue. **The Journal of Immunology** 135(2): 755-765; 1985

FERRARI, C.; LEAL, G. Males de ontem e de hoje – Carta das editoras. **Viver Mente e Cérebro – Scientific American – Edição Especial Stress e Ansiedade**. N.7, pg 5; 2006.

FONSECA, E. S. M. Participação do sistema opioide e dos glicocorticóides nas alterações comportamentais e da imunidade inata induzidas na prole pelo estresse pré-natal. **Tese de Doutorado**. 164 f. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – Universidade de São Paulo, São Paulo. 2005.

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

FRIM, D.M.; EMANUELE, R.L.; ROBINSON, B.G.; SMAS, C.M.; ADLER, G.K.; MAJZOUB, J.A. Characterization and gestational regulation of corticotropin-releasing hormone messenger RNA in human placenta. **Journal of Clinical Investigation** 82: 287 – 292; 1988.

GAMARO, G.D. Estresse Crônico Variável: Estudo de Parâmetros Bioquímicos e Comportamentais. **Dissertação de Mestrado** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 1998.

GERARDIN, D. C. C.; PEREIRA, O. C. M.; KEMPINAS, W. G.; FLORIO, J. C.; MOREIRA, E. G.; BERNARDI, M. M. Sexual behavior, neuroendocrine, and neurochemical aspects in male rats exposed prenatally to stress. **Physiology and Behavior** 84: 97 – 104; 2005.

GITAU, R.; CAMERON, A.; FISK, N.M.; GLOVER, V. Fetal exposure to maternal cortisol. **The Lancet** 352(9129): 707-708; 1998.

GLAVIN, G.B.; PARÉ, W.P.; SANDBAK, T.; BAKKE, H.K.; MURISON, R. Restraint stress in biomedical research: an update. **Neuroscience and Behavioral Reviews**, 18: 223-249; 1994.

GÓMEZ, F.; DE KLOET, E.R.; ARMARIO, A. Glucocorticoid negative feedback on the HPA axis in five inbred rat strains. **American Journal of Physiology** 274(2Pt2): R420-R427; 1998.

GUTIERREZ, E.G.; BANKS, W.A.; KASTIN, A.J. Blood-borne interleukin-1 receptor antagonist crosses blood-brain barrier. **Journal of Neuroimmunology** 55: 153-160; 1994

HAFEZ, E.S.E. Reproduction and breeding techniques for laboratory animals. 1a Ed. **International Copyright Union**, Filadelfia, 1970.

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

HARKNESS, J.E. Biologia e clínica de coelhos e roedores. 1ª Ed. **Livraria Roca Ltda.**, São Paulo, 1993.

HASKÓ, G.; SZABÓ, C. Regulation of cytokine and chemokine production by transmitters and co-transmitters of the autonomic nervous system. **Biochemical Pharmacology** 56(9): 1079-1087; 1998.

HERMAN, J.H.; CULLINAN, W.E. Neurocircuitry of stress: central control of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. **Trends in Neurosciences**, 20: 78 – 84; 1997.

HISLOP, A. Developmental biology of the pulmonary circulation. **Pediatric and Respiratory Reviews** 6(1): 35-43; 2005.

HOFFMAN-GOETZ, L.; ZAJCHOWSKI, S. In vitro apoptosis on lymphocytes after exposure to levels of corticosterone observed following submaximal exercise. **The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness**, 39: 269 – 74; 1999.

HOFFMAN-GOETZ, L.; ZAJCHOWSKI, S.; ALDRED, A. Impact of treadmill exercise on early apoptotic cells in mouse thymus and spleen. **Life Sciences**, 64: 191 – 200; 1999.

HOGAN, B.; CONSTANTINI, F.; LAOY, E. Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual. 1a Ed. **Cold Spring Harbor Laboratory**, 1986.

HOLT, P.G. Potential role of environmental factors in the etiology and pathogenesis of atopy: a working model. **Environmental Health Perspectives** 107 (S3): 485-487; 1999.

IEZHITSA, I.N.; SPASOV, A.A.; BUGAEVA, L.I. Effects of bromantan on offspring maturation and development of reflexes. **Neurotology and Teratology** 23(2): 213-222; 2001

JANEWAY; C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. Immunobiology: the immune system in health and disease. 5 Ed. Versão em ingles, **Garland Publishing**, NY-USA.

