



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

GUSTAVO SCACCO

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE AGUDO DE RESTRIÇÃO NO  
RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS PARA A CAVIDADE  
PERITONEAL NA VIGÊNCIA DO PROCESSO  
INFLAMATÓRIO INDUZIDO POR CARRAGENINA**

---

Londrina  
2020

GUSTAVO SCACCO

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE AGUDO DE RESTRIÇÃO NO  
RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS PARA A CAVIDADE  
PERITONEAL NA VIGÊNCIA DO PROCESSO  
INFLAMATÓRIO INDUZIDO POR CARRAGENINA**

Defesa de mestrado apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Profa. Dra. Andressa de Freitas Mendes Dionisio

Londrina  
2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

G982 Scacco, Gustavo.  
Avaliação do estresse agudo de restrição no recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal na vigência do processo inflamatório induzido por carragenina / Gustavo Scacco. - Londrina, 2020.  
52 f.

Orientador: Andressa de Freitas Mendes Dionísio.  
Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2020.  
Inclui bibliografia.

1. Resposta inflamatória - Tese. 2. Estresse - Tese. 3. Neutrófilo - Tese. 4. Restrição Física - Tese. I. de Freitas Mendes Dionísio, Andressa . II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

CDU 574

GUSTAVO SCACCO

**AVALIAÇÃO DO ESTRESSE AGUDO DE RESTRIÇÃO NO  
RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS PARA A CAVIDADE  
PERITONEAL NA VIGÊNCIA DO PROCESSO  
INFLAMATÓRIO INDUZIDO POR CARRAGENINA**

Defesa de mestrado apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina - UEL, como requisito para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Orientador: Profa. Dra. Andressa de  
Freitas Mendes Dionisio  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Gislaine Garcia Pelosi Gomes  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Phileo Pinge Filho  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Daniela Cristina Ceccatto Gerardin  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dr. Wander Rogerio Pavanelli  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 27 de fevereiro de 2020.

Dedico este trabalho a minha família, meus irmãos e meus pais que sempre me incentivaram e mostraram a importância dos estudos. A minha esposa pelo companheirismo, incentivo e compreensão em todos os momentos.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por me dar força, coragem e saúde para alcançar todos os meus objetivos e sempre colocar pessoas boas na minha vida.

A minha orientadora, professora Dra. Andressa Freitas Mendes Dionisio, que me aceitou em seu laboratório. Obrigado pelos ensinamentos, apoio, paciência e por sempre superar as dificuldades encontradas na vida acadêmica.

Aos professores, Dr. Phileno Pinge-Filho, Dr. Wander Rogério Pavanelli, Dra. Estefânia Gastaldello Moreira, Dr. Waldiceu Aparecido Werri Junior, que abriram as portas dos seus laboratórios para que eu pudesse realizar meus experimentos, sem essa gentileza, a realização desse trabalho não seria possível.

Aos amigos de pesquisa, Caio Henrique Bonaldo de Oliveira, Bruno Fernando Cruz Lucchetti, Fernanda Pelisser Tomiotto, Nayara Anitelli Artero, Rodrigo Klein que sempre ajudaram quando precisei. Muito obrigado por disponibilizar o tempo de vocês para ajudar nos meus experimentos.

A todos os professores do departamento de ciências fisiológicas e farmacologia, muito obrigado pelos ensinamentos e contribuições com a minha vida acadêmica.

Aos técnicos que sempre se empenharam para manter os laboratórios e biotérios nas melhores condições para que pudéssemos realizar os experimentos e em especial a Fujiko Eliana Morinaga que sempre esteve à disposição em todos os momentos que precisei.

Agradeço à CAPES pela bolsa concedida.

SCACCO, Gustavo. **Avaliação do estresse agudo de Restrição no recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal na vigência do processo inflamatório induzido por carragenina**: 2019. 53 f. Dissertação de Mestrado (Programa multiêntrico em Ciências Fisiológicas) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2020.

## RESUMO

O estresse representa um dos maiores problemas de saúde e produtividade. Eventos estressantes causam alterações autonômicas e neuroendócrinas, promovendo inúmeras consequências emocionais, comportamentais, cardiovasculares e imunológicas. Um número crescente de estudos tem focado na importância da ativação de receptores beta-adrenérgicos no controle da resposta imunológica, uma vez que a ativação desses receptores presentes em células do sistema imune inato está relacionada à ações anti-inflamatórias. Contudo, a relação entre estresse agudo de restrição e recrutamento de neutrófilos para o foco inflamatório não está totalmente elucidada. Desta maneira, o presente estudo objetivou determinar o efeito do estresse agudo de restrição na migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida pela administração de carragenina e o envolvimento dos receptores beta-adrenérgicos neste processo. Foram utilizados camundongos machos adultos Swiss com oito semanas. Os animais foram pré-tratados com propranolol 5 mg/kg por via subcutânea (s.c.), antagonista dos receptores  $\beta_1$  e  $\beta_2$ -adrenérgicos, ou Atenolol 20 mg/kg/s.c., antagonista dos receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos, 30 minutos antes da restrição. Para induzir o estresse agudo de restrição, os animais foram colocados em tubo cônico de centrífuga de 50 mL com ventilação por 2 horas. Após, essas 2 horas, o processo inflamatório foi induzido pela administração intraperitoneal de carragenina 500  $\mu$ g/cavidade. Após 4 horas de administração de carragenina, a migração de leucócitos, neutrófilos e células mononucleares, a produção de ânion superóxido e óxido nítrico foi determinada a partir do lavado peritoneal. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Diferenças entre os grupos foram avaliadas pela análise de variância de uma via (One-Way ANOVA) seguido do teste de Tukey. Foram consideradas diferenças significativas para  $p < 0,05$ . Todos os experimentos foram realizados após aprovação da comissão de ética no uso de animais sob o número 14993.2018.74/2018. Nossos resultados demonstram que o estresse agudo de restrição promoveu efeito modulador no sistema imunológico inato, pois houve redução da produção de ânion superóxido, migração de leucócitos totais, neutrófilos, células mononucleares para a cavidade peritoneal induzida por carragenina e aumento de óxido nítrico. Além disso, verificamos também que o tratamento com propranolol antes dos camundongos serem submetidos ao estresse agudo de restrição preveniu a alteração desses parâmetros. Por outro lado, o atenolol não foi capaz de promover o mesmo efeito. Desta forma, nossos dados sugerem que o estresse agudo por restrição reduz a produção de ânion superóxido e induz aumento de óxido nítrico promovendo a redução do recrutamento neutrófilos para o foco inflamatório e conseqüentemente aumento da suscetibilidade a infecções e esse efeito é mediado pela ativação de receptores  $\beta_2$  – adrenérgicos, pois o pré tratamento com propranolol evitou a redução do recrutamento dos neutrófilos.

**Palavras-chave:** resposta inflamatória; estresse; neutrófilo; restrição física; receptor beta - adrenérgico.

Scacco, Gustavo. **Effect of acute restraint stress in the recruitment of neutrophils to the peritoneal cavity induced by carrageenan**. 2019. 53 p. Dissertation (Master's degree in Multi-center Program in Physiological Sciences – State University of Londrina, Londrina, 2020.

## ABSTRACT

Stress represents one of the biggest health and productivity problems. Stressful events promote autonomic and neuroendocrine changes, promoting numerous emotional, behavioral, cardiovascular and immunological consequences. An increasing number of studies focus on the importance of activating beta-adrenergic receptors in the control of the immune response, since the activation of these receptors present in cells of the immune system is being evaluated by anti-inflammatory actions. However, a relationship between acute restriction stress and recruitment of neutrophils to the inflammatory focus is not fully elucidated. Thus, the present study aims to determine the effect of restriction acute stress on the neutrophil migration to the peritoneal cavity induced by the administration of carrageenan and the involvement of beta-adrenergic receptors in this process. Male Swiss adult mice (8 weeks) were used. The animals were pre-treated with propranolol 5 mg/kg subcutaneously (s.c.), antagonist of  $\beta_1$  and  $\beta_2$ -adrenergic receptors, or Atenolol 20 mg/kg/s.c. for blocking  $\beta_1$ -adrenergic receptors. Thirty minutes after, the acute restraint stress was induced. Mice were placed in a 50mL centrifuge conical tube with ventilation for 2 hours. After this period, the inflammatory process was induced by intraperitoneal administration of carrageenan 500  $\mu$ g/cavity. The recruitment of leukocytes, neutrophils, mononuclear cells, the production of superoxide anion and nitric oxide were determined in the peritoneal exudate 4 hours after the carrageenan administration. The results were presented as mean  $\pm$  SEM. Differences between groups were assessed by one-way analysis of variance (One-Way ANOVA) followed by the Tukey test. Significant differences were considered for  $p < 0.05$ . All experiments were carried out after approval by the ethics committee on the use of animals under number 14993.2018.74 / 2018. Our results demonstrate that acute restriction stress promoted a negative modulatory effect on the innate immune system, through the reduction in the production of superoxide anion, migration of total leukocytes, neutrophils, mononuclear cells to the peritoneal cavity induced by carrageenan and increased nitric oxide. In addition, we also found that treatment with propranolol before the mice were subjected to acute restriction stress prevented the alteration of these parameters. On the other hand, atenolol was not able to promote the same effect. Thus, our data suggest that acute restriction stress reduces the production of superoxide anion and induces an increase in nitric oxide promoting a reduction in neutrophil recruitment for the inflammatory focus and, consequently, an increase in susceptibility to infections and this effect is mediated by the activation of receptors  $\beta_2$  - adrenergics, because pretreatment with propranolol prevented the reduction of neutrophil recruitment.

