

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**RESPOSTA DE PBMC FRENTE AO ESTRESSE EM
PACIENTES CORONARIANOS SUBMETIDOS A
TRATAMENTO CLÍNICO NO HC-UFU DE
UBERLÂNDIA, MINAS GERAIS.**

RONALDO ALVES

Monografia apresentada à coordenação do curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia, MG
Junho/2000

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**RESPOSTA DE PBMC FRENTE AO ESTRESSE EM
PACIENTES CORONARIANOS SUBMETIDOS A
TRATAMENTO CLÍNICO NO HC-UFU DE
UBERLÂNDIA, MINAS GERAIS.**

RONALDO ALVES

ORIENTADOR: Prof. Dr. ERNESTO AKIO TAKETOMI

Monografia apresentada à coordenação do curso de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do grau de Bacharel em Ciências Biológicas.

Uberlândia, MG
Junho/2000

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**RESPOSTA DE PBMC FRENTE AO ESTRESSE EM
PACIENTES CORONARIANOS SUBMETIDOS A
TRATAMENTO CLÍNICO NO HC-UFU DE
UBERLÂNDIA, MINAS GERAIS.**

RONALDO ALVES

APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA EM 04/07/2000 Nota 10,00

Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi
Orientador

Prof^a Dr^a. Maria Aparecida de Souza

Prof. MS. Jair Pereira da Cunha Jr.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Biologia
Prof^a Ana Maria Coelho Curvalhe
Coordenadora do Curso de Ciências Biológicas

Uberlândia, _____ de _____ de 2000.

A Deus, por me abençoar e me inspirar, por permitir a minha existência e iluminar sempre os meus passos na diretriz do bem. Aquele que sempre nos carrega nos braços nas travessias mais difíceis de nossa vida.

À minha querida mãe, Ruth Rodrigues Alves, pelo amor, pelo apoio moral, pelo exemplo de luta, trabalho, perseverança, disciplina, dinamismo e libertação. Aquela que em seus braços ternos de amor me envolve de alegria, paz, sentimento de luta e de esperança. Ao doce aconchego que sempre enlaça o meu ser.

Ao meu Pai, Sebastião Custódio Alves, pelos cuidados na fase de criança e adolescência, pelo exemplo de trabalho, honestidade e responsabilidade; pelo amor e carinho que tem por mim e que, mesmo distante se faz presente em meus pensamentos

À meus irmãos, Alair, Aparecida, Anália, Vilson, Laércio e Geraldo, minhas cunhadas e cunhados, sobrinhos e sobrinhas pelo incentivo, carinho e proteção.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ernesto Akio Taketomi, pela orientação, acesso e oportunidade de ingresso no laboratório, pela confiança e presença durante todas as etapas da pesquisa.

À MS. Mônica C. Sopelete, pela amizade, extrema dedicação, competência e profissionalismo, que vão além do muito que lhe compete. Por todo o seu auxílio e sugestões, os quais contribuíram fundamentalmente para a realização deste trabalho

À Dra. Deise Aparecida de Oliveira Silva, pela amizade, por todas as sugestões e observações que fez com relação aos experimentos os quais foram de grande valia na resolução de vários problemas.

À Dra. Maria Aparecida de Souza, pela co-orientação, atenção e disponibilidade dispensada nos momentos necessários e sobretudo pelo profissionalismo e amizade.

Ao MS. Jair Pereira da Cunha Júnior, pela sua boa vontade em ser meu co-orientador e participar da minha avaliação, e pela sua vontade de aprender e pelo seu profissionalismo.

Aos funcionários do Laboratório Imunologia, Antônio Tomás (Junião), pela amizade e pela sua boa disposição em colaborar quando precisei; e ao Max pela sua atenção.

Aos professores, amigos e colegas do laboratório pela convivência agradável.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho.

"À satisfação está no esforço feito para
alcançar o objetivo; e não só tê-lo alcançado"

"Mahatma Gandhi"

"Quando alguém tem força para vencer a si mesmo,
nasceu para grandes empreendimentos".

"Jean Baptiste
Lacordaire"

SUMÁRIO

	Páginas
1- INTRODUÇÃO	01
1.1- Conceito de Estresse	03
1.2- O Sistema Imunológico	04
1.3- Psiconeuroimunologia	05
1.4- Estresse em Sistema Imunológico	07
1.5- Estresse e Sistema Cardiovascular	07
1.6- Proliferação Linfocitária	08
2- OBJETIVOS	13
3- MATERIAL E MÉTODOS	14
3.1- Pacientes	14
3.2- Grupo Controle	15
3.3- Avaliação do Estado Imunológico	15
3.4- Obtenção de Células Mononucleares do Sangue Periférico Humano	16
3.5- Medida da Atividade Funcional de Linfócitos	17
3.5.1 Resposta Linfoproliferativa.....	17
3.5.2 Produção de Citocinas	18
3.5.3 Detecção das Citocinas IFN γ e IL-5	19
3.6 Análise Estatística	22
3.7 Normas de Biossegurança	22
4- RESULTADOS	23
4.1- Resposta Linfoproliferativa	23
4.2- Cinética dos Níveis de Citocina	25
4.3- Correlação entre os Níveis de IFN γ e os níveis de IL-5.....	30
4.4- Relação IFN γ / IL-5	32
5- DISCUSSÃO	35
6- CONCLUSÕES	45
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
8- ANEXOS	58

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem ocorrido uma rápida expansão das pesquisas que enfocam as relações existentes entre a imunidade, o comportamento e o sistema neural. Embora as pesquisas em psiconeuroimunologia sejam relativamente novas, existem informações resultantes de observação clínica e experimental, sugerindo que a função imune pode ser alterada por processos psicológicos. Existem também evidências sugerindo que estados afetivos e características de personalidade estão associados com diferenças na função imunológica. Assim sendo, o sistema imunológico comporta-se como um elemento especial dos sistemas homeostáticos, alvo da interferência neuroendócrina, ativado em condições importantes de quebra da homeostasia, como por exemplo, numa infecção. O sistema imune parece ser modulado não somente por mecanismos de realimentação mediados através de processos endócrinos e neurais, mas também por mecanismos de alimentação a partir de informações que são vivenciadas, aprendidas e interferentes no mecanismo imunológico (ADER *et al*, 1990).

Vários estudos envolvendo condicionamento, estresse, fatores psicossociais e relações neuroanatômicas têm evidenciado alguns mecanismos da interação

neuroimune (MADDEN & FELTEN, 1995).

Condições ambientais e fatores psicossociais, tais como multidão, barulho, separação maternal precoce e aspectos da manipulação de grupos animais podem influenciar a imunidade. Em humanos, mudanças em várias medidas da função imune têm sido relacionadas após eventos estressantes da vida, como morte de uma esposa, depressão e nível de estresse em estudantes de medicina durante a época de exames (MADDEN & FELTEN, 1995).

A ocorrência de estresse implica num conjunto de alterações fisiológicas e psicológicas que age influenciando na manutenção da homeostase do organismo (SELYE, 1956). Uma dessas conseqüências refere-se a sua influência sobre o sistema imunológico dos indivíduos, os quais pela imunossupressão que sofrem ficam desprovidos de valiosos mecanismos de defesa e adaptação (VOLHARDT, 1991; GLASER, KIECOLT-GLASER, 1994; COHEN & HERBERT, 1996). Este fato acarreta maior vulnerabilidade às infecções e aumento na predisposição a apresentarem determinadas patologias (COHEN & HERBERT, 1996; MAIER *et al*, 1994; O'LEARY, 1990; BIONDI & ZANNINO, 1997).

A vulnerabilidade às infecções, que por si só constituem uma ocorrência importante, pode adquirir contornos dramáticos, se considerarmos a sua presença em certas condições como as dos períodos pós-operatórios.

A cirurgia de revascularização coronariana enquadra-se entre as condições em que tais conseqüências são particularmente importantes, pois exige que o organismo seja submetido a procedimentos extremamente agressivos e debilitantes, forçando a responder com todas as suas possibilidades curativas ou reparadoras em uma reação muito aguda.

Ao estresse físico a que o organismo é submetido durante o ato cirúrgico,

acrescenta-se o estresse psicológico, pré-cirúrgico (PIRES *et al*, 1994), visto ser o coração considerado, no imaginário coletivo, como o órgão da vida, aquele que mantém o ser vivo ou que decreta a sua morte. Temos assim um quadro em que pode-se reconhecer que o organismo está sendo obrigado a existir e funcionar, na maioria das vezes, em condições limites.

1.1. CONCEITO DE ESTRESSE

De conformidade com SELYE (1956), estresse refere-se ao conjunto de manifestações fisiológicas que o organismo apresenta quando confrontado com um estímulo ameaçador. Ao estímulo com propriedade de desencadear o processo de estresse dá-se o nome de estressor. A característica que confere a um estímulo a propriedade de se tornar estressor é que o mesmo seja ameaçador ou excitador para o organismo. Como enfatiza LIPP (1996), "o fato que desencadeou tal processo é considerado um estressor, mesmo que seja de natureza benigna ou até mesmo positiva". A concepção do estresse, segundo SELYE, enfatiza os aspectos fisiológicos. Isto significa que, mesmo sabendo dos aspectos psicológicos envolvidos na referida reação, SELYE sempre centrou seu interesse na pesquisa do componente fisiológico da mesma. Coube a LAZARUS (*apud* TAYLOR, 1986) esclarecer como se dá a participação do sistema psicológico na produção e/ou desencadeamento da reação do estresse. Segundo LAZARUS, ao se confrontar com um novo estímulo, o indivíduo efetua uma avaliação primária no sentido de estabelecer se o mesmo é benéfico, neutro ou maléfico em suas conseqüências para o organismo. Após esta, segue-se uma avaliação secundária visando estabelecer os recursos de que dispõe o organismo para fazer frente às demandas

que tal estímulo lhe impõe. Assim, psicologicamente falando, a reação de estresse é uma decorrência das duas avaliações.

No presente estudo, classificamos os estressores como biológicos, conforme sua natureza física ou química e como psicológicos aqueles de natureza psíquica. E definimos como estresse biogênico aquele produzido por ou originado de, estressores biológicos; e como estresse psicogênico aquele produzido por, ou originado de, estressores psicológicos.

1.2. O SISTEMA IMUNOLÓGICO

O sistema imunológico é o responsável pela proteção do organismo contra a invasão de agentes nocivos, tóxicos ou infecciosos, provenientes do meio externo. Tais agentes, ao penetrarem nos tecidos ou caírem na corrente sanguínea, desencadeiam um conjunto de respostas dos órgãos que compõe o sistema imune, resultando na ativação de células e produção de substâncias que irão destruir ou inativar a ação dos mesmos. Apesar de destinado primariamente à defesa do organismo contra a ação de agentes e substâncias estranhas ao mesmo (antígenos não próprios), em determinadas condições, tais mecanismos de proteção falham, podendo ser acionados contra células e substâncias do próprio organismo (antígenos próprios), resultando em um grupo de doenças chamadas auto-imunes (ABBAS *et al.*, 1998; SCROFERNEKER & POHLMANN, 1998). Deve-se acrescentar ainda que, mesmo no cumprimento do seu papel de proteção do organismo, o sistema imune pode, por sua ação, causar danos e lesões às estruturas do organismo, provocando sintomas e doenças (SCROFERNEKER & POHLMANN, 1998). Além da defesa contra agentes estranhos ao organismo, o sistema imune

desempenha importante função nos processos de reparação dos tecidos após estes sofrerem lesão (MAIER *et al.*, 1994).

Reconhece-se a existência de dois tipos de imunidade: a inata e a adquirida. A imunidade inata é natural ou não-específica e fornece uma proteção geral contra todos os tipos de invasores. Compreende a pele, as secreções ácidas e as enzimas digestivas (ROSSI, 1994), um conjunto de células especializadas (fagócitos, eosinófilos, células exterminadoras naturais-NK) bem como certos tipos de moléculas existentes no sangue (opsoninas, anafilatoxinas, interferons) todos já presentes no organismo desde o nascimento, antes do mesmo ser exposto a agentes infecciosos ou tóxicos (ABBAS *et al.*, 1998; SCROFERNEKER & POHLMANN, 1998).

A imunidade adquirida é a que se desenvolve no organismo após sua exposição aos agentes agressores. É uma imunidade específica e pode ser de dois tipos: imunidade humoral que é mediada por moléculas do sangue denominada anticorpos e que respondem pelo reconhecimento específico e a eliminação dos antígenos; e imunidade celular que é mediada por células altamente especializadas, onde os linfócitos T exercem um papel central (ABBAS *et al.*, 1998).