JEFFREY, P. K. The development of large and small airways. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine** 157(5Pt2): S174-S180; 1998.

KAJANTIE, E.; DUNKEL, L.; TURPEINEN, U.; STENMAN, U.H.; WOOD, P.J.; NUUTILA, M. Placental 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase-2 and fetal cortisol/cortisone shuttle in small preterm infants. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism** 88(1): 493 – 500; 2003.

KAJEKAR, R. Environmental factors and developmental outcomes in the lung. **Pharmacology and Therapeutics** 114(2): 129-145; 2007.

KALINICHENKO, V.V.; MOKYR, M.B.; GRAF JR, L.H.; COHEN, R.L.; CHAMBERS, D.A. Norepinephrine-mediated inhibition of antitumor cytotoxic T lymphocyte generation involves a beta-adrenergic receptor mechanism and decreased TNF-alpha gene expression. **Journal of Immunology** 163(5): 2492-2499; 1999.

KANDEL, E.R; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M. Princípios da Neurociência. **Manole**, Traduzido da 4a Edição em Inglês, 1a Edição Brasileira. Barueri, SP – Brasil. 2003.

KAVELAARS, A. Regulated expression of alpha-1 adrenergic receptors in the immune system. **Brain, Behavior and Immunity** 16(6): 799-807; 2002.

KAY, G.; TARCIC, N.; POLTYREV, T.; WEINSTOCK, M. Prenatal stress depresses the immune function in rats. **Physiology and Behavior** 63: 397-402; 1998.

KIELING, K.; ARDENGHI, P. G. ; SILVESTRIN, R. ; GAMARO, G. D. ; SUYENAGA, E. S. . Avaliação do processo inflamatório induzido pela carragenina em ratos submetidos ao estresse agudo por imobilização. **Aprendizado, Descoberta e Inovação em Iniciação Científica e Extensão**. Ed. Feevale, Novo Hamburgo, v. 1, p. 51-58; 2005.

KLEIN, S.L.; RAGER, D.R. Prenatal stress alters immune function in offspring of rats. **Developmental Psychobiology** 28: 321-336; 1995.

KLEIN, R.L.; WILSON, S.P.; DZIELAK, D.J.; YANG, W.H.; VIVEROS, O.H. Opioid peptides and noradrenaline co-exist in large dense-cored vesicles from sympathetic nerve. **Neuroscience** 7: 2255 – 2261; 1982.

KOHM, A.P.; SANDERS, V.M. Suppression of antigen-specific Th2 cell-dependent IgM and IgG1 production following norepinephrine depletion in vivo. **Journal of Immunology** 162(9): 5299-5308; 1999.

KOHN, A. P.; SANDERS, V. M. Norepinephrine: a messenger from the brain to the immune system. **Immunol Today** 21: 539 – 542; 2000.

KOSTEN, T.A.; LEE, H.J.; KIM, J.J. Neonatal handling alters learning in adult male and female rats in a task-specific manner. **Brain Research**; 2007.

KOTTECHA, S. Lung growth: implications for the newborn infant. **Archives of Diseases in Child, Fetal and Neonatal** Ed 82(1): F69–F74; 2000.

KURKOWSKI, R.; KUMMER, W.; HEYM, C. Substance P-immunoreactive nerve fibers in tracheobronchial lymph nodes of the guinea pig: origin, ultrastructure and coexistence with other peptides. **Peptides** 11(1): 13-20; 1990.

LANG PA, KEMPE DS, AKEL A, KLARL BA, EISELE K, PODOLSKI M, HERMLE T, NIEMOELLER OM, ATTANASIO P, HUBER SM, WIEDER T, LANG F, DURANTON C. Inhibition of erythrocyte "apoptosis" by catecholamines. **Naunyn Schmiedebergs Archives of Pharmacology** 372: 228 – 235; 2005.

LARSON, S.; LINDEN, M. Effects of a corticosteroid, budesonide, on production of bioactive IL-12 by human monocytes. **Cytokine** 10: 786-789; 1998.

LAU, C.; ROGERS, J.M. Embryonic and fetal programming on physiological disorders in adulthood. **Birth Defects Research** 72(C): 300-312; 2004.