**Key-words:** inflammatory response; stress; neutrophil; physical restraint; beta - adrenergic receptor.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1 – Protocolo experimental.....</b>	<b>32</b>
<b>Figura 2 – Efeito do estresse agudo de restrição no comportamento exploratório.....</b>	<b>33</b>
<b>Figura 3 – Efeito do estresse agudo de restrição no recrutamento de leucócitos totais, neutrófilos e células mononucleares para a cavidade peritoneal induzido por carragenina .....</b>	<b>35</b>
<b>Figura 4 – Efeito do pré-tratamento com propranolol no recrutamento de leucócitos totais, neutrófilos e células mononucleares para cavidade peritoneal induzida por carragenina nos animais submetidos ao estresse agudo de restrição .....</b>	<b>37</b>
<b>Figura 5 – Efeito do pré-tratamento com atenolol no recrutamento de leucócitos totais, neutrófilos e células mononucleares para cavidade peritoneal induzido por carragenina no estresse agudo de restrição .....</b>	<b>39</b>
<b>Figura 6 – Efeito do estresse agudo de restrição e do pré-tratamento com propranolol e atenolol nos níveis de leucócitos totais, neutrófilos e monócitos circulantes após a administração de carragenina intraperitoneal .....</b>	<b>41</b>
<b>Figura 7 – Efeito do estresse agudo de restrição e do pré-tratamento com propranolol na produção do ânion superóxido no lavado peritoneal.....</b>	<b>42</b>
<b>Figura 8 – Efeito do estresse agudo de restrição e do pré-tratamento com propranolol na produção do óxido nítrico no lavado peritoneal.....</b>	<b>43</b>
<b>Figura 9 – Efeito do estresse agudo de restrição e do pré-tratamento com propranolol na produção de óxido nítrico, ânion superóxido e no recrutamento de neutrófilos na inflamação .....</b>	<b>49</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EROs	Espécies Reativas de oxigênio
fMLP	Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine
GCs	Glicocorticoides
HHA	Hipotálamo – Hipófise – Adrenal
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
ip	Intraperitoneal
Kg	Kilograma
NADPH:	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato
NBT	Tetrazólio Nitrozul
NK	Natural Killer
NO	Óxido Nítrico
PBS	Tampão Fosfato Salino
sc	Subcutâneo
SNA	Sistema Nervoso Autônomo
SNAS	Sistema Nervoso Autônomo Simpático
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral alfa
TEA	Transtorno de Estresse Agudo

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1.	ASPECTOS GERAIS DO ESTRESSE .....	16
1.2.	RECEPTORES BETA-ADRENÉRGICOS E MODULAÇÃO DO RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS.....	16
1.3.	ASSOCIAÇÃO ENTRE O ESTRESSE AGUDO, O SISTEMA NERVOSO SIMPÁTICO E O RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS .....	19
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	19
2.1.	OBJETIVOS GERAIS .....	19
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
<b>3.</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	29
<b>4.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	27
<b>5.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	29
5.1.	ANIMAIS.....	29
5.2.	DROGAS.....	29
5.3.	PROTOCOLO DE ESTRESSE AGUDO POR RESTRIÇÃO.....	29
5.4.	AVALIAÇÃO COMPORTAMENTAL .....	30
5.5.	INDUÇÃO DO RECRUTAMENTO DE NEUTRÓFILOS PARA A CAVIDADE PERITONEAL .....	30
5.6.	CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS NA CAVIDADE PERITONEAL .....	30
5.7.	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DO ÂNION SUPERÓXIDO ATRAVÉS DO ENSAIO DE TETRAZÓLIO NITROAZUL (NBT).....	31
5.8.	QUANTIFICAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO .....	31
5.9.	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	32
<b>6.</b>	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	32
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	33

7.1.	EFEITO DO ESTRESSE AGUDO DE RESTRIÇÃO NO COMPORTAMENTO EXPLORATÓRIO.....	33
7.2.	EFEITO DO ESTRESSE AGUDO DE RESTRIÇÃO NO RECRUTAMENTO DE LEUCÓCITOS TOTAIS, NEUTRÓFILOS E CÉLULAS MONONUCLEARES PARA A CAVIDADE PERITONEAL INDUZIDO POR CARRAGENINA.....	34
7.3.	EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM PROPRANOLOL NO RECRUTAMENTO DE LEUCÓCITOS TOTAIS, NEUTRÓFILOS E CÉLULAS MONONUCLEARES PARA CAVIDADE PERITONEAL INDUZIDA POR CARRAGENINA NOS ANIMAIS SUBMETIDOS AO ESTRESSE AGUDO DE RESTRIÇÃO.....	36
7.4.	EFEITO DO PRÉ-TRATAMENTO COM ATENOLOL NO RECRUTAMENTO DE LEUCÓCITOS TOTAIS, NEUTRÓFILOS E CÉLULAS MONONUCLEARES PARA CAVIDADE PERITONEAL INDUZIDO POR CARRAGENINA NO ESTRESSE AGUDO DE RESTRIÇÃO.....	38
7.5.	EFEITO DO ESTRESSE AGUDO DE RESTRIÇÃO E DO PRÉ-TRATAMENTO COM PROPRANOLOL E ATENOLOL NOS NÍVEIS DE LEUCÓCITOS TOTAIS, NEUTRÓFILOS E MONÓCITOS CIRCULANTES APÓS A ADMINISTRAÇÃO DE CARRAGENINA INTRAPERITONEAL.....	40
7.6.	EFEITO DO ESTRESSE AGUDO DE RESTRIÇÃO E DO PRÉ-TRATAMENTO COM PROPRANOLOL NA PRODUÇÃO DO ÂNION SUPERÓXIDO NO LAVADO PERITONEAL.....	42
7.7.	EFEITO DO ESTRESSE AGUDO DE RESTRIÇÃO E DO PRÉ-TRATAMENTO COM PROPRANOLOL NA PRODUÇÃO ÓXIDO NÍTRICO NO EXSUDATO PERITONEAL.....	43
<b>8.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>9.</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>48</b>
<b>10.</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>50</b>
<b>11.</b>	<b>ANEXO.....</b>	<b>55</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Aspectos gerais do estresse

O Transtorno de Estresse Agudo (TEA) é caracterizado pelo desenvolvimento de sintomas que duram de três dias a um mês após a exposição a um ou mais eventos traumáticos. Os sintomas apresentam-se de forma individualizada, podendo ser um quadro dissociativo ou de distanciamento associado a reatividade emocional ou fisiológica, contudo, a principal resposta apresentada é um estado de ansiedade (APA, 2014).

A prevalência do TEA varia de acordo com a natureza do evento, podendo ser identificado em menos de 20% dos casos após eventos traumáticos que não envolvem agressão interpessoal, em 13 a 21% dos acidentes automobilísticos, em 14% das lesões cerebrais traumáticas leves, em 19% dos furtos, em 10% das queimaduras graves, em 6 a 12% dos acidentes industriais e, em 20 a 50% após eventos traumáticos interpessoais, incluindo assalto, estupro e testemunho de tiroteio em lugar público (APA, 2014). Dados demonstram que, apenas nos Estados Unidos, o estresse impacta de forma negativa mais de 50% da população, sendo que em um período de 26 anos houve aumento entre 10% e 30% na taxa de incidência, e os custos gerados de forma direta e indireta são de aproximadamente 300 bilhões de dólares por ano (FINK, 2016). No Brasil, estima-se que essas despesas representam 3,5% do PIB anual (QUICK et al., 2009).