1.3. PSICONEUROIMUNOLOGIA

Até meados da década de 60, o sistema imune era conhecido por ser autônomo, reativo somente aos antígenos e auto-regulado. Por esta época iniciaram-se as pesquisas relacionando o sistema nervoso ao sistema imune. O termo psicoimunologia foi primeiramente usado por SOLOMON, no livro *Emotions, Immunity, and Disease*, quando especulou sobre as possíveis influências do sistema

nervoso central e, por extensão, dos processo psíquicos, sobre o sistema imunológico (SOLOMON, 1993).

Na década de 70 estabeleceram-se as bases científicas que demonstraram as interações entre processo psíquicos, sistema nervoso central e sistema imune. Credita-se a ADER o pioneirismo da comprovação experimental das relações mente-sistema imune, ao estabelecer o condicionamento pavloviano da resposta imune e a criação deste novo campo de saber multidisciplinar conhecido como psiconeuroimunologia (ADER & COHEN, 1975).

O desenvolvimento da psiconeuroimunologia significou profundas modificações na compreensão do sistema imunológico. Alguns dos aspectos mais marcantes nestas modificações dizem respeito à questão da autonomia e da auto-regulação do mesmo. A idéia de que o sistema imune era independente em seu funcionamento, isto é, livre e soberano em suas funções defensivas e capazes de promover os ajustes necessários para si próprio sem contar com a intervenção de outros sistemas orgânicos, foi substituída pela noção de uma rede interacional formada pelo sistema nervoso central e o sistema psíquico, sistema endócrino e sistema imune, segundo um processo de regulação mútua (DIENSTFREY, 1990). Esta mudança de enfoque foi além da simples mudança do ponto de vista estrutural para o ponto de vista funcional. Ela rompeu com os dualismos mente-corpo, organismo-ambiente, indivíduo-população (SOLOMON, 1993), implicando a assunção de um novo paradigma holístico, ecológico, nas relações intra e interorganismos, possibilitando os enormes avanços observados neste campo.

1.4. ESTRESSE E SISTEMA IMUNOLÓGICO

A demonstração do envolvimento da mente na regulação da resposta imune culminou no desenvolvimento de um campo de pesquisa extremamente fértil, onde têm-se destacado os trabalhos relativos a influência do estresse sobre o sistema imune (GLASER & KIECOLT-GLASER, 1994), infecção por vírus (SHERIDAN & DOBBS, 1994), imunodeficiência (KEMENY, 1994; SOLOMON *et al.*, 1991), câncer (LESHAN, 1992), bem como na aplicação de técnicas psicológicas como terapia coadjuvante nestas e em outras condições (SMITH JR., 1989). Destas pesquisas emergiram uma série de conhecimentos correlacionando estresse e sistema imune. Deste modo, sabe-se hoje que: a) "um estressor pode tanto suprimir como estimular diferentes respostas imunes ao mesmo animal ou indivíduo"; b) diferentes estressores podem ter diferentes efeitos sobre o mesmo parâmetro imune; e que há um número de variáveis que interagem para determinar o resultado imunológico da administração de um estressor (MOYINIHAN *et al.*, 1994).

1.5. ESTRESSE E SISTEMA CARDIOVASCULAR

Desde os primeiros trabalhos de SELYE, reconhece-se que o sistema cardiovascular é um dos que mais prontamente respondem as demandas impostas por um estressor. Aumento na frequência cardíaca, na pressão arterial e vasoconstrição são alguns dos bens conhecidos efeitos produzidos pelo estresse sobre o sistema cardiovascular. Os clássicos trabalhos sobre personalidade tipo A (FRIEDMAN & ROSEMAN, *apud* DIENSTFREY, 1990), ou então sobre os saudáveis efeitos da resposta de relaxamento (BENSON & KLIPPER, 1995),

ilustram tipicamente as afirmações anteriores. Em nosso meio, LIPP e ROCHA (1994) correlacionaram a existência do estresse no paciente hipertenso com a qualidade de vida do mesmo.

No campo da doença coronária, diversas abordagens tem sido utilizadas para evidenciar possíveis correlações entre a mesma e características psicológicas do paciente, como o tipo de personalidade ou o seu perfil psicológico ou ainda seus estados emocionais (RIBEIRO *et al.*, 1992; ONGARO, 1991; OLIVEIRA, 1995). Outros tem realçado a importância de características do meio social e da mudança social como fatores de risco para o desenvolvimento da mesma (CAMPOS, 1992). No entanto, as pesquisas têm evidenciado o importante papel do suporte social e da solidariedade na prevenção e/ou reabilitação do paciente coronário (CAMPOS, 1992).

1.6. PROLIFERAÇÃO LINFOCITÁRIA

A ligação dos receptores de membrana dos linfócitos com seus respectivos ligantes resulta em uma série de eventos intracelulares, coletivamente denominados de ativação dos linfócitos T. Esta sinalização transmembrânica causa uma mudança no comportamento do linfócito culminando com a ativação gênica induzindo proliferação dos linfócitos, produção de anticorpos e citocinas entre outros (ABBAS *et al*, 1998).

A habilidade dos linfócitos em responder *in vitro* a um ligante em particular é freqüentemente utilizado a nível clínico ou de pesquisa com o objetivo de avaliar a capacidade funcional dos linfócitos do sangue periférico. A mais conveniente forma de mensurar esta habilidade dos linfócitos é através da proliferação linfocitária *in*

vitro (devido ser de fácil quantificação e um método seguro quando comparado aos testes *in vivo*), onde os linfócitos (T) podem ser estimulados de maneira controlada e suas respostas podem ser mensuradas adequadamente (ABBAS *et al.*, 1998).

As respostas funcionais dos linfócitos podem ser estudadas mais facilmente pelo uso de ativadores policlonais, que se ligam aos complexos do TCR (receptor da célula T), independente da sua especificidade, simulando a ativação do complexo do TCR quando induzidas pelo antígeno associado ao MHC (ABBAS *et al.*, 1998). Muitos ligantes ou mitógenos podem atuar como ativadores policlonais e estimular a divisão dos linfócitos.

Muitas lectinas de plantas têm sido utilizadas em vários estudos imunológicos devido seu alto grau de especificidade por açúcares e poderem, em alguns casos, estimular células do sistema imune. Essas podem ser classificadas, de acordo com a sua capacidade em aumentar a síntese de DNA e de induzir transformação blástica em populações específicas de linfócitos em: mitogênicas, não mitogênicas ou indiferentes, (KÉRY, 1991).

Desta forma, os mitógenos apresentam origens diversas podendo ser oriundos de plantas como as lectinas Fito-hemaglutinina (PHA), purificada a partir de *Phaseolus vulgaris* na década de 60, Concanavalina A (Con A) purificada de *Canavalia ensiformis*, e PWM (Pokeweed mitogen) isolada de *Phytolacca americana*, de produtos bacterianos (Cowan 1, derivados de *Staphylococcus aureus*), de químicos (PMA, *Phorbol myristate acetate*), de antígenos amplamente distribuídos na natureza (*Cândida albicans* e toxoide tetânico) ou ainda serem citocinas e anticorpos monoclonais contra receptores de superfície (anti-CD3 ou anti-CD2).

A ativação de linfócitos por lectinas mitogênicas é comparável à ativação

antigênica, com conseqüentes modificações morfológicas, modulação fenotípica de determinantes de superfície e liberação de citocinas e imunoglobulinas (WHISLER & YATES, 1980). Por outro lado, contrastando-se com a atividade antigênica, a estimulação induzida pela lectina leva à ativação policlonal das células imune (WHISLER & YATES, 1980; MILLER *et al.*, 1982). Observações posteriores sugeriram que as lectinas mitogênicas interagem com TCR de linfócitos T, com ambas as cadeias α e β e dessa forma, transmitem sinais mitogênicos, levando a ativação policlonal destas células (CHILSON *et al.*, 1984, LECA *et al.*, 1986, CLEVERS *et al.*, 1988).

A PHA e a Con-A, foram extensivamente estudadas, no que concerne aos seus ligantes e seus efeitos biológicos sobre linfócitos. Esses mitógenos podem se ligar à diferentes moléculas de superfície das células T; dentre elas o receptor de células T (TCR), (CHILSON & KELLY-CHILSON, 1989, LICASTRO *et al.*, 1993), o complexo CD3 (CLEVERS *et al.*, 1988), ou mesmo CD2 (LECA *et al.*, 1986) (figura 1).

Algumas lectinas empregadas no estudo de ativação celular apresentam seletividade quanto ao perfil de citocinas induzidas e além da propriedade aglutinante, as lectinas podem também apresentar atividades imunomodulatórias tais como a indução de síntese e liberação de citocinas, estimulação da proliferação de linfócitos e ativação de citotoxicidade induzida por células T (LICASTRO *et al.*, 1993).

O interferon gama (IFN- γ) é uma glicoproteína homodimérica. Ele é produzido por linfócitos T auxiliar CD_4^+ , TH_1 , TH_0 e por quase todos os linfócitos T CD_8^+ . O IFN- γ é um potente ativador dos linfócitos mononucleares e de neutrófilos, atua também sobre os linfócitos T e B promovendo a sua diferenciação. No caso de

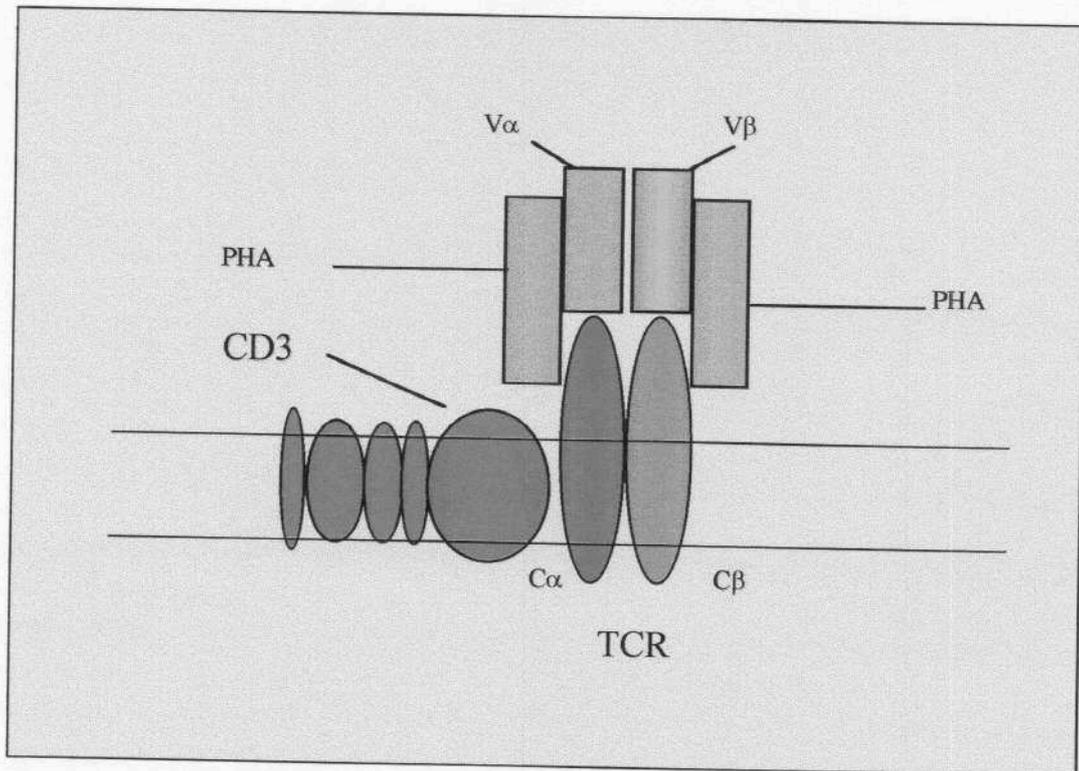


Figura 1. Esquema ilustrativo da ligação da lectina fitohemaglutinina (PHA) nas cadeias alfa (α) e beta (β) do receptor da célula T (TCR).
Fonte: LICASTRO *et al.*, 1993.

células T CD₄⁺ virgens promove a diferenciação ao subgrupo TH₁, e inibindo a proliferação de células TH₂ (ABBAS *et al.*, 1998).

A IL-5 é uma citocina homodimérica com aproximadamente 40 KD, produzida pela subpopulação TH₂ dos linfócitos T CD₄⁺ e por mastócitos ativados. A principal função da IL-5 é estimular o crescimento e diferenciação dos eosinófilos e ativação dos eosinófilos maduros (ABBAS *et al.*, 1998).

Desse modo, devido à sua fácil aplicação, as lectinas de plantas são utilizadas como ferramentas biológicas adequadas em várias investigações de processos imunológicos mediados por células, principalmente na indução da produção de citocinas e da proliferação celular (PEACOCK *et al.*, 1990).