LAWRENCE, D.A.; KIM, D. Central/ peripheral nervous system and immune responses. **Toxicology** 142: 73-77.; 2000.

LEMAIRE, V.; KOEHL, M.; LE MOAL, M.; ABROUS, D.N Prenatal stress produces learning deficits associated with an inhibition of neurogenesis in the hippocampus. **PNAS**, 26: 11032 – 11037; 2000.

LYONS, A.B. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. **Journal of Immunological Methods**, 243: 147 – 154, 2000.

MADDEN, K.S. Catecholamines, sympathetic innervation and immunity. **Brain, Behavior and Immunity** 17(1): S5-10; 2003.

MAESTRONI, G.J.; COSENTINO M.; MARINO, F.; TOGNI, M.; CONTI, A.; LECCHINI, S.; FRIGO, G. Neural and endogenous catecholamines in the bone marrow. Circadian association of norepinephrine with hematopoiesis? **Experimental Hematology** 26: 1172 – 1177; 1998.

MAESTRONI, G.J.; CONTI, A. Modulation of hematopoiesis via alpha-1-adrenergic receptors on bone marrow cells. **Experimental Hematology** 22: 313 – 320; 1994a.

MAESTRONI, G.J.; CONTI, A. Noradrenergic modulation of lymphohematopoiesis. **International Journal of immunopharmacology** 16: 117 – 122; 1994b.

MAESTRONI, G.J.; CONTI, A.; PEDRINIS, E. Effect of adrenergic agents on hematopoiesis after syngeneic bone marrow transplantation in mice. **Blood** 80: 1178 – 1182; 1992.

- MAJZOUN, J.A.; KARALIS, K.P. Placental corticotropin-releasing hormone: function and regulation. **American Journal of Obstetry and Gynecology** 180(1): S242 – S246; 1999.
- MALARKEY, W.B.; WANG, J.; CHENEY, C.; GLASER, R.; NAGARAJA, H. Human lymphocyte growth hormone stimulates interferon gamma production and is inhibited by cortisol and norepinephrine. **Journal of neuroimmunology** 123(1-2): 180-187; 2002.
- MARSHALL, G.D. Jr.; AGARWALL, S.K. Stress, immune regulation, and immunity: applications for asthma. **Allergy and Asthma Proceedings** 21(4): 241-246; 2000.
- MATSUMOTO, K.; SAITO, H. The role of eosinophils in asthma: Sarastro or the Queen of the Night? **International Archives in Allergy and Immunology** 125(4): 290-296; 2001.
- MAZUR-KOLECKA, B.; KUBERA, M.; SKOWRON-CENDRZAK, A.; BASTA-KAIM, A.; SHANI, J. Effect of prenatal stress on ontogenesis of immunoregulatory cell maturation in mice. **Polish Journal of Pharmacology** 48: 621 – 625; 1996.
- MCEWEN, B.S. Protective and damaging effects of stress mediators: central role of the brain. **Progresses in Brain Research** 122: 25 – 34; 2000.
- MCEWEN, B.S.; BIRON, C. A., BRUNSON, K.W., BULLOCH, K., HAMBERS, W.H., DHABHAR, F.S., GOLDFARB, R.H., KITSON, R.P., MILLER, A.H., SPENCER, R.L., WEISS, J.M. The role of adrenocorticoids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions. **Brain Research Reviews** 23: 79 – 133; 1997.
- MIYAN, J.A.; BROOME, C.S.; AFAN, A.M. Coordinated host defense through an integration of neural, immune and hemopoietic systems. **Infectious Immunology** 69(12): 7234-7241; 2001.
- MOCHIZUKI, A.; TAKEDA, Y.; IWASA, Y. The evolution of genomic imprinting. **Genetics** 144(3): 1283-1895; 1996.
- MYATT, L. Placental adaptative responses and fetal programming. **The Journal of Physiology**, 572: 25 – 30, 2006.
- NANCE, D.M.; SANDERS, V.M. Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987-2007). **Brain, Behavior and Immunity** 21(6): 736-745; 2007.
- NANCE, D.M.; BURNS, J. Innervation of the spleen in the rat: evidence for absence of afferent innervation. **Brain, Behavior and Immunity** 3(4): 281-290; 1989.
- NANCE, D.M.; HOPKINS, D.A.; BIEGER, D. Re-investigation of the innervation of the thymus gland in mice and rats. **Brain, Behavior and Immunity** 1(2): 134-147; 1987.
- NAVARRO, K.C.L.T. Estudo dos efeitos imunológicos de neurotransmissores (NE e DA) e glicocorticóide (DEX) em células mononucleares do sangue periférico de indivíduos sadios. **Tese de Doutorado**. 83 f. Instituto de Ciências Biológicas. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte-MG. 2005.