Hans Selye caracterizou conceito de estresse com base em seus estudos que descreveram uma tríade patológica composta de aumento da adrenal, ulcerações gastrointestinais e involução do timo, provocada por diferentes agentes estressores. Assim, Selye definiu o estresse como uma resposta inespecífica do organismo a qualquer demanda e, que a tríade patológica seria resultado da exposição a qualquer agente estressor (SELYE, 1936; SELYE, 1959; SELYE, 1973). Selye considerou ainda o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) como o eixo principal da resposta ao estresse (SELYE, 1950). No entanto, dados demonstram que diferentes estressores e diferentes tempos de exposição ao estímulo estressante desencadeiam respostas neuroendócrinas heterogêneas. Por exemplo, estressores físicos, como perda de sangue e trauma, ativam rapidamente o tronco cerebral e as regiões hipotalâmicas, enquanto que estressores psicológicos, como vergonha

social, envolvem principalmente mediadores de estresse em regiões do cérebro que preservam a emoção, como a amígdala e a região frontal (JOËLS ; BARAM 2009).

Um estímulo estressor atua em diversas regiões cerebrais, incluindo, entre outras, o locus coeruleus, o núcleo paraventricular hipotalâmico, a amígdala e o hipocampo (PACAK; PALKOVITS, 2001). Essas regiões cerebrais regulam a resposta ao estresse, induzindo ou inibindo o aumento da atividade do sistema nervoso autônomo (SNA) e do eixo HHA. Desta forma, primeiro, o agente estressor é percebido por sistemas sensoriais cerebrais, os quais avaliam e comparam o desafio estressante com o estado existente e as experiências prévias do organismo. Segundo, a detecção do desafio estressante leva a ativação do sistema nervoso autônomo simpático (SNAS), com liberação de noradrenalina nas terminações nervosas simpáticas, bem como de adrenalina e noradrenalina da medula adrenal. A liberação de catecolaminas leva ao aumento do débito cardíaco, da pressão arterial e aumento dos níveis de glicose circulante (LOURES et al., 2002). Terceiro, ocorre a ativação do eixo HHA que resulta na produção e liberação de glicocorticoides (GCs), como o cortisol no homem e peixes, e corticosterona em roedores pelo córtex da adrenal. Níveis elevados de GCs levam a adaptação do organismo ao estresse (STEPTOE et al., 2012; FINK, 2016).

Estímulos estressantes promovem alterações autonômicas, neuroendócrinas e geram inúmeras consequências emocionais e comportamentais, como ansiedade, medo, depressão, alterações cardiovasculares e a desordem do estresse pós-traumático, que só nos Estados Unidos afeta mais de 7 milhões de indivíduos (LAM et al., 1995; KAEHLER et al., 2000; KNUEPFER et al., 2001; VAN DEN BUUSE et al., 2001; FINK, 2016). Ademais, o sistema imunológico também é profundamente impactado pelo estresse. Estudos realizados por Solomon e Moss demonstraram, na década de 60, uma importante relação entre o sistema imunológico e o humor, introduzindo o conceito de que as emoções poderiam influenciar no desenvolvimento de doenças e da necessidade de entender a influência do SNC no sistema imunológico inato (SOLOMON & MOSS, 1964).

No entanto, estudos têm demonstrado a existência de comunicação bidirecional do sistema imunológico com o SNC (MCCUSKER; KELLEY, 2013; QUAN, 2014). A ativação de fibras nervosas sensoriais e a ação direta de citocinas em receptores presentes nos órgãos circunventriculares transmitem sinais para o

SNC, que regulam a imunidade (VIDA et al., 2011; BANKS, 2015). O eixo HHA é a mais conhecida via de regulação neuroimune, pela qual o SNC modula a resposta inflamatória através da liberação de GCs (IMURA & FUKATA, 1994). No entanto, os estudos recentes têm focado na importância da ativação de receptores adrenérgicos no controle da resposta imune, uma vez que a ativação desses receptores está relacionada com ações anti-inflamatórias, principalmente via inibição da atividade de neutrófilos (SPENGLER et al., 1994; HASKÓ et al., 1998; SELÉNYI et al., 2000; MERT et al., 2014; SILVA et al., 2016).

## **1.2. Receptores beta-adrenérgicos e modulação do recrutamento de neutrófilos.**

Nos estágios iniciais de diversos processos inflamatórios, incluindo infecções por fungos, vírus e bactérias, a célula predominante e primeiramente recrutada ao sítio inflamatório é o neutrófilo. A migração de neutrófilos durante a resposta inflamatória resulta principalmente da produção e liberação, por células residentes, como macrófagos e células dendríticas, de citocinas e quimiocinas. A liberação destes mediadores resulta em aumento nas interações entre os neutrófilos e as células endoteliais, promovendo a migração destes leucócitos a favor do gradiente de concentração entre a área lesada e as vênulas pós-capilares (MEDZHITOV, 2010). Uma vez presentes os neutrófilos no sítio inflamatório, estes são capazes de fagocitar, destruir e degradar os microrganismos. Desta forma, o recrutamento de neutrófilos durante o processo infeccioso é crucial para o controle deste evento (ALVES-FILHO et al., 2008; McDONALD et al., 2010). No entanto, a ocorrência de uma resposta inflamatória exacerbada gera efeitos deletérios e indesejáveis. Uma vez que os neutrófilos liberam enzimas proteolíticas e espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio, as quais contribuem para lesão tecidual e consequente disfunção de órgãos (MEDZHITOV, 2008).

Diversas células do sistema imunológico inato, como neutrófilos, macrófagos, células natural killer, expressam receptores tanto alfa quanto beta adrenérgicos (KAVELAARS, 2002; KOLMUS et al., 2015). Dados da literatura mostram que a ativação de receptores beta-adrenérgicos promove redução, *in vivo*, da produção de citocinas induzidas por LPS e carragenina (SZELENYI et al., 2000; VIDA et al., 2011;

SILVA et al., 2016) e, diminui a produção de citocinas de macrófagos estimulados com LPS (SPENGLER et al., 1994; HASKÓ et al., 1998). Além disso, foi demonstrado *in vitro* que a ativação de receptores beta-adrenérgicos potencializou a produção de óxido nítrico induzido por lipopolissacarídeo em macrófagos (CHI et al., 2003). Ademais, estudos posteriores mostraram que o aumento da produção de NO durante a inflamação aguda está relacionado com a diminuição do recrutamento de neutrófilos através da redução da indução da expressão de moléculas de adesão no endotélio como a ICAM-1 e da dessensibilização e internalização do receptor quimiotáxico CXCR2, receptor expresso na superfície dos neutrófilos e fundamental para o recrutamento de leucócitos para o sítio da inflamação (DAL SECCO et al. 2003; DAL SECCO et al. 2006; DAL SECCO et al. 2010).

Outrossim, também foi demonstrado que a ativação de receptores beta-adrenérgicos reduzem a expressão da molécula de adesão CD11b na superfície de neutrófilos, responsável pela adesão do neutrófilo ao endotélio e, diminui a produção de ROS induzida por N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) (SCANZO et al., 2015). Recentemente, Lopes e colaboradores demonstraram que o pré-tratamento de camundongos com isoproterenol, agonista não seletivo dos receptores beta adrenérgicos, promove redução na produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e KC/CXCL1 induzidos por carragenina e, conseqüente diminuição do recrutamento de neutrófilos para o foco inflamatório. Os autores também demonstraram que o pré-tratamento dos animais com propranolol, antagonista dos receptores beta adrenérgicos não seletivo, reverteu a redução do recrutamento de neutrófilos induzida pelo isoproterenol para o sítio da inflamação (SILVA et al., 2016).

### **1.3 Associação entre o estresse agudo, o sistema nervoso simpático e o recrutamento de neutrófilos**

Dados da literatura sugerem que o estresse agudo modula negativamente o sistema imunológico e isto gera implicações, como o aumento da susceptibilidade a infecções (CAO et al., 2003; AVITSUR et al., 2006). No entanto, dados que demonstrem o papel do estresse agudo no recrutamento de neutrófilos na vigência do processo inflamatório são escassos. Uma vez que o estresse agudo leva a ativação do SNAS e, sabendo que a ativação de receptores beta-adrenérgicos correlaciona-se com redução do recrutamento de neutrófilos na vigência do

processo inflamatório, o presente estudo buscou caracterizar o potencial efeito modulador negativo do estresse agudo no recrutamento de neutrófilos para o foco inflamatório, bem como a participação dos receptores beta-adrenérgicos nesse processo.