A resposta proliferativa pode ser mensurada através de cultura de células do sangue total, células mononucleares ou ainda em cultura de subpopulações de linfócitos. Contudo, em muitos casos mais de um tipo celular é requerido para uma dada resposta. Desta forma, os protocolos mais freqüentemente utilizados nos ensaios de proliferação celular utilizam-se de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) (CLEVERS *et al.*, 1988).

Um dos mais freqüentes ensaios de proliferação linfocitária utiliza-se de uma medida indireta, a estimativa da produção de DNA, para avaliação da proliferação. Esta estimativa é realizada pela incorporação de um nucleosídeo radioativo, a timidina marcada com trítio (³H-timidina) no DNA recém formado no processo de multiplicação ou proliferação celular (KERY, 1991).

A resposta proliferativa a antígenos ou a mitógenos pode ser empregada clinicamente a nível de pesquisa em diversas anormalidades como doenças infecciosas, neoplasias, *stress*, cirurgias, *shock* e doenças autoimunes entre muitas (SELIGMANN, 1989).

2. OBJETIVOS

- Avaliar a resposta proliferativa das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) frente a diferentes doses do mitógeno fitohemaglutinina (PHA), em pacientes coronarianos submetidos a tratamento clínico e em indivíduos controles.
- Caracterizar o perfil de citocinas (TH_1/TH_2) obtidas das análises PBMC estimuladas com diferentes doses de PHA, em pacientes coronarianos submetidos a tratamento clínico e em indivíduos controles.

3. MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi desenvolvido sob prévia análise e aprovação pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

3.1. PACIENTES

Foram designadas para o grupo Clínico, 14 (quatorze) pacientes atendidos no Laboratório de Clínica Cardiovascular do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU), Minas Gerais, que após a primeira consulta, tiveram diagnóstico de doença coronariana e indicação para tratamento clínico.

Para ser incluído no grupo experimental, os pacientes enguadraram-se nos seguintes critérios:

- faixa etária de 30 (trinta) a 60 (sessenta) anos.
- ausência de doença concomitante.
- resposta ao protocolo de pesquisa (anexo II)
- assinatura do termo de consentimento em participar do estudo (anexo I).

3.2. GRUPO CONTROLE

Foram selecionados 13 (treze) indivíduos aparentemente saudáveis, sem história pregressa de coronariopatia, doadores de sangue do hemocentro do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFU). Para serem admitidos ao estudo, os doadores enquadraram-se nas seguintes condições:

- doadores voluntários.
- sem sinais de doença nos últimos 30 (trinta) dias.
- resposta ao protocolo de pesquisa (anexo II)
- assinatura do termo de consentimento em participar do estudo (anexo I).

3.3. AVALIAÇÃO DO ESTADO IMUNOLÓGICO

As coletas das amostras de sangue para avaliação do estado imunológico dos indivíduos foram realizadas na mesma oportunidade em que foram colhidos os dados para medir o estresse, ou seja, após a consulta médica para os indivíduos dos grupos experimentais e, após a coleta de sangue para os indivíduos do grupo controle.

Para avaliação da resposta imune celular, analisou-se a atividade funcional de linfócitos, que foram estimulados inespecificamente com o mitógeno Fitohemaglutinina (PHA).

3.4. OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO HUMANO (PBMC)

Coletou-se cerca de 35 ml de sangue em uma seringa contendo 5,8 ml de ácido cítrico-citrato-dextrose (ACD) pH 6,9. O sangue foi transferido para um tubo de prolipileno de 50 ml (Falcon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA), seguindo-se à centrifugação a 405g a 15°C por 15 minutos (centrífuga 5804 R-ependorf, Hamburg, Alemanha) para separar o plasma dos elementos figurados (hemácias e leucócitos). A seguir, o sobrenadante (plasma) foi retirado e transferido para um tubo de 15 ml onde adicionou-se 1,2 ml de solução de cloreto de cálcio 0,5 M e cloreto de magnésio 0,78 M ($\text{CaCl}_2 / \text{MgCl}_2$) e mantido em banho-maria a 37°C para desfibrinar. Após este tempo, retirou-se o soro e colocou-se novamente o tubo em banho-maria a 56°C por 30 minutos para inativação das proteínas do Sistema Complemento presentes no soro.

Paralelamente, adicionou-se solução salina tamponada com fosfato 0,01M, pH 7,2 (PBS) estéril, no tubo contendo os elementos figurados, até o volume de 40 ml e após homogeneizar transferiu-se 20 ml para outro tubo e novamente acrescentou-se PBS estéril até completar o volume de 35 ml. Em seguida, adicionou-se gentilmente 9 ml de histopaque ($d = 1,077$) na parte inferior da suspensão celular, seguindo-se à centrifugação a 871g a 15°C por 20 minutos. Em seguida, o sobrenadante (PBS + plasma) foi desprezado por aspiração com bomba de vácuo, deixando cerca de 1,5 cm do sobrenadante acima da nuvem celular (PBMC), a qual foi coletada com pipeta Pasteur e transferida para um tubo, completando-se com PBS gelado até 15 ml e centrifugou-se a 150g por 10 minutos a 4°C. Este procedimento foi repetido por duas vezes. O sedimento celular (PBMC)

foi ressuspenso com 5 ml de meio de cultura RPMI 1640 completo (meio RPMI contendo gentamicina e soro autólogo a 10%) e a suspensão celular mantida em banho de gelo até a contagem das células que foi realizada em câmara hemocitométrica de Neubauer.

3.5. MEDIDA DA ATIVIDADE FUNCIONAL DE LINFÓCITOS

3.5.1 RESPOSTA LINFOPROLIFERATIVA

A resposta proliferativa de linfócitos T a partir das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) humano foi medida de acordo com a seguinte técnica: acertou-se a concentração de células para 2×10^6 células/ml. Colocou-se 100 μ l (2×10^5 células) da suspensão celular em cada poço de uma placa de 96 poços de fundo chato (Falcon, Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, USA), estéril com tampa, previamente adicionado de 20 μ l de diferentes doses (2,0 μ g/ml; 0,5 μ g/ml e 0,125 μ g/ml) do mitógeno Fitohemaglutinina (PHA), completando-se o volume para 200 μ l/poço com meio completo autólogo, ou seja, 80 μ l por poço. Cada amostra foi analisada em triplicata. Após o plaqueamento, incubou-se em estufa a 5% de CO₂ a 37°C por 72 horas (3 dias). Após 56 horas de proliferação, as células foram pulsadas (25 μ l/poço) com 0,5 μ Ci de Timidina tritiada [³H] (New England Nuclear, Boston, USA) por poço e incubadas por mais 16 horas. As células foram coletadas em filtro de fibra de vidro (Cambridge Technology, Watertown, USA), por meio de coletor de células ("Cell Harvester" - Cambridge Technology; INC. PHD).

Para a leitura da incorporação da timidina tritiada pelo DNA das células,

foram adicionados 2 ml de líquido de cintilação, constituído por 1 l de tolueno (Sunth, Diadema, Brasil), 5g de PPO ($C_{15}H_{11}NO$) ("2,5-Diphenyloxazole") (Merck, Darmstadt, Alemanha) e 0,1 g de POPOP ($C_{24}H_{16}N_2O_2$) ["1,4-Bis (5-phenyl-2-oxazolyl) benzene, 2,2'-p-phenylene-bis (5-phenyloxazole)"] (Merck, Darmstadt, Alemanha) em cada tubo contendo os filtros oriundos de cada poço da placa de cultura. Os tubos foram lidos em contador β de cintilação líquida (Beckman LS 6000, Liquid Scintillation System, Fullerton, USA) em c.p.m (contagem por minuto) do Laboratório de Imunoparasitologia da Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro (Uberaba-MG). Os resultados foram expressos em cpm e em Índice de Estimulação (I.E.), calculado pela fórmula: $I.E. = \frac{\text{Média da triplicata (c.p.m.) dos poços com estímulo}}{\text{Média da triplicata (c.p.m.) dos poços sem estímulo (com apenas meio de cultura)}}$.

3.5.2 PRODUÇÃO DE CITOCINAS

Para a produção de citocinas, utilizou-se a seguinte técnica: Colocou-se 500 μ l (1×10^6 células/ml) da suspensão celular (PBMC) em cada poço de uma placa de 48 poços, previamente adicionada de 100 μ l do mitógeno PHA em diferentes concentrações (2,0; 0,5 e 0,125 μ g/ml), em seguida, adicionou-se 400 μ l de meio completo autólogo completando o volume para 1000 μ l. Em seguida, a placa foi levada para estufa a 5% de CO_2 a 37°C por 2, 3 e 5 dias, quando coletou-se, de poços independentes, o sobrenadante, e estocou-se a -70°C até sua análise. Os sobrenadante foram analisados quanto à produção de interferon-gama (IFN- γ) e interleucina-5 (IL-5) pela técnica de ELISA de duplo anticorpo (*sandwich.*), segundo protocolo recomendado pelos fabricantes.

3.5.3 DETECÇÃO DAS CITOCINAS IFN- γ E IL-5

De uma forma geral, as citocinas IFN- γ e IL-5 foram dosadas por meio de um ensaio imunoenzimático (ELISA - Enzyme-linked immunosorbent assay) tipo *sandwich*. O teste ELISA tem como princípio o reconhecimento da formação do complexo antígeno-anticorpo (Ag-Ac). Num primeiro momento, ocorre a interação entre um anticorpo específico (anticorpo de captura), adicionado a uma placa de 96 poços, com um antígeno contido na amostra testada. Em uma segunda etapa, ocorre a identificação do complexo Ag-Ac, através de um anticorpo específico ao antígeno pesquisado, conjugado a uma substância com alta afinidade de ligação a enzima que será adicionada na fase seguinte (anticorpo de detecção).

Em seguida, adiciona-se o substrato com uma solução cromógena para a visualização dos resultados. O grau de reatividade do ensaio é analisado pela intensidade da coloração e determinado através dos valores de absorbância em leitor de ELISA para microplacas.

Neste experimento, os testes foram realizados segundo protocolos recomendados pelo fabricante dos anticorpos (R&D Systems, USA) com algumas modificações (figura 2). Em resumo, microplacas de poliestireno de alta afinidade com 96 poços (Corning - Laboratory Sciences Company, N.Y., USA.), foram sensibilizadas (50 μ l/poço) com os respectivos anticorpos monoclonais de captura: Anti-IFN- γ (MAB285 - 4 μ g/ml) diluído em PBS; e anti-IL-5 (2 μ g/ml) diluído em tampão carbonato-bicarbonato a 0,06M, pH 9,6. As placas foram incubadas em câmara úmida por aproximadamente 18 horas, a placa contendo IFN- γ foi mantida à temperatura ambiente e a placa com IL-5 foi mantida a 4° C.

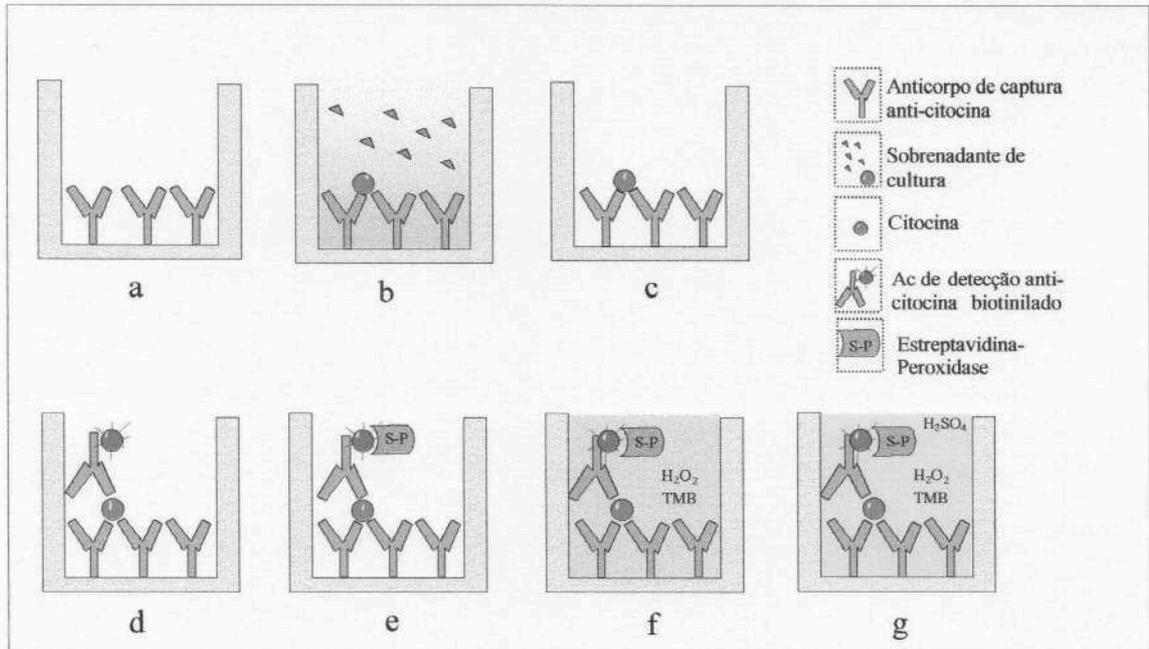


Figura 2. Esquema do ensaio imunoenzimático (ELISA) para determinação dos níveis de citocinas (IFN- γ e IL-5) em amostras de sobrenadantes de cultura de PBMC. (a): anticorpo monoclonal de captura específico a citocina; (b): adição da amostra de sobrenadante; (c): após lavagem, permanece a citocina específica ligada ao Ac de captura; (d): adição do anticorpo de detecção biotinizado anti-citocina específico; (e): adição do conjugado estreptavidina-peroxidase (S-P); (f): revelação da reação realizada pela adição do substrato enzimático (H_2O_2 e TMB); (g): adição de H_2SO_4 2N.