NOGUEIRA, P.J.; FERREIRA, H.H.; ANTUNES, E.; TEIXEIRA, N.A. Chronic mild prenatal stress exacerbates the allergen-induced airway inflammation in rats. **Mediators of Inflammation** 8(2): 119-122; 1999.

OKAYAMA, Y.; KOBAYASHI, H.; ASHMAN L.K.; HOLGATE, S.T. Church MK, Mori M. Activation of eosinophils with cytokines produced by lung mast cells. **International Archives in Allergy and Immunology**: 114(S1): 75-77; 1997.

OKAWA, T.; ROHDE, W.; TAKESHITA, S.; DORNER, G.; ARAI, K.; OKINAGA, S. Effect of an acute maternal stress on the fetal hypothalamo-pituitary-adrenal system in late gestational life of the rat. **Experimental and Clinical Endocrinology** 98: 123 – 129; 1991.

PALERMO-NETO, J.; MASSOCO, C.O.; FÁVARE, R.C. Effects of maternal stress on anxiety levels, macrophage activity, and Erlich tumor growth. **Neurotoxicology and teratology** 23: 497 – 507; 2001.

PALERMO-NETO, J.; GUIMARÃES, R.K. Pavlovian conditioning of lung anaphylactic response in rats. **Life Sciences** 68(6): 611-623; 2000.

PANINA-BORDIGNON P, MAZZEO D, LUCIA PD, D'AMBROSIO D, LANG R, FABBRI L, SELF C, SINIGAGLIA F. Beta2-agonists prevent Th1 development by selective inhibition of interleukin 12. **Journal of Clinical Investigation** 100(6): 1513-1519; 1997.

PARÉ, W.P.; GLAVIN, G.B. Restraint stress in biomedical research: a review. **Neuroscience and Behavior Reviews**, 10: 339-370; 1994.

PARFITT, D.B.; LEVIN, J.K.; SALTSTEIN, K.P.; KLAYMAN, A.S.; GREER, L.M.; HELMREICH, D.L. Differential early rearing environments can accentuate or attenuate the responses to stress in male C57/BL/6 mice. **Brain Research** 1016:111 – 118; 2004.

PAVCOVICH, L. A.; CANCELA, L. M.; VOLOSIN, M.; MOLINA, V. A.; RAMIREZ, O. A. Chronic stress-induced changes in locus coeruleus neuronal activity. **Brain Research Bulletin** 24: 293 – 296; 1990.

PAZIRANDEH, A.; XUE, Y.; PRESTEGAARD, T.; JONDAL, M.; OKRET, S. Effects of altered glucocorticoid sensitivity in the T cell lineage on thymocyte and T cell homeostasis. **The FASEB Journal** 10: 727-782; 2002.

PEACHELL, P. Targeting the mast cell in asthma. **Current Opinion in Pharmacology** 5(3): 251-256; 2005.

PORTELA CDE P, MASSOCO CDE O, DE LIMA WT, PALERMO-NETO J. Stress-induced increment on total bronchoalveolar cell count in OVA-sensitized rats. **Physiology and Behavior** 72(3): 415-420; 2001.

PORTELA, C.P.; LEICK-MALDONADO, E.A.; KASAHARA, D.I.; PRADO, C.M.; CALVO-TIBÉRIO, I.F.; MARTINS, M.A.; PALERMO-NETO, J. Effects of stress and neuropeptides on airway responses in ovalbumin-sensitized rats. **Neuroimmunomodulation** 14(2): 105-111; 2007.

PUXEDDU, I.; PILIPONSKY, A.M.; BACHELET, I.; LEVI-SCHAFFER, F. Mast cells in allergy and beyond. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology** 35(12): 1602-1607; 2003.