O modelo de estresse agudo utilizado foi o de restrição. O estresse agudo por restrição é um modelo experimental onde há a presença de um estímulo aversivo inescapável, que consiste em colocar o animal em um tubo plástico ou metálico, o qual restringe os movimentos do animal (CONTI et al., 2001). O estresse agudo por restrição promove alterações comportamentais ansiogênicas imediatas e tardias (PADOVAN et al., 2000; REIS et al., 2011), sendo um importante modelo de estresse psicológico (GLAVIN et al., 1994) e, neste modelo, há ativação do SNAS e do eixo HHA (CORDELLINI & VASSILIEFF, 1998; GAGLIANO et al., 2008).

O recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal foi induzido pela administração de carragenina, o qual é mediado principalmente pela produção de TNF- $\alpha$ , interleucina-1  $\beta$ , interleucina-6, KC/CXCL1 e indução da expressão de moléculas de adesão (DOZEN et al., 1989; UTSUNOMIYA et al., 1991; FREITAS et al., 2006; NAPIMOGA et al., 2008; SILVA et al., 2016).

Cabe ressaltar que, apesar dos dados encontrados na literatura demonstrarem que a ativação de receptores beta-adrenérgicos promovam redução do recrutamento de neutrófilos frente ao estímulo inflamatório, ainda faltam estudos demonstrando a relação entre o estresse agudo de restrição, a ativação do sistema nervoso simpático e a modulação do recrutamento de neutrófilos na vigência do processo inflamatório. Deste modo, fica evidente a necessidade de estudos que explorem essa relação.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivos Gerais**

Determinar se o estresse agudo por restrição promove redução do recrutamento de neutrófilos na vigência do processo inflamatório e, se essa modulação negativa do recrutamento de neutrófilos para o sítio da inflamação é decorrente da ativação de receptores beta-adrenérgicos.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Avaliar o efeito do estresse agudo de restrição na modulação do recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal durante o processo inflamatório induzido pela administração de carragenina;
- Determinar se o estresse agudo de restrição interfere na síntese e/ou liberação do ânion superóxido e óxido nítrico durante o processo inflamatório agudo;
- Avaliar se o bloqueio dos receptores beta-adrenérgicos reverte o efeito do estresse agudo no recrutamento de neutrófilos para o foco da inflamação;
- Determinar o papel do bloqueio dos receptores beta-adrenérgicos na síntese e/ou liberação do ânion superóxido e óxido nítrico durante o estresse agudo de restrição na vigência do processo inflamatório agudo.

### 3. REFERÊNCIAS

APA. **Manual Diagnóstico e Estatístico de Transtornos Mentais**. 5a ed. Porto Alegre: Artmed; 2014

AVITSUR, R.; HUNZEKER, J.; SHERIDAN, J.F. Role of early stress in the individual differences in host response to viral infection. **Brain Behav Immun**, v. 20, p. 339-348, 2006.

BANKS, W.A. The blood-brain barrier in neuroimmunology: Tales of separation and assimilation. **Brain Behav Immun.**, v. 44, n. 6, p. 1-8, 2015.

CAO, L.; HUDSON, C.A.; LAWRENCE, D.A. Immune Changes during Acute Cold/Restraint Stress-Induced Inhibition of Host Resistance to *Listeria*, **Toxicol Sci**, v. 74, p. 325–334, 2003.

CHI, D.; QUI, M.; KRISHNASWAMY, G.; LI, C.; STONE, W. Regulation of nitric oxide production from macrophages by lipopolysaccharide and catecholamines. **Nitric Oxide**, v. 8, p. 127–132, 2003.

CONTI, L.H.; SHANNON, M.H.; MURRY, J.D.; PRINTZ, M.P. Repeated restraint stress-induced increase in baroreceptor reflex sensitivity: role of corticotropin-releasing factor. **Neuropeptides**, v. 35, p. 71-81, 2001.

CORDELLINI, S., VASSILIEFF, V.S. Decreased endothelium-dependent vasoconstriction to noradrenaline in acute-stressed rats is potentiated by previous chronic stress: nitric oxide involvement. **Gen. Pharmacol**, v. 30, p. 79–83, 1998.

DAL SECCO, D.; PARON, J.A.; DE OLIVEIRA, S.H.; FERREIRA, S.H.; SILVA, J.S.; CUNHA, F. Q. Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. **Nitric Oxide**, v. 9, p.153-164, 2003

DAL SECCO, D.; MOREIRA, A.P.; FREITAS, A.; SILVA, J.S.; ROSSI, M.A.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Nitric oxide inhibits neutrophil migration by a mechanism dependent on ICAM-1: role of soluble guanylate cyclase. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v.15, n.1, p.77-86, 2006.

DAL SECCO, D.; FREITAS, A.; ABREU, M. A.; GARLET, T. P.; ROSSI, M. A.; FERREIRA, S. H.; SILVA, J.S.; ALVES-FILHO, J.C.; CUNHA, F. Q. Reduction of ICAM-1 expression by carbon monoxide via soluble guanylate cyclase activation accounts for modulation of neutrophil migration. **Naunyn-Schmied Arch Pharmacol**, v. 381, p. 483–493, 2010.

DOZEN, M.; YAMAKI, K.; OH-ISHI, S. Captopril uncovers kinin- dependent release of arachidonic acid metabolites in carrageenin- induced rat pleurisy. **Jpn J Pharmacol**, v. 51, p. 101–105, 1989.

FINK. G. Stress: Concepts, Cognition, Emotion, and Behavior: **Handbook in Stress Series**. San Diego: Academic press, 2016. 502p.

FREITAS, A.; ALVES-FILHO, J.C.; SECCO, D.D.; NETO, A.F.; FERREIRA, S.H.;

BARJA-FIDALGO, C.; CUNHA, F.Q. Heme oxygenase/carbon monoxide-biliverdin pathway down regulates neutrophil rolling, adhesion and migration in acute inflammation. **Br J Pharmacol**, v. 149, p. 345-354, 2006.

FREITAS, A.; ALVES-FILHO, J.C.; VICTONI, T.; SECHER, T.; LEMOS, H.P.; SÔNEGO, F.; CUNHA, F.Q.; RYFFEL, B. IL-17 Receptor Signaling Is Required to Control Polymicrobial Sepsis. **J Immunol**, v.182, p. 7846-7854, 2009.

GAGLIANO, H.; FUENTES, S.; NADAL, R.; ARMARIO, A. Previous exposure to immobilisation and repeated exposure to a novel environment demonstrate a marked dissociation between behavioral and pituitary-adrenal responses. **Behav Brain Res**, v. 187, p. 239-245, 2008.

GLAVIN, G.B.; PARÉ, W.P.; SANDBAK, T.; BAKKE, H.K.; MURISON, R. Restraint stress in biomedical research: an update. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 18, p. 223-249, 1994.

HASKÓ, G.; NÉMETH, Z.H.; SZABÓ, C.; ZSILLA, G.; SALZMAN, A.L.; VIZI, E.S. Isoproterenol inhibits IL-10, TNF- $\alpha$ , and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. **Brain Res Bull.**, v.45, p.183–187, 1998.

IMURA, H. & FUKATA, J. Endocrine-paracrine interaction in communication between the immune and endocrine systems. Activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in inflammation. **Eur J Endocrinol**, v. 130, p. 32–37, 1994.

JOËLS, M.; BARAM, T. Z. The neuro-symphony of stress. **Nat Rev Neurosci.**, v. 10, n. 6, p. 459-66, 2009.

KAEHLER, S.T.; SINGEWALD, N.; SINNER, C.; THURNHER, C.; PHILIPPU, A. Conditioned fear and inescapable shock modify the release of serotonin in the locus coeruleus. **Brain Res**, v.24, p. 249-254, 2000.

KAVELAARS, A. Regulated expression of alpha-1 adrenergic receptors in the immune system. **Brain Behav Immun.** v. 16, p. 799-807, 2002.

KNUEPFER, N.M.; PURCELL, R.M.; GAN, Q.; LE, K.M. Hemodynamic response patterns to acute behavioral stressors resemble those to cocaine. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 281, p. 1778-1786, 2001.

KOLMUS, K.; TAVERNIER, J.; GERLO, S.  $\beta$ 2-Adrenergic receptors in immunity and inflammation: stressing NF- $\kappa$ B. **Brain Behav Immun**, v. 45, p. 297-310, 2015.

LAM, S.K.; HUI, W.M.; SHIU, L.P.; NG, M.M. Society stress and peptic ulcer perforation. **J Gastroenterol Hepatol**, v. 10, p. 570-576, 1995.

LOURES, D.L.; ANNA, I.S.; BALDOTTO, C.S.R.; SOUSA, E.B.; NÓBREGA, A.C.L. Estresse Mental e Sistema Cardiovascular. **Arq Bras Cardiol**, v.78, p. 525–530, 2002.