Em seguida, as placas foram lavadas por 5 vezes em PBS contendo Tween 20 (Polyoxyethylene - Sorbitan Monolaurate - SIGMA) a 0,05% (PBS-T) e, subseqüentemente, bloqueadas com 200 μ l/poço de solução de PBS adicionado de Soroalbumina Bovina (BSA -SIGMA) a 1% por 1 h, em temperatura ambiente. Após o bloqueio, as placas foram submetidas a cinco ciclos de lavagem em PBS-T e seguiu-se a adição (50 μ l/poço), em duplicata, dos sobrenadantes de cultura (PBMC) dos pacientes e controles, para IFN- γ e IL-5. Paralelamente, foram realizadas

curvas padrões, em duplicata, utilizando-se para cada citocina pesquisada, a respectiva citocina humana recombinante, em diluições duplas seriadas em meio RPMI 1640 mais 10% de soro humano AB. A concentração inicial de cada curva foi de 10 ng/ml para IFN- γ e de 20 ng/ml para IL-5. Após incubação, por 2h a temperatura ambiente, as placas foram novamente lavadas por 5 vezes com PBS-T. Logo após, adicionou-se 50 μ l/poço dos anticorpos policlonais secundários biotinizados anti-IFN- γ e anti-IL-5, nas concentrações de 0,2 μ g/ml e 0,5 μ g/ml, respectivamente, em PBS-T-BSA 1%. As microplacas foram, novamente, incubadas por mais 2h em câmara úmida a temperatura ambiente.

Procedeu-se a novas lavagens, como anteriormente descrito e a adição (50 μ l/poço) do conjugado Estreptavidina-Peroxidase (SIGMA - Sigma Chemical CO., USA. S-5512) na diluição 1:1000 em PBS-T-BSA 1%, incubando-se as placas por 30 minutos à temperatura ambiente.

Após a última lavagem (5X), a reatividade foi revelada pela adição de substrato enzimático (50 μ l/poço) de tetrametilbenzidina (TMB) (Sigma Chemical Co., USA), diluído em tampão citrato-fosfato 0,1M, pH 4,5 e 0,03% de H₂O₂. Após aproximadamente 10 minutos de incubação, a reação foi interrompida pela adição de 25 μ l em cada poço de ácido sulfúrico (H₂SO₄) 2 N. A leitura foi realizada em leitor de microplacas ELISA (Titertek Multiskan Plus MK II - Flow Laboratories, USA) em filtro de 450 nm e 570 nm.

Os valores de absorbância obtidos das amostras dos sobrenadantes de cultura de PBMC foram convertidos em ng/ml de acordo com a curva padrão, utilizando-se do *software* Microplate Manager PC versão 4.0 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Os níveis de citocina variaram 0,01 a 10 ng/ml para o ensaio de IFN- γ e de 0,01 a 20 ng/ml para IL-5. As amostras que apresentaram

valores extrapolados acima da curva padrão, foram novamente testadas em maiores diluições.

3.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para todos os cálculos estatísticos utilizou-se o *software* GraphPad Prism versão 3.0 (GraphPad Prism Software, Inc).

Utilizou-se o teste “t” de *Student* para comparações das médias entre os grupos estudados.

A correlação de *Pearson* avaliou a correlação dos níveis de IFN- γ com os de IL-5.

Considerou significativos os resultados menores que 5% ($p < 0,05$).

3.9. NORMAS DE BIOSSEGURANÇA

Todas as atividades realizadas durante a pesquisa foram executadas obedecendo-se as normas de biossegurança, segundo BORGES & MINEO (1997).

4. RESULTADOS

4.1. RESPOSTA LINFOPROLIFERATIVA

A figura 3 ilustra a resposta linfoproliferativa de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de 8 pacientes coronarianos e de 7 indivíduos controles, estimuladas com fitohemaglutinina (PHA) em diferentes concentrações.

Entre os pacientes coronarianos, as médias geométricas da incorporação de ^3H -Timidina, pelas PBMC não estimuladas (somente meio de cultura) ou estimuladas com PHA nas concentrações de 2,0, 0,5 e 0,125 $\mu\text{g/ml}$ foram respectivamente de 401, 12410, 6649 e 750 cpm (contagem por minuto). Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) quando comparados com as médias geométricas obtidas entre os indivíduos do grupo controle que foram respectivamente de 336, 13610, 10780 e 767 cpm (figura 3A).

Similarmente, analisando o índice de estimulação (IE), não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre as médias geométricas obtidas de PBMC de pacientes coronarianos estimuladas com PHA nas concentrações de 2,0 $\mu\text{g/ml}$ (32,5) e 0,125

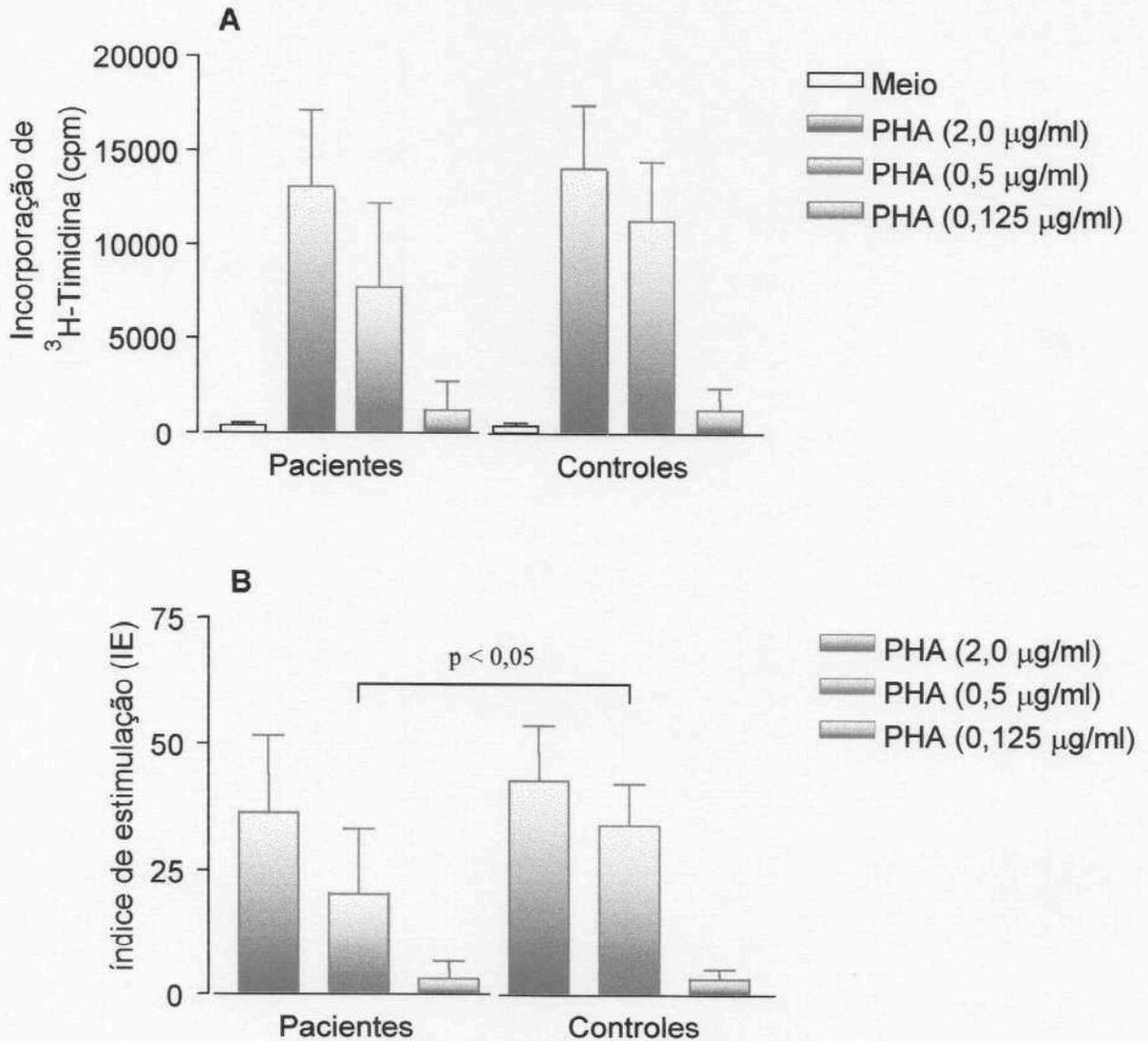


Figura 3. Resposta linfoproliferativa de PBMC, após 3 dias de cultivo, estimuladas com fitohemaglutinina (PHA) nas concentrações de 2,0; 0,5 e 0,125 $\mu\text{g/ml}$ ou não estimuladas (somente meio de cultura) de 8 pacientes coronarianos e 7 indivíduos controles. Os resultados expressos representam a média da incorporação de ^3H -timidina em cpm (A); e a média do índice de estimulação (IE) de cada grupo obtido pela razão entre a leitura (em cpm) de células estimuladas com PHA pela leitura (em cpm) de células não estimuladas (meio) (B).

$\mu\text{g/ml}$ (1,9) quando comparada as médias de índice de estimulação obtidos pelos indivíduos controles (41,2 e 2,4, respectivamente). Entretanto, somente para PBMC estimuladas com PHA na concentração de 0,5 $\mu\text{g/ml}$, observou-se valores de índice de estimulação significativamente menores ($p = 0,0345$) entre pacientes coronarianos (IE = 17) que nos indivíduos controles (IE = 32,7) (figura 3B).

4.2. CINÉTICA DA PRODUÇÃO DOS NÍVEIS DE CITOCINAS

Para verificar os níveis de citocinas (IFN- γ e IL-5) secretadas nos sobrenadantes de cultura estimulou-se PBMC de 14 pacientes coronarianos e de 13 indivíduos controles com PHA nas concentrações de 2,0, 0,5 e 0,125 $\mu\text{g/ml}$. A cinética da produção das citocinas foi então avaliada após 2, 3 e 5 dias de estimulação com PHA 2,0 e 0,5 $\mu\text{g/ml}$.

Analisando-se os valores de cpm, constatou-se que as melhores respostas linfoproliferativas foram obtidas nas concentrações de PHA 2,0 e 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Quando comparou-se os valores de IFN- γ obtidos nos sobrenadantes, inicialmente verificou-se que as células estimuladas com PHA na concentração de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ não responderam satisfatoriamente em relação a PHA 2,0 $\mu\text{g/ml}$. Desta forma, optou-se em realizar os ensaios imunoenzimáticos (ELISAs) para detecção de IFN- γ somente nos sobrenadantes oriundos de culturas estimuladas com PHA 2,0 $\mu\text{g/ml}$ uma vez que somado a este fato, não dispunha-se de reagentes suficientes para a realização das dosagens de IFN- γ em todos os sobrenadantes.