RAMER-QUINN, D.S.; BAKER, R.A.; SANDERS, V.M. Activated T helper 1 and T helper 2 cells differentially express the beta-2-adrenergic receptor: a mechanism for selective modulation of T helper 1 cell cytokine production. **Journal of Immunology** 159(10): 4857-4867; 1997.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. Immunology. 6 Ed. Versão em inglês. **Mosby – Harcourt Publishers Limited**. Londres, Inglaterra; 2001.

ROMEO, H.E.; FINK, T.; YANAIHARA, N.; WEIHE, E. Distribution and relative proportions of neuropeptides Y- and proenkephalin-containing noradrenergic neurons in rat superior cervical ganglion: separate projections to submaxillary lymph nodes. **Peptides** 15(8): 1479-1487; 1994.

ROTHWELL, N.J.; STRIJBOS, P.J. Cytokines in neurodegeneration and repair. **International Journal of Developmental Neuroscience**. 13(3-4):179-85: 1995.

ROTMENSCH, S.; CELENTANO, C.; LIBERATI, M.; SADAN, D.; GLEZERMAN, M. The effect of antenatal steroid administration on the fetal response to vibroacoustic stimulation. **Developmental Psychobiology** 34: 163 – 173; 1999.

SANDBERG, S.; PATON, J.Y.; AHOLA, S.; MCCANN, D.C.; MCGUINNESS, D.; HILLARY, C.R.; OJA, H. Stress increases the risk of asthmatic attacks in children. **Duodecim** 116(20): 2305-2306; 2000.

SANDERS, V.M. Interdisciplinary research: Noradrenergic regulation of adaptive immunity. **Brain, Behavior and Immunity** 20: 1-8; 2006.

SANDERS, V.M.; KASPROWICZ, D.J.; SWANSON-MUNGERSON, M.A.; PODOJIL, J.R.; KOHM, A.P. Adaptive immunity in mice lacking the beta2-adrenergic receptor. **Brain, Behavior and Immunity** 17: 55-67; 2003.

SANDERS, V.M. The role of norepinephrine and beta-2-adrenergic receptor stimulation in the modulation of Th1, Th2 and B lymphocyte function. **Advances in Experimental and Medical Biology** 437: 269-278; 1998.

SAUL, A. N.; OBERYSZYN, T. M; DAUGHERTY, C.; KUSEWITT, D.; JONES, S.; JEWELL, S.; MALARKEY, W. B.; LEHMAN, A.; LEMESHOW, S.; DHABHAR, F. S. Chronic stress and susceptibility to skin cancer. **Journal of the National Cancer Institute** 97: 1760 – 1767; 2005.

SECKL, J.R. Prenatal glucocorticoids and long-term programming. **European Journal of Endocrinology** 151(S3): U49-62; 2004.

SECKL, J.R.; BENEDIKTSSON, R.; LINSAY, R.S.; BROWN, R.W. Placental 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase and the programming of hypertension. **Journal of Steroidal Biochemistry and Molecular Biology** 55: 447 – 455; 1995.