- MCCUSKER, R.H.; KELLEY, K.W. Immune-neural connections: how the immune system's response to infectious agents influences behavior. **J Exp Biol.**, v. 216, p. 84-98, 2013.
- MCDONALD, B.; PITTMAN, K.; MENEZES, G.B.; HIROTA, S.A.; SLABA, I.; WATERHOUSE, C.C.; BECK, P.L.; MURUVE, D.A.; KUBES, P. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. **Science**, v. 330, p. 362–366, 2010.
- MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. **Cell.**, v. 140, p. 771-776, 2010.
- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, p. 428–435, 2008.
- MERT, T.; TUGTAG, B.; KILINC, M.; SAHIN, E.; OKSUZ, H.; GUNES, Y. Preventive and therapeutic effects of a beta adrenoreceptor agonist, dobutamine, in carrageenan-induced inflammatory nociception in rats. **Inflammation**, 37, p. 1814–1825, 2014.
- NAPIMOGA, M.H.; VIEIRA, S.M.; DAL-SECCO, D.; FREITAS, A.; SOUTO, F.O.; MESTRINER, F.L.; ALVES-FILHO, J.C.; GRESPAN, R.; KAWAI, T.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma ligand, 15-deoxy-Delta12,14-prostaglandin J2, reduces neutrophil migration via a nitric oxide pathway. **J Immunol**, v. 1, p. 609-617, 2008.
- PACÁK, K.; PALKOVITS, M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. **Endocr Rev**, v. 22, p. 502- 48, 2001.
- PADOVAN, C.M.; GUIMARÃES, F.S. Restraint-induced hypoactivity in an elevated plus-maze. **Braz J Med Biol Res**, v. 33, p. 79-83, 2000.
- QUAN, N. In-depth conversation: spectrum and kinetics of neuroimmune afferent pathways. **Brain Behav Immun.**, v. 40, p. 1-8, 2014.
- QUICK, J.C.; PERREWE, P.L.; ROSSI, A.M. **Stress and Quality of Working Life: The Positive and the Negative**. Greenwich., p. 276, 2009.
- REIS, D.G.; SCOPINHO, A.A.; GUIMARÃES, F.S.; CORRÊA, F.M.; RESSTEL, L.B. Behavioral and autonomic responses to acute restraint stress are segregated within the lateral septal area of rats. **PLoS One**. v. 6 n. 8, 2011
- SCANZANO, A.; SCHEMBRI, L.; RASINI, E.; LUINI, A.; DALLATORRE, J.; LEGNARO, M.; BOMBELLI, R.; CONGIU, T.; COSENTINO, M.; MARINO, F. Adrenergic modulation of migration, CD11b and CD18 expression, ROS and interleukin-8 production by human polymorphonuclear leukocytes. **Inflamm Res**. V. 64, p. 127-135, 2015.
- SELÉNYI, J.; KISS, J.P.; VIZI, E.S. Differential involvement of sympathetic nervous system and immune system in the modulation of TNF-alpha production by alpha2-

and beta-adrenoceptors in mice. **J Neuroimmunol**, v. 103, p. 34–40, 2000.

SELEY, H. The evolution of the stress concept. **American Scientist**, v. 61, p. 692-9, 1973.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. **J Neuropsych Clin N**, v. 10, p. 230–231, 1936.

SELYE, H. Stress and the general adaptation syndrome. **Br Med J**, v. 1, p. 1383–1392, 1950.

SELYE, H. **Stress**: a tensão da vida. São Paulo: Ibrasa, p. 396, 1959.

SILVA, R.L.; CASTANHEIRA, F.V.; FIGUEIREDO, J.G.; BASSI, G.S. FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q.; CUNHA, T.M.; KANASHIRO, A. Pharmacological Beta-Adrenergic Receptor Activation Attenuates Neutrophil Recruitment by a Mechanism Dependent on Nicotinic Receptor and the Spleen. **Inflammation**, v. 39, p. 1405-1413, 2016.

SOLOMON, G.F.; MOSS, R.H. Emotions immunity, and disease; A speculative theoretical integration. **Arch Gen Psychiatry**, v. 11, p. 657-674, 1964.

SPENGLER, R.N.; CHENSUE, S.W.; GIACHERIO, D.A.; BLENK, N.; KUNKEL, S.L. Endogenous norepinephrine regulates tumor necrosis factor-alpha production from macrophages in vitro. **J Immunol**, v. 152, p. 3024–3031, 1994.

STEPTOE, A.; KIVIMAKI, M. Stress and cardiovascular disease. **Nat Ver Cardiol**, v. 9, p. 360–370, 2012.

SZELÉNYI, J.; KISS, J.P.; VIZI, E.S. Differential involvement of sympathetic nervous system and immune system in the modulation of TNF- $\alpha$  production by  $\alpha_2$ - and  $\beta$ -adrenoceptors in mice. **J Neuroimmunol**, v. 103, p. 34–40, 2000.

UTSUNOMIYA, I.; NAGAI, S.; OH-ISHI, S. Sequential appearance of IL-1 and IL-6 activities in rat carrageenin-induced pleurisy. **J Immunol**, v. 147, p. 1803–1809, 1991.

VAN DEN BUUSE, M.; VAN ACKER, S.A.; FLUTTERT, M.; DE KLOET, E.R. Blood pressure, heart rate, and behavioral responses to psychological "novelty" stress in freely moving rats. **Psychophysiology**, v. 38, p. 490-499, 2001.

VIDA, G.; PEÑA, G.; KANASHIRO, A.; THOMPSON-BONILLA, M.R.; PALANGE, D.; DEITCH, E.A.; ULLOA, L.  $\beta_2$ -Adrenoreceptors of regulatory lymphocytes are essential for vagal neuromodulation of the innate immune system. **FASEB Journal**, v. 25, p. 4476–4485, 2011.

## **Artigo**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Farmacologia da Inflamação, da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Os resultados obtidos serão publicados em um artigo científico.

**Efeito do estresse agudo de restrição no recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal na vigência do processo inflamatório induzido por carragenina.** Gustavo Scacco, Caio Henrique Bonaldo de Oliveira, Bruno Fernando Cruz Lucchetti, Fernanda Pelisser Tomiotto, Nayara Anitelli Artero, Rodrigo Klein, Phileno Pinge-Filho, Wander Rogério Pavanelli, Estefânia Gastaldello Moreira, Waldiceu Aparecido Werri Junior, Andressa Freitas.

As formatações do artigo seguem as normas da revista *Mediators of inflammation*. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/mi/guidelines/>.

Fator de impacto de 3.545 de acordo com o Journal Citation Reports released by Clarivate Analytics em 2019, 3.57 de acordo com CiteScore 2018 pelo Scopus e fator de impacto qualis B1.

**Efeito do estresse agudo de restrição no recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal na vigência do processo inflamatório induzido por carragenina.**

Gustavo Scacco<sup>a</sup>, Caio Henrique Bonaldo de Oliveira<sup>a</sup>, Bruno Fernando Cruz Lucchetti<sup>b</sup>, Fernanda Pelisser Tomiotto<sup>b</sup>, Nayara Anitelli Artero<sup>b</sup>, Rodrigo Klein<sup>a</sup>, Phileno Pinge-Filho<sup>b</sup>, Wander Rogério Pavanelli<sup>b</sup>, Estefânia Gastaldello Moreira<sup>a</sup>, Waldiceu Aparecido Werri Junior<sup>b</sup>, Andressa Freitas<sup>a\*</sup>.

<sup>a</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina. Rod. Celso Garcia Cid PR 445, Km 380 Cx. Postal 10.011, 86057-970, Londrina, Parana, Brasil. Fax: + 55 43 3371-4227, Tel: + 55 43 3371-4650.

<sup>b</sup>Departamento de Ciências Patológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina. Rod. Celso Garcia Cid PR 445, Km 380 Cx. Postal 10.011, 86057-970.