Conforme pode-se observar na figura 4, níveis de IFN- γ (ng/ml) foram detectados em todos os dias de cultura, sendo que valores máximos foram obtidos no 2^o dia após

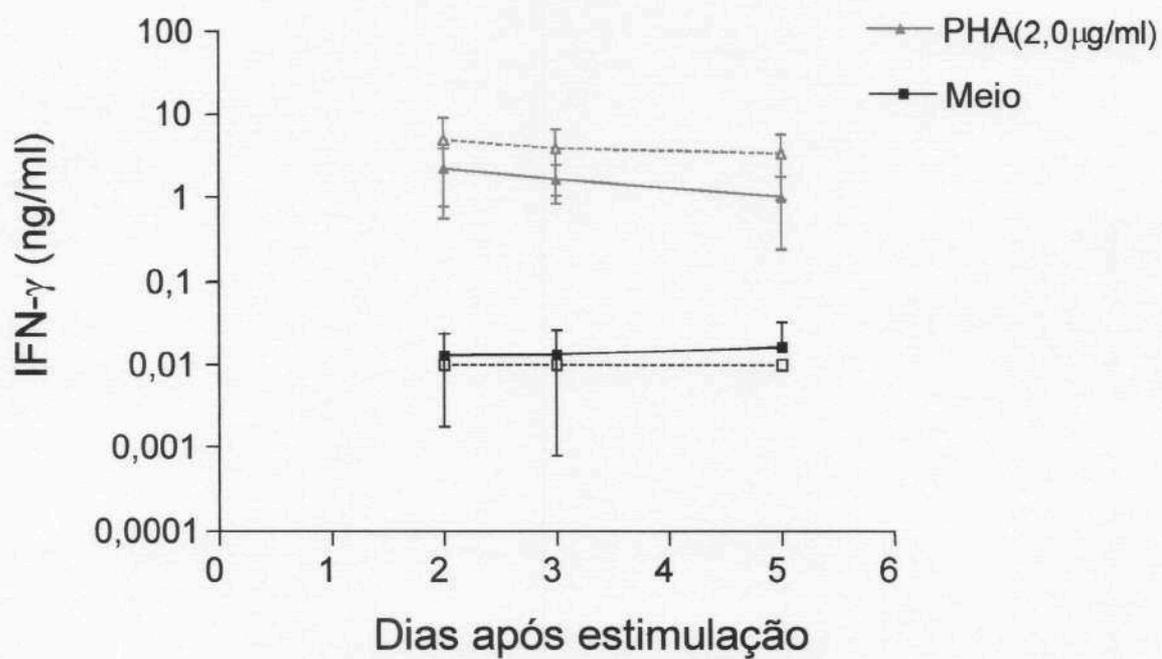


Figura 4. Cinética dos níveis de IFN- γ (ng/ml) detectados em sobrenadantes de culturas de PBMC de pacientes coronarianos (linha contínua) e indivíduos controles (linha tracejada) estimuladas com fitohemaglutinina (PHA) na concentração de 2,0 μ g/ml ou não estimuladas (somente meio de cultura). Os valores representam a média e o desvio padrão de 14 pacientes coronarianos e 13 indivíduos controles.

estimulação com PHA na concentração de 2,0 $\mu\text{g/ml}$, fato observado tanto nos sobrenadantes de cultura de PBMC de pacientes coronarianos como na cultura de indivíduos controles.

Houve diferença significativa entre a média geométrica dos níveis de IFN- γ obtida nos grupos de pacientes coronarianos e de indivíduos controles após 2 (1,7 *versus* 3,0 ng/ml; $p = 0,0321$), 3 (1,4 *versus* 2,6 ng/ml; $p = 0,009$) e 5 (0,5 *versus* 2,0 ng/ml; $p = 0,002$) dias de estimulação com PHA a 2,0 $\mu\text{g/ml}$.

As médias dos níveis de IFN- γ detectados nos sobrenadantes de cultura sem estimulação (somente meio) foram inferiores às obtidas após estimulação com PHA, permanecendo em níveis basais nos 3 dias de cultivo analisados.

A figura 5 demonstra a cinética dos níveis de IL-5 em sobrenadantes de cultura de PBMC de pacientes coronarianos e de indivíduos controles após 2, 3 e 5 dias de estimulação com PHA nas concentrações de 2,0 e 0,5 $\mu\text{g/ml}$. Desta forma, observou-se que IL-5 pôde também ser detectada nos sobrenadantes em todos os dias de cultivo, com valores médios máximos ao 3^o dia após estimulação com PHA a 2,0 $\mu\text{g/ml}$ tanto para pacientes coronarianos e indivíduos controles e, com PHA a 0,5 $\mu\text{g/ml}$ para indivíduos controles. Entretanto, para pacientes coronarianos, valor médio máximo de IL-5 foi detectado no 5^o dia após estimulação com PHA a 0,5 $\mu\text{g/ml}$.

Não houve diferença significativa entre a média dos níveis de IL-5 detectados nos grupos de pacientes coronarianos e de indivíduos controles aos 2 dias (0,6 *versus* 0,5 ng/ml; $p = 0,5139$), 3 dias (0,7 *versus* 0,5 ng/ml; $p = 0,4037$) e 5 dias (0,7 *versus* 0,5 ng/ml; $p = 0,5424$) após estimulação com PHA a 2,0 $\mu\text{g/ml}$ (figura 5). Similarmente, analisando-se os níveis de IL-5 detectados nos sobrenadantes de

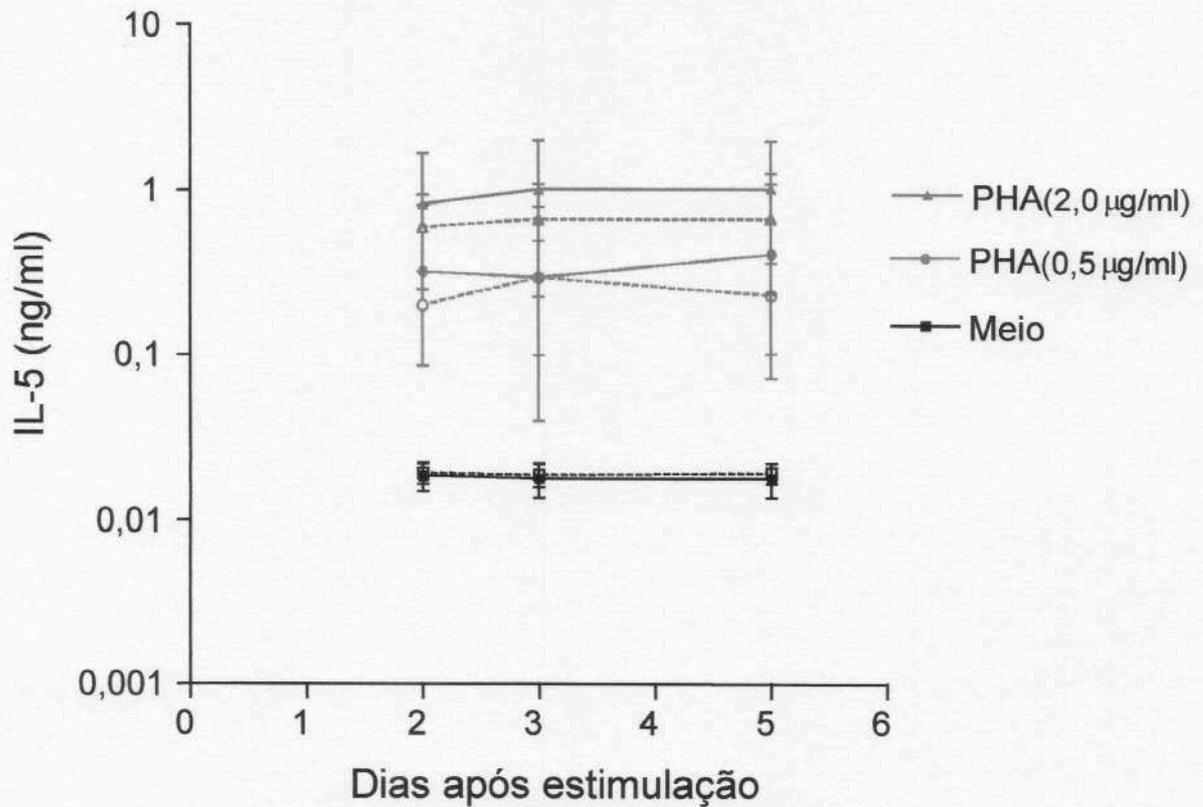


Figura 5. Cinética dos níveis de IL-5 (ng/ml) detectados em sobrenadantes de culturas de PBMC de pacientes coronarianos (linha contínua) e indivíduos controles (linha tracejada) estimuladas com fitohemaglutinina (PHA) nas concentrações de 2,0 e 0,5 µg/ml e não estimuladas (somente meio de cultura). Os valores representam a média e o desvio padrão de 14 pacientes coronarianos e 13 indivíduos controles.

cultura de PBMC após estimulação com PHA a 0,5 $\mu\text{g/ml}$, observou-se não haver diferença significativa entre os grupos de pacientes coronarianos e de indivíduos controles aos 2 dias (0,2 *versus* 0,2 ng/ml ; $p = 0,5899$), 3 dias (0,2 *versus* 0,2 ng/ml ; $p = 0,5218$) e 5 dias (0,2 *versus* 0,2 ng/ml ; $p = 0,9425$) após estimulação.

A média dos níveis de IL-5 detectados nos sobrenadantes de cultura sem estimulação (meio) foram inferiores aos determinados nos sobrenadantes estimulados em ambas as concentrações de PHA (2,0 e 0,5 $\mu\text{g/ml}$), permanecendo em níveis basais nos 3 dias de cultivo analisados.

4.3. CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS DE IFN- γ E OS NÍVEIS DE IL-5

Analisando-se os resultados das médias quanto aos níveis de IFN- γ (figura 4) maiores valores foram obtidos após 2 dias de estimulação com PHA 2,0 $\mu\text{g/ml}$. Contudo para IL-5 (figura 5), os maiores valores foram obtidos com PHA 2,0 $\mu\text{g/ml}$ com 3 e 5 dias após estimulação, não havendo diferença significativa entre eles. Desta forma, optou-se correlacionar os níveis de IFN- γ a 2,0 $\mu\text{g/ml}$ após 2 dias com os de IL-5 após a 2,0 $\mu\text{g/ml}$ 3 dias de estimulação.

Conforme observado na figura 6A, no grupo de pacientes coronarianos não houve correlação ($r = -0,2743$) entre os níveis de IFN- γ e de IL-5 detectados nos sobrenadantes de cultura de PBMC, respectivamente, após 2 e 3 dias de estimulação, com PHA a 2,0 $\mu\text{g/ml}$ ($p = 0,3425$). De forma semelhante, no grupo de indivíduos controles (figura 6B), os níveis de IFN- γ e de IL-5, não se correlacionaram significativamente ($r = -0,1423$; $p = 0,6429$).

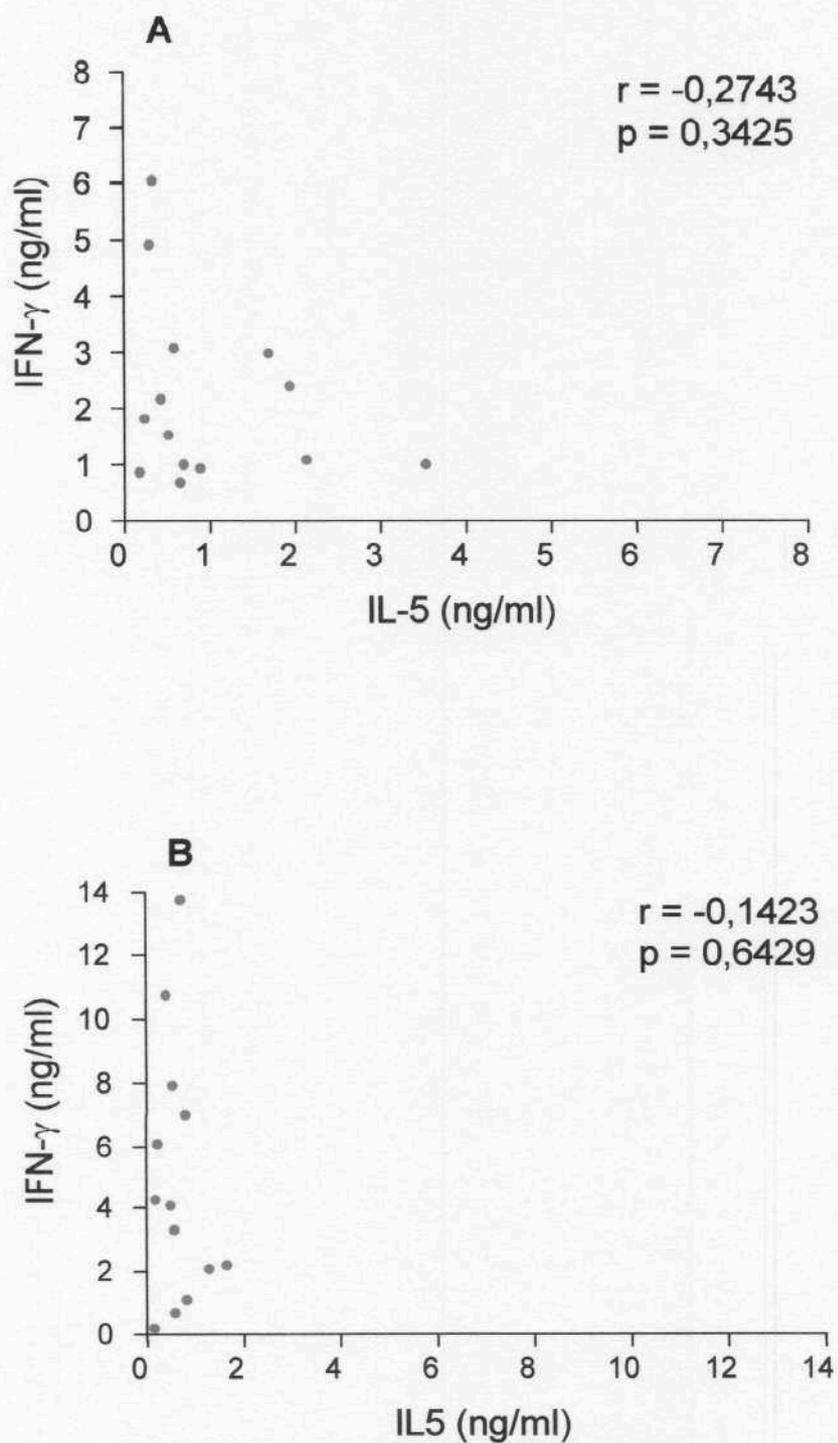


Figura 6. Correlação entre os níveis de IFN- γ (ng/ml) e IL-5 (ng/ml) detectados em sobrenadantes de culturas de PBMC após 2 e 3 dias respectivamente de estimulação com fitohemaglutinina na concentração de 2,0 μ g/ml entre 14 pacientes coronarianos (A) e 13 indivíduos controles (B).