- SEGERSTROM, S.C.; MILLER, G.E. Psychological stress and the human immune system: a meta-analytic study of 30 years of inquiry. **Psychological Bulletin** 130(4): 601-630; 2004.
- SHEPHERD, A.J.; BERESFORD, L.J.; BELL, E.B.; MIYAN, J.A. Mobilisation of specific T cells from lymph nodes in contact sensitivity requires substance P. **Journal of Neuroimmunology** 164(1-2): 115-123; 2005.
- SOBRIAN, S. K.; VAUGHN, V. T.; ASHE, W. K.; MARKOVIC, B.; DJURIC, V.; JANKOVIC, B. D. Gestational exposure to loud noise alters the development and postnatal responsiveness of humoral and cellular components of the immune system in offspring. **Environmental Research**. 73: 227 – 241; 1997.
- SOBRIAN, S. K.; VAUGHN, V. T.; BLOCH, E. F.; BURTON, L. E. Influence of prenatal maternal stress on the immunocompetence of the offspring. **Pharmacology Biochemistry and Behavior** 43: 537 – 547; 1992.
- STANDFORD, S.C.; SALMON, P. Stress: from synapse to syndrome. 1a Edição. **Academic Press**. Londres, Inglaterra. 1993.
- STEFANSKI, V. Social stress in laboratory rats: Behavior, immune function, and tumor metastasis. **Physiology & Behavior** 73: 385 – 391; 2001.
- STRATAKIS, C.A.; CHROUSOS, G.P. Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. **Annals of the New York Academy of Sciences** 771: 1-18;1995.
- SPARROW, M., WEICHSELBAUM, M., TOLLET, J., MCFAWN, P., & FISHER, J. Development of the airway innervation. In R. Harding, K. Pinkerton, & C. Plopper (Eds.), *The Lung. Development, Aging and the Environment* (pp. 33–53). London: **Elsevier Academic Press**; 2004.
- TANG, Y.; SHANKAS, R.; GAMELLI, R.; JONES, S. Dynamic norepinephrine alterations in bone marrow. Evidence of functional innervation. **Journal of Neuroimmunology** 96: 182-189; 1999.
- TAGAY, S.; HERPERTZ, S.; LANGKAFEL, M.; SENF, W. Posttraumatic stress disorder in a psychosomatic outpatient clinic Gender effects, psychosocial functioning, sense of coherence, and service utilization. **Journal of Psychosomatic Research**, 58: 439 – 446; 2005.
- TILLIE-LEBLOND, I.; GOSSET, P.; TONNEL, A.B. Inflammatory events in severe acute asthma. **Allergy** 60(1): 23-9; 2005.
- TOURNIER J.N.; HELLMANN, A.Q. Neuro-immune connections: evidence for a neuro-immunological synapse. **Trends in Immunology** 24(3): 114-115; 2003.
- TRICHIERI, G. Interleukin 12: a pro-inflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptative immunity. **Annual Reviews in Immunology** 13: 251-276; 1996.
- VALLEE, 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. **Journal of Neuroscience** 17: 2626 – 2636; 1997.

VISWANATHAN, K.; DAUGHERTY, C.; DHABHAR, F. S. Stress as an endogenous adjuvant: augmentation of the immunization phase of cell-mediated immunity. **International Immunology** 17:1059 – 1069; 2005.

VON HERTZEN, L.C. Maternal stress and T-cell differentiation of the developing immune system: possible implications for the development of asthma and atopy. **Journal of Allergy and Clinical Immunology** 109: 923-928; 2002.

VON SAAL, F.S.; EVEN, M.D.; QUADAGNO, D.M. Effects of maternal stress on puberty, fertility and aggressive behavior of female mice from different intrauterine positions. **Physiology and Behavior** 49: 1073 – 1078; 1991.

WARD, H. E.; JOHNSON, E. A.; SALM, A. K.; BIRKLE, D. L. Effects of prenatal stress on defensive withdrawal behavior and corticotropin releasing factor systems in rat brain. **Physiology and Behavior** 70: 359 – 366; 2000.

WEINSTOCK, M. The potential influence of maternal stress hormones on development and mental health of the offspring. **Brain, Behavior and Immunity**, 19: 296 – 308; 2005.

WEIGENT, D.A.; BLALOCK, J.E. Associations between the neuroendocrine and immune systems. **Journal of Leukocyte Biology** 58: 137-150; 1995.

WEINSTOCK, M. Alterations induced by gestational stress in brain morphology and behavior of the offspring. **Progresses in Neurobiology**, 65: 427 – 451; 2001.

WILLIAMS, M.T.; DAVIS, H.N.; MCCREA, A.E.; LONG, S.J.; HENNESSY, M.B. Changes in the hormonal concentrations of pregnant rats and their fetuses following multiple exposures to a stressor during the third trimester. **Neurotoxicology and Teratology** 21: 403 – 413; 1999.

WINDLE, R.J.; WOOD, S.A.; KERSHAW, Y.M.; LIGHTMAN, S.L.; INGRAM, C.D.; HARBUZ, M.S. Increased corticosterone pulse frequency during adjuvant-induced arthritis and its relationship to alterations in stress responsiveness. **Journal of Neuroendocrinology**. 13(10): 905 – 11: 2001.

ZORZETTO, R. Viver é muito perigoso – Estresse prolongado intensifica inflamação cerebral ligada à morte de neurônios. **Pesquisa FAPESP – Ciência e Tecnologia no Brasil**, 129: 36 – 41; 2006.