\*Autor correspondente: Prof. Andressa Freitas, Ph.D. Endereço: Departamento de Ciências Biológicas, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Londrina. Rod. Celso Garcia Cid PR 445, Km 380 Cx. Postal 10.011, 86057-970, Londrina, Parana, Brasil. Brasil. Tel: + 55 43 3371 4650. Fax: + 55 43 3371 4227. E-mails: andressa@uel.br ou drefreitas@gmail.com

## ABSTRACT

Stress represents one of the biggest health and productivity problems. Stressful events promote autonomic and neuroendocrine changes, promoting numerous emotional, behavioral, cardiovascular and immunological consequences. An increasing number of studies focus on the importance of activating beta-adrenergic receptors in the control of the immune response, since the activation of these receptors present in cells of the immune system is being evaluated by anti-inflammatory actions. However, a relationship between acute restriction stress and recruitment of neutrophils to the inflammatory focus is not fully elucidated. Thus, the present study aims to determine the effect of restriction acute stress on the neutrophil migration to the peritoneal cavity induced by the administration of carrageenan and the involvement of beta-adrenergic receptors in this process. Male Swiss adult mice (8 weeks) were used. The animals were pre-treated with propranolol 5 mg/kg subcutaneously (s.c.), antagonist of  $\beta_1$  and  $\beta_2$ -adrenergic receptors, or Atenolol 20 mg/kg/s.c. for blocking  $\beta_1$ -adrenergic receptors. Thirty minutes after, the acute restraint stress was induced. Mice were placed in a 50mL centrifuge conical tube with ventilation for 2 hours. After this period, the inflammatory process was induced by intraperitoneal administration of carrageenan 500  $\mu$ g/cavity. The recruitment of leukocytes, neutrophils, mononuclear cells, the production of superoxide anion and nitric oxide were determined in the peritoneal exudate 4 hours after the carrageenan administration. The results were presented as mean  $\pm$  SEM. Differences between groups were assessed by one-way analysis of variance (One-Way ANOVA) followed by the Tukey test. Significant differences were considered for  $p < 0.05$ . All experiments were carried out after approval by the ethics committee on the use of animals under number 14993.2018.74 / 2018. Our results demonstrate that acute restriction stress promoted a negative modulatory effect on the innate immune system, through the reduction in the production of superoxide anion, migration of total leukocytes, neutrophils, mononuclear cells to the peritoneal cavity induced by carrageenan and increased nitric oxide. In addition, we also found that treatment with propranolol before the mice were subjected to acute restriction stress prevented the alteration of these parameters. On the other hand, atenolol was not able to promote the same effect. Thus, our data suggest that acute restriction stress reduces the production of superoxide anion and induces an increase in nitric oxide promoting a reduction in neutrophil recruitment for the inflammatory focus and, consequently, an increase in susceptibility to infections and this effect is mediated by the activation of receptors  $\beta_2$  - adrenergics, because pretreatment with propranolol prevented the reduction of neutrophil recruitment.

**Key-words:** Inflammatory response; stress; Neutrophil; physical restraint; Beta - adrenergic receptor.

#### 4. INTRODUÇÃO

A inflamação aguda é uma resposta inata desencadeada por ataques deletérios, como infecções e lesões teciduais. Nas primeiras etapas da resposta inflamatória, o neutrófilo é a primeira célula recrutada para o local da inflamação, esta etapa ocorre principalmente pela liberação, por células residentes, de citocinas e fatores quimiotáticos como os mediadores lipídicos, fragmentos do sistema complemento, quimiocinas que induzem a expressão de moléculas de adesão [1]. No sítio inflamatório, os neutrófilos são capazes de fagocitar, destruir e degradar os microrganismos. Desta forma, o recrutamento de neutrófilos durante o processo infeccioso é crucial para o controle deste evento [2,3].

Estudos realizados na década de 60 constataram que o sistema imunológico é modulado negativamente pelo estresse, e esta relação estava ligada ao aparecimento de doenças, sendo necessário compreender a influência do sistema nervoso central sobre o sistema imune [4]. Um estímulo estressor atua em diversas regiões cerebrais modulando a atividade do sistema nervoso autônomo (SNA) e do eixo Hipotálamo – Hipófise – Adrenal (HHA). Desta forma, ocorre a ativação do sistema nervoso autônomo simpático (SNAS), com liberação de noradrenalina nas terminações nervosas simpáticas, bem como de adrenalina e noradrenalina na medula adrenal e a ativação do eixo HHA que resulta na produção e liberação de glicocorticoides (GCs), como o cortisol no homem e peixes, e corticosterona em roedores pelo cortex da adrenal. Níveis elevados de GCs levam a adaptação do organismo ao estresse [5,6,7].

A liberação de glicocorticoides é o principal mecanismo de regulação neuroimune pela qual o sistema nervoso central modula a resposta inflamatória [8]. Contudo, a ativação de receptores adrenérgicos tem se mostrado uma importante via no controle da resposta imune inata [8,9,10,11,12,13]. Diversas células do sistema imune inato expressam receptores beta e alfa adrenérgicos como macrófagos, células natural Killer e neutrófilos [14,15]. Ademais, dados da literatura demonstram que a ativação de receptores adrenérgicos, especificamente beta, modula negativamente o processo inflamatório [14,15]. Estudos mostram que a ativação de receptores beta-adrenérgicos promove a redução da produção de citocinas por macrófagos, diminui a expressão de moléculas de adesão na superfície

de neutrófilos e a produção de espécie reativa de oxigênio (EROs) frente a estímulos inflamatórios [11,13,16,17].

Estudos *in vitro* também constataram que a ativação de receptores  $\beta$ -adrenérgicos por adrenalina e isoprenalina, um agonista  $\beta$ -adrenérgico não seletivo, reduz a produção EROs e a quimiotaxia de neutrófilos estimulados por N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP) e interleucina-8, e o bloqueio dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos, especialmente os receptores  $\beta_2$ , foi capaz de prevenir a redução da produção de EROs e a redução da migração de neutrófilos [17,18]. Além disso, Chi e colaboradores demonstraram que a ativação desses receptores com adrenalina e noradrenalina potencializou a produção de óxido nítrico induzido por lipopolissacarídeo em macrófagos [19]. Ademais, estudos posteriores mostraram que o aumento da produção de NO durante a inflamação aguda está relacionado com a diminuição do recrutamento de neutrófilos através da redução da indução da expressão de moléculas de adesão no endotélio, como a ICAM-1, e da dessensibilização e internalização de receptores quimiotáxicos CXCR2, que estão expressos na superfície dos neutrófilos e são fundamentais para o recrutamento dos neutrófilos para o sítio da inflamação [20,21,22].

Os dados apresentados na literatura até o momento demonstram que a ativação de receptores beta-adrenérgicos presentes na superfície das células do sistema imunológico inato está relacionada a redução da produção de citocinas, quimiocinas, expressão de moléculas de adesão, quimiotaxia, "burst" oxidativo e aumento na produção de NO, promovendo a redução do recrutamento de neutrófilos para o foco inflamatório e, conseqüentemente, controle da resposta imunológica e efeitos anti-inflamatórios, resultados benéficos em patologias que têm por princípio uma resposta inflamatória exacerbada [9,10,13,16,24].

Por outro lado, a redução da atividade do sistema imunológico gera implicações como o aumento da susceptibilidade a infecções [24,25]. Estudos recentes têm focado na importância da ativação de receptores beta-adrenérgicos no controle da resposta imunológica, uma vez que a ativação desses receptores está relacionada com ações anti-inflamatórias, principalmente via inibição da atividade de neutrófilos. No entanto, dados da literatura que demonstrem o papel do estresse agudo no recrutamento de neutrófilos na vigência do processo inflamatório são escassos. Uma vez que o estresse agudo leva a ativação do SNAS e, sabendo que

a ativação de receptores beta-adrenérgicos correlaciona-se com a redução do recrutamento de neutrófilos na vigência do processo inflamatório, faz-se necessário avaliar o potencial efeito modulador negativo do estresse agudo de restrição no recrutamento de neutrófilos para o foco inflamatório, bem como investigar a participação da ativação dos receptores beta-adrenérgicos nesse processo. Desta forma, os resultados obtidos permitirão o avanço no entendimento dos mecanismos pelos quais o estresse impacta o sistema imunológico inato.

## **5. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **5.1. Animais**

Foram utilizados camundongos Swiss machos, com 8 semanas, provenientes do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Ciências fisiológicas da Universidade Estadual de Londrina, sob temperatura de  $22 \pm 1$  °C, ciclo 12h claro/ 12h escuro e sem restrição hídrica ou dietética. Os experimentos foram conduzidos de acordo com a Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade de Londrina (14993.2018.74/2018).

### **5.2. Drogas**

Carragenina (500µg/cavidade peritoneal, indução do processo inflamatório) foi adquirida da Sigma (St. Louis, MO, USA), propranolol (5mg/kg s.c, antagonista dos receptores  $\beta_1$  e  $\beta_2$  adrenérgicos) adquirida da Changzhou Yabang Pharmaceutical Co., LTD. (Jintan Qu, Changzhou Shi, Jiangsu Sheng, China), atenolol (20mg/kg s.c, antagonista do receptor  $\beta_1$  adrenérgico) adquirida da Ipca Laboratories Ltd. (Maharashtra, Índia). Todas as drogas foram reconstituídas em solução salina 0,9% e administrado 0,2mL/animal.