Entretanto, observou-se que 4 pacientes apresentaram produção significativa de IL-5, não ocorrendo o mesmo entre os sobrenadantes de culturas de indivíduos controles. Além disso, pode ser visto que o nível médio de IFN- γ produzidos pelas PBMC de indivíduos controles foram superiores aos observados no grupo de pacientes clínicos (figura 6A e 6B).

4.4 RELAÇÃO IFN- γ / IL-5

Não houve diferença significativa ($p = 0,1102$) na média geométrica da relação IFN- γ / IL-5 obtida entre pacientes coronarianos (2,6) e indivíduos controles (5,7). Apesar de mostrar tendência menor para pacientes coronarianos e maior para indivíduos controles, isto é, menor valor de IFN- γ em relação a IL-5, foi observada somente em 2 pacientes e em nenhum dos indivíduos controles. Valores significativos (relação IFN- γ / IL-5 > 1) foram observados em 12 pacientes coronarianos e em todos os indivíduos controles (tabela 1 e 2).

Tabela 1. Resposta linfoproliferativa avaliada pela incorporação de ^3H -Timidina (cpm e índice de estimulação - IE) e perfil de citocinas (IFN- γ e IL-5) de PBMC de 14 pacientes coronarianos estimuladas com fitohemaglutinina (PHA) na concentração de 2,0 $\mu\text{g/ml}$ ou 0,5 $\mu\text{g/ml}$.

Pacientes	Incorporação de ^3H -Timidina cpm (IE)		Citocinas		
	PHA	PHA	IFN- γ	IL-5	IFN- γ / IL5
	(2,0 $\mu\text{g/ml}$)	(0,5 $\mu\text{g/ml}$)	(ng/ml)	(ng/ml)	
EG	16.819 (52,7)	12.685 (39,8)	1,0	3,5	0,3
EA	13.578 (38,3)	10.349 (29,2)	1,5	0,5	3,0
MG	18.880 (44,6)	14.848 (35,1)	1,0	0,9	1,1
OK	14.184 (55,8)	3.956 (15,6)	1,1	2,1	0,5
LS	10.700 (28,3)	4.015 (10,6)	2,4	1,9	1,3
GF	7.512 (20,3)	3.412 (9,2)	6,0	0,3	20,0
NF	14.487 (37,4)	7.252 (15,6)	1,8	0,2	9,0
PN	7.883 (11,4)	7.986 (7,2)	2,2	0,4	5,5
SL	nr	nr	0,8	0,2	4,0
VN	nr	nr	3,1	0,6	5,2
IV	nr	nr	3,0	1,7	1,8
PB	nr	nr	0,7	0,6	1,2
FF	nr	nr	1,0	0,7	1,4
FR	nr	nr	4,9	0,3	16,3
mg	12.410 (32,4)	6.649 (17)	1,7	0,7	2,6

Resposta linfoproliferativa e níveis de IL-5 foram obtidos após 3 dias de estimulação. Níveis de IFN- γ foram detectados nos sobrenadantes de cultura após 2 dias de estimulação.

nr: não realizado. mg: média geométrica.

Tabela 2. Resposta linfoproliferativa avaliada pela incorporação de ^3H -Timidina (cpm e índice de estimulação - IE) e perfil de citocinas (IFN- γ e IL-5) de PBMC de 13 indivíduos controles estimuladas com fitohemaglutinina (PHA) na concentração de 2,0 $\mu\text{g/ml}$ ou 0,5 $\mu\text{g/ml}$.

Controles	Incorporação de ^3H -Timidina cpm (IE)		Citocinas		
	PHA (2,0 $\mu\text{g/ml}$)	PHA (0,5 $\mu\text{g/ml}$)	IFN- γ (ng/ml)	IL-5 (ng/ml)	IFN- γ / IL5
WS	15.839 (45,2)	11.655 (33,3)	7,9	0,5	15,8
PB	18.412 (48,5)	12.303 (32,4)	1,1	0,8	1,4
GS	16.882 (24,4)	14.885 (21,5)	2,2	1,7	1,3
CA	11.562 (41,7)	7.541 (27,5)	7,0	0,8	8,8
SO	9.400 (59,9)	7.131 (45,4)	2,1	1,3	1,6
NA	11.071 (35,7)	9.885 (31,9)	4,0	0,5	8,0
LR	14.635 (41,9)	14.925 (42,9)	0,7	0,6	1,2
MO	nr	nr	13,7	0,4	34,3
MT	nr	nr	10,7	0,5	21,4
GP	nr	nr	6,1	0,5	12,2
MS	nr	nr	0,2	0,1	2,0
JC	nr	nr	3,3	0,7	4,7
IM	nr	nr	4,2	0,2	21,0
mg	13.610 (41,1)	10.780 (32,7)	3,0	0,5	5,7

Resposta linfoproliferativa e níveis de IL-5 foram obtidos após 3 dias de estimulação. Níveis de IFN- γ foram detectados nos sobrenadantes de cultura após 2 dias de estimulação.

nr: não realizado. mg: média geométrica.

5. DISCUSSÃO

A geração da resposta imune depende das interações entre as moléculas na superfície da célula T e seus ligantes, alguns dos quais são solúveis enquanto outros estão ligados a membrana (RIVAS *et al.*, 1995).

As células do sistema imune são produzidas na medula óssea, timo, nódulos linfáticos, e diferenciadas no baço, tonsilas e placas de Peyer. Devido a dificuldade de obter células destes órgãos, muitos estudos de processos imunes em humanos utilizam células circulantes do sangue periférico. O sangue transporta componentes imunes entre os órgãos, tendo desta forma um importante papel nos processos imunes (COHEN & HERBERT, 1996).

Desta forma diversos reagentes têm sido empregados *in vitro* para estimular e induzir a proliferação das células T, de forma independente do complexo antígeno-MHC/TCR. Os ativadores policlonais de células T têm possibilitado estudar a resposta imune dentro do complexo de subpopulações das células T existentes (SHARON, 1983). A fitohemaglutinina (PHA) foi um dos primeiros ativadores policlonais de célula T reconhecidos (NOWELL, 1960), e devido ao fato de poder

induzir resposta proliferativa, ela está entre uma classe de reagentes denominados de mitógenos, seletivo de células T quando comparado com PWM (pokeweed mitogen) que é um mitógeno de células T e B. Sua relativa seletividade mitogênica é devido a sua capacidade de ligação específica a receptores relevantes envolvidos na ativação fisiológica das células T, o TCR, presente em todas as subpopulações (KANELLOPOULOS, 1985). Entretanto, sua capacidade de ativar as células T é dependente da expressão e função do TCR (WEISS, 1987).

Em resposta a ligação da PHA ao TCR ocorre uma série de eventos iniciais como ativação da tirosina-quinase, degradação de fosfolipídios de membrana, elevação da proteína-quinase C e elevação do cálcio citoplasmático culminando com a transcrição de genes necessários para a resposta proliferativa e efetora do linfócito T. E juntamente com a mensuração da atividade mitótica (pela incorporação da ^3H -timidina ao DNA recém sintetizado), as dosagens de citocinas (ambos *in vitro*) são os testes mais freqüentemente usados na avaliação da ativação dos linfócitos T (ABBAS *et al.*, 1998).

Durante os últimos 10-20 anos se tornou claro que o sistema imunológico não apenas protege o indivíduo contra doenças oportunistas mas também interagem tanto com o sistema nervoso quanto com o endócrino. Hoje sabemos que as células imunológicas tem receptores para hormônios e neurotransmissores, e que os receptores de citocina se expressam em certa áreas do cérebro. Além disso, em muitos cobaias a supressão de imunidade foi induzida por condicionantes clássicos. Alguns estudos *in vitro* mostraram sinais de reduzida imunidade em indivíduos durante estresse agudos e crônico. Alguns estudos também indicaram que o estresse crônico aumenta o risco de infecções e câncer. De outro lado várias técnicas psicoterapêuticas parecem fortalecer o sistema imunológico. Como para

doença imunológica, sabemos que os fatores psicológicos são importantes no caso da asma alérgica (KJELDTSEN-KRAGH, 1996).

Assim sendo, neste estudo procurou-se através do cultivo *in vitro* de PBMC de pacientes coronarianos e indivíduos controles avaliar a resposta proliferativa de linfócitos T e determinar o perfil de citocinas frente a diferentes doses do mitógeno PHA.

Desta forma a proliferação das células T após 3 dias de estimulação com PHA nas concentrações de 2,0; 0,5 e 0,125 $\mu\text{g/ml}$ foi avaliada através da incorporação de ^3H -timidina pelas células para a síntese de DNA recém formado na fase S do ciclo celular, adicionadas nas últimas 16 horas de cultivo.

Não observou diferença significativa entre os grupos estudados (pacientes coronarianos e indivíduos controles) quando avaliou-se a incorporação de ^3H -timidina, pela cpm, nas concentrações de PHA empregadas (figura 3). Entretanto, quando avaliou-se a incorporação de ^3H -timidina pelo índice de estimulação, notou-se haver diferença entre os grupos somente quando estimulou PBMC na concentração de 0,5 $\mu\text{g/ml}$ de PHA, uma vez que as células de PBMCs do grupo de indivíduos controles, em média, apresentaram proliferação superior ao grupo de pacientes coronarianos. Esta concentração de PHA mostrou-se adequada para evidenciar a diferença de proliferação das células T entre os grupos de pacientes coronarianos e de indivíduos controles, possivelmente devido a diferença de estresse a que ambos os grupos estavam submetidos.

HERBERT *et al.* (1994) mostraram que mudanças imunes, tanto no número de células como na função, podem ser encontrados 5 minutos após o início da ação do "estressor". As mais consistentes mudanças imunes seguidas da exposição a um "estressor" incluem aumento de células NK e do número de células T

supressoras/citolíticas e decréscimo da resposta proliferativa a mitógenos, principalmente PHA (HERBERT *et al.*, 1994; MANUCK *et al.*, 1991; NALIBOFF *et al.*, 1991; ZAKOWSKI *et al.*, 1992).

No entanto, analisando-se isoladamente pacientes coronarianos (tabelas 1), observou-se dados diferentes, ou seja, pacientes que aparentemente apresentavam com estresse na hora da coleta dos dados e sangue não apresentaram necessariamente uma queda no seu estado imunológico. O alto índice de estimulação (IE =10) observado na maioria dos pacientes sugere que reagiram satisfatoriamente a estimulação com PHA e que possivelmente não estavam imunocomprometidos.

Deve-se ressaltar, ainda, que provavelmente estes pacientes coronarianos estavam submetidos a estresse crônico ou psicológico, fato este que não levou a uma alteração no estado imunológico destes pacientes. Entretanto, os indivíduos controles, teoricamente menos estressados que os pacientes coronarianos, também mostraram-se imunologicamente aptos a responder ao estímulo com PHA. WLASZCZYK *et al.* (1997) em estudo com pacientes cardíacos submetidos a cirurgia, observaram que a proliferação de PBMC dependia da reatividade imune no período pré-operatório. Inúmeros trabalhos liga estresse a doenças (Cassel; Doge e Martins; Holmes e Rahe; Sely; Wolff, etc.) citados por JALOWIEC E POWER (1981), a natureza dessa ligação permanece obscura. As pessoas reagem diferentemente ao estresse, inclusive em termos de doenças. Parece haver uma espécie de filtro através do qual os eventos ambientais são percebidos pelo indivíduo. Isto faria distinguir situações estressantes e situações percebidas como estressantes. Seriam estas últimas as que teriam valor psicológico (CLOVER *et al.*, 1989). Sem dúvida parece haver correlação entre quantidade de situações

estressantes e a resultante percepção do estresse. Mas parece haver um efeito moderador ou hipertrofiador que depende do próprio indivíduo em função de sua constituição, história e circunstância. O mesmo se aplica ao modo de reagir, de enfrentar, de se adaptar ao estresse, que aparece também influenciado por circunstâncias particulares, próprias do indivíduo (GLASER & GOTLIEB-STEMATSKY, 1982).

Desde 1962, MEYER & HAGGERTY indicaram que o estresse crônico familiar estava associado com o maior risco para desenvolvimento de doenças do trato respiratório superior. Posteriormente CLOVER *et al.*, 1989, concluiu que famílias estressadas apresentavam maior incidência de gripe (influenza Vírus) do que em famílias não estressadas.

No entanto HERBERT & COHEN, 1993 comparou indivíduos controles saudáveis com indivíduos clinicamente deprimidos e verificou que estes apresentaram menor respostas proliferativa para PHA, Con A e PWM; menor ativação de NK, maior número de células T auxiliares e células T citotóxicas. Entretanto pessoas deprimidas geralmente dormem menos, fumam mais, exercitam-se menos e usam álcool e outras drogas quando comparadas com pessoas não deprimidas (GREGORY & SMELTZER, 1983; GRUNBERG & BAUN, 1985).

A resposta imune celular tem um papel importante na proteção inicial a infecção por herpes vírus e na manutenção do seu estado de latência (GLASER & GOTLIEB-STEMATSKY, 1982). Uma possível explicação do aumento de anticorpos para herpes vírus é que freqüentemente a infecção está associada com condições de estresse suprimindo a função imune celular. Entretanto, HOON *et al.*, (1991) estudando o papel do estresse na recorrência do herpes indicaram que o aumento na vulnerabilidade a doença de forma geral é que é o causador da recorrência ao

herpes.

Outro exemplo do papel do estresse na susceptibilidade a doenças é na infecção por HIV. Nem todas as pessoas expostas ao vírus tornam-se infectadas. Variáveis psicológicas contribuem para a resistência do hospedeiro ao vírus do HIV por alterar práticas comportamentais relevantes e condições hormonais e imunes (BAUM & NESSELHOF, 1988; KEMENY 1994; SCHNEIDERMAN *et al.*, 1994). Entretanto, estudos do papel do estresse na progressão da infecção ao HIV são inconsistentes em suas conclusões. LYKETSOS *et al* (1993) não encontraram associação entre depressão e mudanças na contagem de células T helper, com o desenvolvimento de AIDS ou mortalidade após um período de 8 anos de estudo em homens homossexuais HIV positivos. Entretanto THEORELL *et al* (1995), estudando hemofílicos infectados HIV positivo que tiveram menos acesso a suporte emocional, apresentaram maior declínio no número de células T helper do que hemofílicos com sistemas de suporte emocional mais forte, porém os autores não encontraram diferença entre grupos em relação ao número de sintomas de AIDS e na taxa de mortalidade.

Quando analisamos a figura 4 observa-se que na concentração de 2,0 $\mu\text{g/ml}$ para PHA, houve uma considerável produção de $\text{IFN-}\gamma$, principalmente após 2 dias de estimulação, e que houve uma diferença estatisticamente considerável quando compara-se os pacientes coronarianos com os indivíduos controles ($p < 0,05$), pode-se notar, ainda, níveis maiores de $\text{IFN-}\gamma$ para os indivíduos controles, podendo dizer que estes indivíduos tem uma tendência para resposta TH_1 .

Por outro lado analisando-se a figura 5, detectou-se baixos níveis de IL-5 e quando compara-se pacientes coronarianos e indivíduos controles, em alguns pacientes, não houve diferença estatisticamente considerável entre eles ($p > 0,05$).

Então pelos dados apresentados, nota-se que o perfil das curvas diferiu entre as duas citocinas utilizadas e que a melhor dose de PHA capaz de induzir produção destas citocinas foi 2,0 $\mu\text{g/ml}$.

IWAHABE *et al.*, (1998), submeteu camundongos em condições de estresse por 24 horas e observou que ocorreu uma diminuição marcante das atividades NK e uma elevação dos níveis do soro corticosteróico. Usando este modelo de estresse, ele investigou a influência do estresse em camundongos com relação ao equilíbrio TH₁ e TH₂ e verificaram que com a diminuição da atividade de NK a produção de IFN- γ das células do baço do camundongo reduziu em grande parte depois de sofrer o estresse. Em contraste, a habilidade em produzir IL-4 das células do baço não foi afetada pelo estresse. Esses resultados inicialmente indicaram que o estresse pode induzir o equilíbrio TH₁/TH₂ em relação a imunidade dominante TH₂, que estimula a ocorrência de doenças infecciosas e desordens alérgicas.

Ainda ha algumas evidências que, em humanos e animais de laboratório, o estresse psicológico pode suprimir ou ressaltar as funções imunológicas, dependendo da natureza do fator estressor e as variáveis imunológicas em consideração. A possibilidade do estresse psicológico de afetar a produção de citocinas pro-inflamatórias e imunoregulatórias foram investigados em 38 estudantes de medicina, que fizeram exame de sangue algumas semanas antes, um dia antes e um dia depois de exames acadêmicos, e constataram que o estresse psicológico aumentou significativamente a produção estimulada de TNF- α , IL-6, IL-1, IFN- γ e IL-10. Verificaram ainda que estudantes com alta percepção de estresse durante a condição estressante tiveram um significativo aumento da produção de TNF- α , IL-6, IL-1 e IFN- γ do que os estudantes com baixa percepção de estresse e que estudantes com uma resposta de alta ansiedade tiveram um significativo

aumento da produção de IFN- γ e uma diminuição da produção das citocinas imunoregulatórias, IL-10 e IL-4, do que os estudantes sem ansiedade. Esses achados sugerem que, nos humanos, mudanças na produção nas citocinas pro-inflamatória, IL-6 e IFN- γ , e citosinas imunoregulatórias, IL-10 e IL-4, tomam parte nas resposta homeostáticas ao estresse psicológico e que a ansiedade de estresse induzido se relaciona a resposta de TH₁(MAES *et al.*, 1998).

Outra pesquisa como a de GAILEN *et al.*, 1998, também relata em sua pesquisa que os mecanismos das alterações da imunidade relativa ao estresse ainda não foram totalmente elucidados e que as respostas da imunidade mediada por células tanto quanto os anticorpos e certas citocinas se mostram sendo suprimidas durante épocas de alto estresse. Entretanto o papel da supressão versus desregulação não foi estabelecido em testes com estresse humano. Ele estudou o efeito do estresse sobre as citocinas regulatórias IFN- γ e IL-10, após 72 h de estímulo de PBMC com PHA/PMA, 4 semanas antes e 48 h depois de exames em estudantes de medicina e os resultados desta pesquisa demonstraram diminuição do IFN- γ acompanhado de aumento de IL-10 durante o período de estresse dos exames que resultaram diminuição da proporção de IFN/IL-10. Isto sugere uma significativa correlação entre a resposta de citocina para PHA/PMA e o ajuste subjetivo aos problemas diários. Por outro lado, quando os indivíduos foram agrupados em exames de nível de dificuldade altos e baixos, a transformação do TH₁ e TH₂ em IFN- γ /IL-10 ocorreu apenas nos grupos de dificuldades baixa. Esses dados sugerem que as situações de muito estresse psicológico modificam o equilíbrio de citocinas TH₁/TH₂ em direção ao TH₂ e resulta numa desregulação imunológica maior que a imunossupressão total. Isto pode parcialmente explicar o aumento da incidência de condições de mediação de TH₂ como o aumento das

infecções virais, expressões virais latentes, reações alérgicas asmáticas, e autoimunização encontrada durante períodos de alto estresse.

MAES *et al.*, (1999), Também estudaram a correlação imune e clínica do estresse psicológico induzido em estudantes universitários submetidos a exames estudantis e constataram que a resposta ao estresse psicológico em humanos consistiu de diferentes tipos de perfis de produção de citocinas. A primeira caracterizada por maior produção de IFN- γ em relação a IL-10, denominados de IFN- γ reativos, e um segundo caracterizado por uma resposta IL-10 maior do que IFN- γ (IL-10 reativos). Um segundo achado dos autores neste estudo é que IFN- γ reativos, mas não IL-10 reativos, mostraram significativo aumento induzido por estresse nas taxas de ansiedade com depressão. Os IFN- γ reativos mostraram um significativo aumento induzido por estresse na produção de IFN- γ e IL-6, CD₈ solúvel, IgA, IgG e IgM. Em contrapartida IL-10 reativos, mas não IFN- γ reativos, tiveram um significativo aumento induzido por estresse no número de linfócitos T do sangue periférico CD₄⁺ e CD₈⁺, sugerindo uma taxa CD₄/CD₈ menor e um fator que sugere a uma subsequente resposta IFN- γ induzido por estresse.

A aplicação dos resultados deste trabalho indicam que mais estudos serão necessários para determinar exatamente qual é o mecanismo que faz com que o estresse interfira no processo da regulação imune. No entanto a administração de citocinas ou seus inibidores é uma aproximação potente para modificar respostas biológicas associadas ao estresse. Sabe-se, também, que o domínio do conhecimento sobre a ação das citocinas *in vitro* impõe um desafio permanente ao entendimento sobre suas complexas interações nos sistemas *in vivo*. Porém é necessário descobrir o caminho mais eficaz para o uso das citocinas e substâncias

antagônicas sem prejuízos biológicos e Moraes aos seres vivos, em especial aos humanos.

6. CONCLUSÕES

1. A resposta linfoproliferativa de PBMC estimuladas com PHA a 0,5 $\mu\text{g/ml}$, foi significativamente menor em pacientes coronarianos do que em indivíduos controles quando analisada pelo índice de estimulação (IE). Nenhuma diferença significativa foi observada entre esses grupos, quanto a IE, quando PBMC foram estimuladas com 2,0 ou 0,125 $\mu\text{g/ml}$ de PHA ou em todas as concentrações em cpm .
2. O grupo de pacientes coronarianos produziu níveis significativamente menores de IFN- γ do que o grupo de indivíduos controles, quando PBMC foram estimuladas com PHA a 2,0 $\mu\text{g/ml}$ em todos os dias de cultura avaliados.
3. A cinética de secreção de IFN- γ em sobrenadantes de PBMC estimuladas com 2,0 $\mu\text{g/ml}$ de PHA mostrou que níveis máximos foram detectados após 48 horas tanto para pacientes coronarianos quanto para indivíduos controles. Para IL-5, o pico máximo de produção foi detectado após 72 horas.
4. Os indivíduos controles apresentaram, em média, uma alta relação IFN- γ / IL-5

tendendo a uma resposta de perfil TH₁, enquanto alguns pacientes coronarianos apresentaram, em média, uma baixa relação IFN- γ / IL-5 tendendo a um perfil TH₀.

5. Alguns indivíduos do grupo de pacientes coronarianos apresentaram nítida predominância em produzir maiores níveis de IL-5 do que indivíduos do grupo controle, tendendo a uma resposta de perfil TH₂.
6. Novos estudos serão necessários para se abrir a possibilidade de entendimento da relação *stress*-sistema imunológico.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H., POHER, J. S. **Imunologia celular e molecular.**

Rio de Janeiro: Revinter, 1998. 500 p.

ADER, R, FELTEN, D. L., COHEN, N. **Interactions between the brain an the immune system. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v.30,p.561-602, 1990.

ADER, R. & COHEN, N. Behaviorally conditioned immunosuppression. **Psychosom. Med.** Baltimore, v. 37, n.4, p.333-340. July/Ago., 1975.

ADER, R., FELTEN, D. L., COHEN, N. **Psychoneuroimmunology.** 2.ed. San Diego: Academic Press, 1991. 1218p.

BAUM, A. & NESSELHOF, E.A. **Psychological research and the prevention etiology, and treatment of AIDS.** V.43, p.900-6, 1988.