### **5.3. Protocolo de estresse agudo por restrição**

O estresse foi induzido por meio da restrição de movimentos, utilizando um tubo cônico para centrifugação (50 mL) com as duas extremidades fechadas, mas contendo orifícios nas extremidades para a passagem da cauda e para permitir a

respiração do animal. É importante ressaltar que este modelo é indolor, sem compressão e não gera hipertermia [26]. Os tubos permaneceram fixos sobre a bancada com o apoio de fita adesiva. O modelo de estresse por restrição foi o agudo. Os camundongos foram submetidos a uma única sessão de contenção por duas horas, realizada no período da manhã entre 08:00 h e 10:00h, conforme descrito por Sei e colaboradores [27]. Dados da literatura demonstram que o tempo de contenção de 2 horas promove a ativação do SNAS e do eixo HHA [28].

#### **5.4. Avaliação comportamental**

O teste comportamental no Campo Aberto foi utilizado para avaliar se o modelo utilizado provoca nos animais um comportamento ansiogênico símile. Esse teste permite avaliar alterações nas atividades locomotora, ansiedade e na capacidade exploratória do animal [29,30,31,32].

O Teste no campo aberto foi realizado em uma arena circular de acordo com os estudos de Lisboa e colaboradores [32]. Durante o teste, os animais permaneceram por 5 minutos dentro do campo aberto e foram determinados a distância percorrida pelo animal e o tempo de permanência nas zonas centrais e periféricas. A redução da permanência dos animais na zona central indica um comportamento ansiogênico símile, mostrando que o método utilizado é eficaz para a indução do estresse.

#### **5.5. Indução do recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal**

A indução do processo inflamatório agudo foi realizado por meio de injeção intraperitoneal de carragenina na dose de 500 $\mu$ g/cavidade [13,33]. A carragenina foi administrada após os animais terem sido submetidos às 2 horas de restrição.

#### **5.6. Contagem total e diferencial de leucócitos na cavidade peritoneal**

A coleta do lavado peritoneal foi realizada 4 horas após a administração intraperitoneal de carragenina. Os camundongos foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) e a lavagem peritoneal ocorreu com injeção de 1,6 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS)

contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (1 mM), através de uma incisão média no abdome sem danificar a musculatura. A contagem total de leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer, enquanto a contagem diferencial ocorreu através de esfregaços corados pela coloração rápida panótica (LaborClin; Produtos para Laboratório Ltda, Pinhais, PR, Brasil). A contagem foi realizada em microscópio óptico em objetiva de imersão em óleo (aumento de 1000x), diferenciando as células mononucleares de neutrófilos, quantificando 100 células por lâmina. Os resultados foram obtidos em porcentagem de células contadas e expressos como número de neutrófilos  $\times 10^6$ / mL. Após a coleta do lavado peritoneal, os animais foram eutanasiados com injeção intraperitoneal de cetamina (300 mg/kg) e xilazina (30 mg/kg).

### **5.7 Avaliação da produção do ânion superóxido através do ensaio de tetrazólio nitrozul (NBT)**

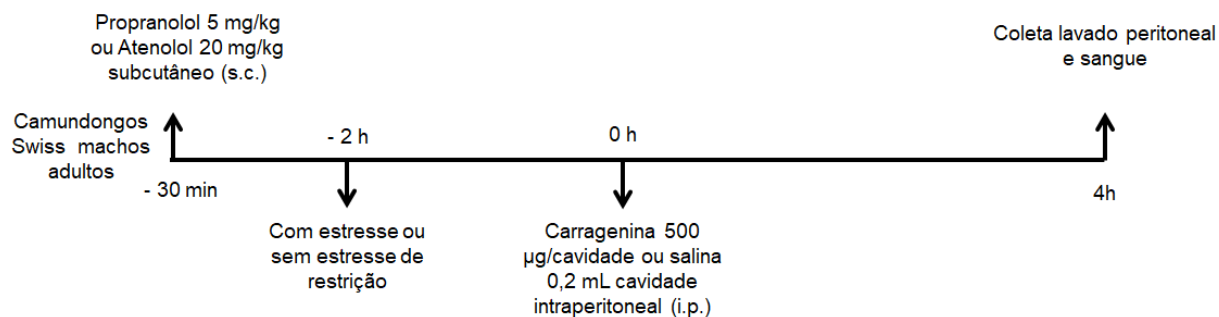
A quantificação de ânion superóxido no homogenato do lavado peritoneal total (1,6 mL PBS+EDTA) foi realizada através do ensaio de tetrazólio nitrozul (NBT). Após a coleta do lavado peritoneal, foram adicionados 50  $\mu$ L de homogeneizado com 100  $\mu$ L de NBT (1 mg/mL) na palca de 96 poços e incubado a 37°C durante 1h. O sobrenadante foi removido e o precipitado formazano foi solubilizado pela adição de 120  $\mu$ L de KOH 2 M e 140  $\mu$ L de DMSO. A redução do NBT mensurada em espectrofotômetro a 600 nm. Os valores foram ajustados considerando 1 mL da amostra do lavado peritoneal e os dados foram apresentados como redução do NBT a 600 nm [34].

### **5.8 Quantificação da produção de óxido nítrico**

A concentração de nitrito no exsudato peritoneal foi determinada pelo método de Griess como um indicador da produção de óxido nítrico. Foram aliquoteados volume de 50  $\mu$ L do exsudato e adicionado com 50  $\mu$ L de reagente de Griess (1% de sulfanilamida e 0,1% de N- (1-Naftil) etilenodiamina em ácido ortofosfórico ( $H_3PO_4$ ) a 5%) em microplacas de 96 poços. Após 10 minutos de incubação à temperatura ambiente, foi realizada a leitura da absorvância. Uma curva de calibração foi feita usando diluições de  $NaNO_2$  e a absorvância foi determinada a 550 nm em leitor de microplacas [35].

## 5.9. Delineamento experimental

Os camundongos foram divididos em oito grupos experimentais com 5 animais em cada grupo e, os experimentos foram realizados em duplicata.



**Figura 1: Protocolo experimental**

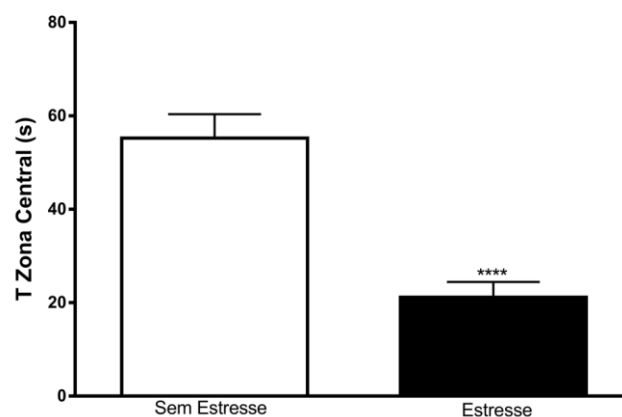
## 6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

O software utilizado para as análises estatísticas dos dados foi *GraphPrim* 6.0. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM). Diferenças entre os grupos foram avaliadas pela análise de variância de uma via (One-Way ANOVA) seguido do teste de Tukey; teste T Student não pareado (Campo aberto). Foram consideradas diferenças significativas para  $p < 0,05$ .

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Efeito do estresse agudo de restrição no comportamento exploratório.