BENSON, H., KLIPPER, M. Z. **A resposta do relaxamento**. Rio de Janeiro:

Record, 1995. 140p.

BIONDI, M., ZANINO, L. G. Psychological stress, neuroimmunomodulation, and

susceptibility to infectious diseases in animals and man: a review. **Psychother.**

Psychosom, Basel, v. 66, p.3-26, Jan./Feb., 1997.

BORGES, F.C., MINEO, J.R. **Medidas de Biossegurança em Laboratório**.

Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, 1997.

CAMPOS, E. P. Aspectos psicossomáticos em cardiologia. In: MELLO FILHO,

JÚLIO de, (Ed.) **Psicossomática hoje**. Porto Alegre: Artes Médicas, 1992.

400p., p.234-246.

CHILSON, O.P., BOYLSTON, A.W., CRUMPTON, M.J. *Phaseolus vulgaris*

phytohaemagglutinin (PHA) binds to be human T Lymphocyte antigen receptor.

EMBO J. v.3, p.3229-3284, 1984.

CHILSON, O.P. & KELLY-CHILSON, R.D. Mitogenic lectins bind to the antigen

receptor on human lymphocytes. **Eur. J. Immunol.** v.19, p.389-396, 1989.

CLEVERS, H., ALRCON, B., WILEMAN, T., TERHORST, C. The cell receptor/CD3

complex: a dynamic protein ensemble. **Rev. Immunol.** v.6, p.629-662, 1988.

- KÉRY, V. Lectin-carbohydrate interactions in immunoregulation. *Int. J. Biochem.* 23:631-640. 1991.
- KJELDSEN-KRAGH, J. **The influence of psychological factors on the immune system and immunological diseases.** *Tidsskr Nor Laegeforen*, v.116,n.26, p.3102-3107, 1996.
- LECA, G., BOUMSELL, M., FABBI, M., REINHERZ, E.L. & KANELLOPOULOS, J.M. The sheep erythrocyte receptors and both α and β chains of the human T-lymphocyte antigen receptor bind the mitogenic lectin (phytohaemagglutinin) from *Phaseolus vulgaris*. *Scan. J. Immunol.* v.23, p.535-544. 1986.
- LESHAN, L. **O câncer como ponto de mutação.** São Paulo: Summus, 1992. 195 p.
- LICASTRO, F., DAVIS, L.J., MORINI, M.C. Lectins and superantigens: membrane interactions of these compounds with t lymphocytes affect immune responses. *Int. J. Biochem.* v.25, p. 845-852, 1993.
- LIPP, M.E.N. & ROCHA, J. C. **Stress, hipertensão e quantidade de vida.** São Paulo: Papirus, 1994. 130p.
- LIPP, M.E.N. *et al.* **Pesquisa sobre o stress no Brasil: ocupações e grupos de risco.** São Paulo: Papirus, 1996. 304 p.

- LYKETSOS, C.G., HOOVER, D.R., GUCCIONE, M. *et al.* **Depressive symptoms as predictors of medical outcomes in HIV infection.** *V.270*, p.2563-67, 1993.
- IWAKABE, K., SHIMADA, M., OHTA, A., *et al.* **The restraint stress drives a shift in Th1/Th2 balance toward Th2-dominant immunity in mice.** *Immunol Lett*, v.62 n.1, p.39-43, 1998.
- MADDEN, K. S., FELTEN, D. L. Experimental basis for neural-immune interactions. **Physiological Reviews**, v.75, n.1, p.77-106, 1995.
- MAES, M., SONG, C., LIN, A., *et al.* **The effects of psychological stress on humans: increased production of pro-inflammatory cytokines and a Th1-like response in stress-induced anxiety.** In *Cytokine*, v.10, n.4, p.313-318, 1998.
- MAES, M., SONG, C., LIN, A., *et al.* Immune and clinical correlates of psychological stress-induced production of interferon gamma and interleukin-10 in humans. In **Cytokines: Stress And Immunity.** PLOTNIKOFF, N.P., FAITH, R.E., MURGO, A.J., *et al.* 1.ed. Boca Raton, Florida: CRC Press LLC, 1999. 356p. p.39-50.
- MAIER, S. F., WATKINS, L. R., FLESHNER, M. Psychoneuroimmunology: the interface between behavior, brain, and immunity. **Amer Psychol**, Washington DC, v. 49, n. 12. p. 1004-1017. Dec., 1994.

- MEYER, R.J., HAGGERTY, R.J. Streptococcal infections in families. **Pediatrics**, v.29, p.539-49, 1962.
- MANUCK, S.B., COHEN, S., RABIN, B.S., MULDOON, M.F., BACHEN, E.A.
Individual differences in cellular immune response to stress. **Psychol. Sci.** v.2, p.111-115, 1991.
- MOYNIHAN, J. A., BRENNER, G. J., COCKE, R. et al. Stress-induced modulation of immune function in mice. In: GLASER, R., KIECOLT-GLASER, J. (Ed.), **Handbook of human stress and immunity**. San Diego: Academic Press, 1994. p.1-22.
- MILLER, H.C., CHANEY, W.G., KLINMAN, N.R. & ESSELMAN, W.J. Regulation of B cell tolerance by murine gangliosides. **J. Cell. Immunol.** v.143, p.2933-2938. 1982.
- NALIBOFF, B.D., BENTON, D., SOLOMON, G.F., MORLEY, J.E., FAHEY, J.L. *et al.* Immunological changes in young and old adults during brief laboratory stress. **Psychosom. Med.** v.53, p.121-132, 1991.
- NOWELL, P.C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. **Cancer Res.** V.20, p.462-466, 1960.

- O'LEARY, A.. Stress, emotion, and human immune function. **Psychol Bulletin**, Washington DC, v. 108, n.3, p. 363-382. 1990.
- OLIVEIRA, M. F. P. Manifestações emocionais no paciente coronariano. **Ver. Soc. Cardiol. Est. São Paulo**. São Paulo, v.5, n.1, p.1-4. Jan/Fev, 1995. Supl. A.
- ONGARO, S. O paciente coronariano em reabilitação: uma abordagem psicossomática. **Rev. Soc. Cardiol. Est. São Paulo**, São Paulo, v.1, p.9-16. Jun/Ago, 1991.Supl. A.
- PEACOCK, J.S, COLSKY, A.S., PINTO, V.B. Lectins and antibodies as tools for studying cellular interactions. **J. Immunol. Meth.** v.126, p.147-157, 1990.
- PIRES, C. A., SHAROVSKI, L.L., ROMANO, B. W. Coronariopatas e valvopatias: impacto emocional da cirurgia cardíaca. Estado comparativo. **Rev. Soc. Cardiol. Est. São Paulo**, v.4, n.5, p. 1-7. Set/Out, 1994.Supl. A.
- RIBEIRO, A. S., RENGEL, D. H. P. Estudo comparativo sobre a ansiedade frente a cirurgia cardíaca entre pacientes coronarianos e valvopatas. **Rev. Soc. Cardiol. Est. São Paulo**, v.4, n.5, p.1-7. Set/Out, 1992. Supl. A.
- ROSSI, L. E. **A psicobiologia de cura mente-corpo**. São Paulo: PSY II. 1994. 348 p.

- SCHNEIDERMAN, N., ANTONI, M., IRONSON, G. *et al.* **HIV-1, immunity, and behavior.** In **handbook of human stress and immunity.** ed. R. Glaser. New York: Academic, p.267-300, 1994.
- SCROFERNEKER, M. L., POHLMANN, P. R. **Imunologia básica e aplicada.** Porto Alegre: Sagra Luzzatto, 1998. 578 p.
- SELIGMANN, M. Primary immunodeficiencies: current findings and concepts. **Prog. Immunol.** v. 7, p.509-518, 1989.
- SELYE, H. **The stress of life.** New York: McGraw-Hill, 1956. 515p.
- SHARON, N. Lectin receptors as lymphocyte surface markers. **Adv. Immunol.** v. 34, p.213-298, 1983.
- SHERIDAN, J. F., DOBBS, C. M. Stress, viral pathogenesis, and immunity. In: GLASER, R. KIECOLT-GLASER, J. (ED.), **Handbook of human stress and immunity,** San Diego: Academic Press, 1994. p.101-123.
- SMITH JR., G. R. Intentional psychological modulation of the immune system. In: BASMAJIAN, JOHN V. (Ed.), **Biofeedback: principles and practice for clinicians,** Baltimore: Williams & Wilkins, 1989. p. 49-56.

- SOLOMON, G. F. Whither psychoneuroimmunology: A new era of psychoimmunology, of psychosomatic medicine, and of neuroscience. **Brain, Behavior, and Immunity**, San Diego, v.7, p.352-366. Apr. 1993.
- SOLOMON, G. F., KEMENY, M. R., TEMOSHOK, K. L. Psychoneurologic aspects of human immunodeficiency virus infection. In: R. (Ed.) **Psychoneuroimmunology**, 2ed. San Diego: Academic Press, 1991. p. 1081-1113.
- TAYLOR, S.E. **Health Psychology**. University of California. Los Angeles, 1986.
- THERELL, T., BLOMKVIST, V., JONSSON, H. *et al.* **Social support and the development of immune function in human immunodeficiency virus infection**. *Psychosom. Med.* v.57, p.32-36, 1995.
- VOLHARDT, L. T. Psychoneuroimmunology: a literature review. **Jour. Orthopsychiatr.**, New York, v.61, n.1, p. 35-47. Jan., 1991.
- WEISS, A. Ligand-receptor interactions required for commitment to the activation of the interleukin 2 gene. **J. immunol.** v.138, p.2169-2176, 1987.
- WHISLER, R.L. & YATES, A.J. Regulation of lymphocyte responses by human gangliosides. I – Characteristics of inhibitory effects and the induction of impaired activation. **J. Immunol.** v.125, p.2106-2111. 1980.

WLASZCZYK, A., ZIMECKI, M., ADAMIK, B., *et al.*, Immunological status of patients subjected to cardiac surgery: effect of lactoferrin on proliferation and production of interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha by peripheral blood mononuclear cells in vitro. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz)**. v.45, p.201-12, 1997.

ZAKOWSKI, S.G., McALLISTER, C.G., DEAL, M., BAUM, A. Stress, reactivity and immune function in healthy men. **Healthy Psychol**. V.11, p.223-232, 1992.

8. ANEXOS

ANEXO I**TERMO DE CONSENTIMENTO**

Eu,.....

Consinto na prestação de informações, de natureza pessoal ou não e na coleta de sangue, ambos os quais serão utilizados em pesquisa referente à doença que me acomete.

Terei a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a investigação.

Será respeitado o caráter confidencial das informações fornecidas, não sendo permitida a minha identificação.

Uberlândia,.....de.....de 199.....

.....
Assinatura

ANEXO II

PROTOCOLO DE PESQUISA.

IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE.

Nome: _____ Sexo: (M) (F)

Idade: _____ Anos _____ Meses. Estado Civil: (S) (C) (V) (De) (Div) (O)

Tempo: _____ Profissão: _____ (At) (Ap) (Des) (Inv)

Escolaridade: _____ Grau.

Procedência: Urbana() Rural() Tempo: _____

PATOLOGIA.

Diagnóstico:(CID-10) _____ Tempo de Doença: _____

Gravidade: _____ Está Informado da Gravidade?: Sim() Não()

Tem Consciência de Risco na Cirurgia? Sim() Não()

Indicação Terapêutica: Clínico() Cirúrgico ()

Medicação em Uso: _____

Tempo de Uso: _____

Data da Cirurgia: _____

Estado Geral do Paciente: Bom() Regular() Péssimo()

Apresenta Outras Doenças no Momento: Sim() Não()

Diagnóstico: _____

Antecedentes de Cirurgia: Sim () Não ()

Pós-Operatório: Complicado? Sim () Não ()

Antecedentes da Doença:

Tempo de Doença:

Antecedentes na Família: Sim () Não ()

Com Óbito?: Sim () Não ()

9.3- PERFIL PSICOLÓGICO.

Otimista () Pessimista ()

Extrovertido () Introverso ()

Preocupado () Relaxado ()

Apressado () Folgado ()

Calmos () Nervosos ()

Tolerante () Irritado ()

Paciente () Impaciente ()

Agitado () Sossegado ()

Obsessivo () Descuidado ()

Seguro () Inseguro ()

Controlador () Confiante ()

Hiperativo () Não Hiperativo ()

Medo da Morte : Sim () Não ()

Medos Frequentes: Sim () Não ()

Sabe Confiar?: Sim () Não ()

Necessidade de Controle: Sim () Não ()

Sabe Esperar?: Sim () Não ()

Consegue Ficar à Tôa?: Sim () Não ()