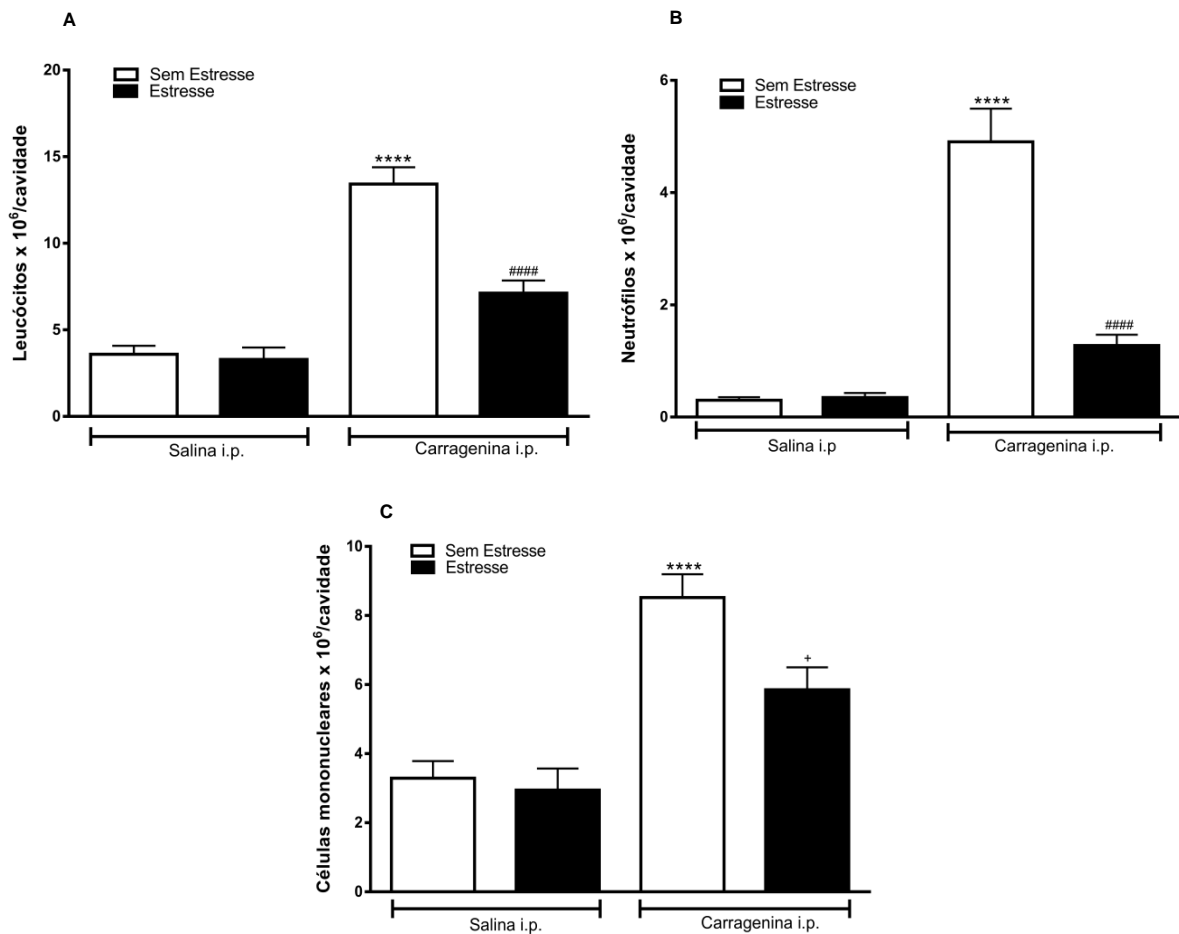
Os resultados indicam que os animais submetidos às sessões de estresse agudo por restrição permaneceram menos tempo na área central durante o teste do campo aberto quando comparados aos animais não submetidos à restrição (**Figura 2**). Esse comportamento demonstrou que os animais apresentaram comportamento ansiogênico similar e que o método de restrição foi efetivo, corroborando com os resultados encontrados na literatura [28].



**Figura 2: Efeitos do estresse agudo de restrição na atividade exploratória na região central no teste de campo aberto.** Os camundongos foram colocados no tubo cônico de centrífuga de 50 mL com ventilação por 2 horas. Após o período de restrição, os camundongos foram colocados no teste de campo aberto por 300 segundos, e foi monitorado o tempo de permanência na região central. Os resultados são expressos como as médias  $\pm$  EPM. (n=10 por grupo) \*\*\*\* p<0,0001 vs sem estresse. (Teste t não pareado).

## **7.2. Efeito do estresse agudo de restrição no recrutamento de leucócitos totais, neutrófilos e células mononucleares para a cavidade peritoneal induzido por carragenina.**

O próximo passo foi avaliar se o estresse induzido por restrição seria capaz de modular o recrutamento de leucócitos totais, neutrófilos e células mononucleares induzido pela administração intraperitoneal de carragenina. Corroborando aos dados da literatura, a administração intraperitoneal de carragenina promoveu aumento do recrutamento de leucócitos totais (**Figura 3A**), neutrófilos (**Figura 3B**) e células mononucleares (**Figura 3C**) para a cavidade peritoneal dos animais que não foram submetidos ao estresse quando comparados aos animais que receberam apenas a administração intraperitoneal de salina [13,33]. No entanto, os camundongos submetidos ao estresse de restrição apresentaram redução significativa no recrutamento de leucócitos totais, neutrófilos e células mononucleares para o foco da inflamação induzida por carragenina quando comparados aos animais submetidos ao mesmo estímulo inflamatório, mas na ausência de estresse (**Figura 3A, 3B e 3C**).

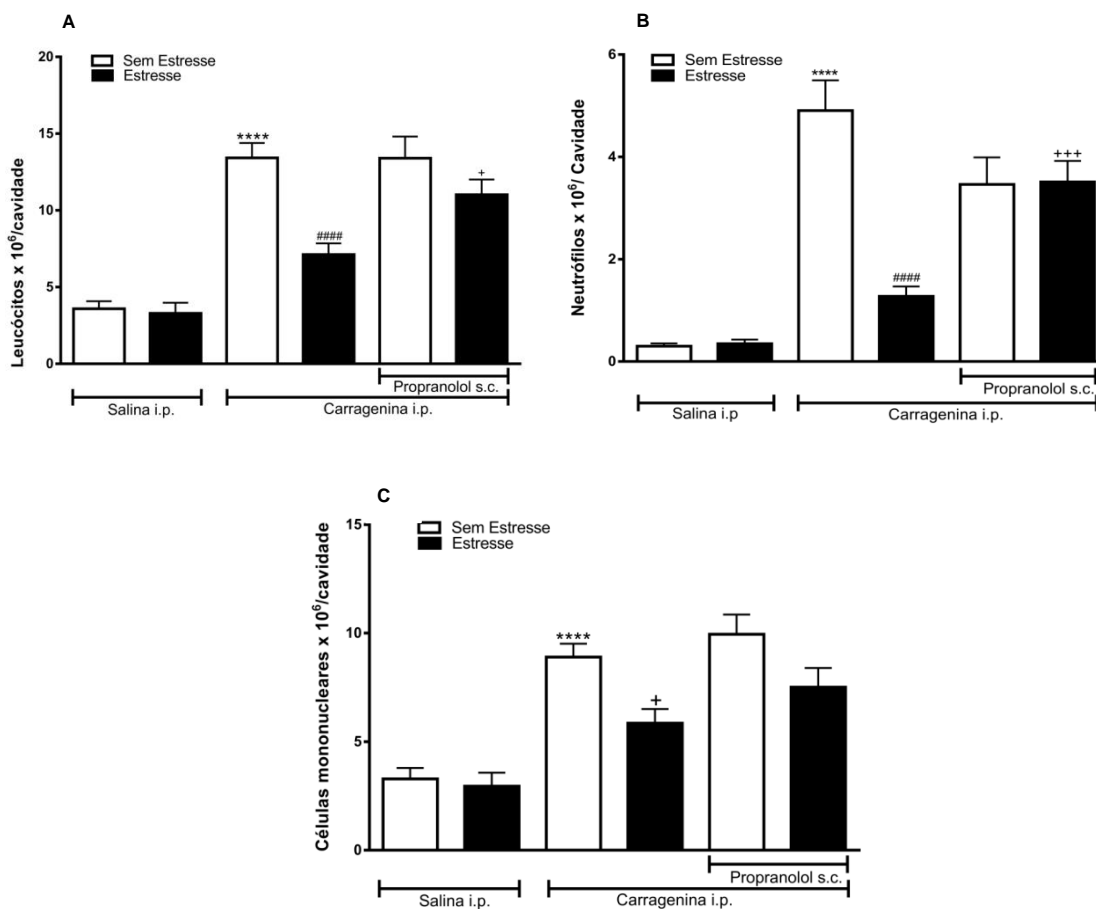


**Figura 3: Efeito do estresse agudo de restrição na migração de leucócitos totais, neutrófilos e células mononucleares na cavidade peritoneal induzido por carragenina.** Os camundongos foram colocados no tubo cônico de centrífuga de 50 mL por 2 horas. Após o período de restrição, injetou-se carragenina (500  $\mu\text{g}/\text{cavidade}$ ) ou solução salina i.p. O recrutamento de leucócitos totais (Figura 2A), neutrófilos (Figura 2B) e células mononucleares (Figura 2C) foi determinado 4 horas após as administrações intraperitoneais. Os resultados são expressos como as médias  $\pm$  EPM ( $n = 8$  a  $14$  por grupo experimental). <sup>\*\*\*\*</sup>  $p < 0,0001$  vs sem estresse + salina i.p.; <sup>####</sup>  $p < 0,0001$ ; <sup>+</sup>  $p < 0,05$  vs sem estresse agudo + carragenina i.p. (ANOVA, seguido pelo teste de Tukey).

### **7.3. Efeito do pré-tratamento com propranolol no recrutamento de leucócitos totais, neutrófilos e células mononucleares para cavidade peritoneal induzida por carragenina nos animais submetidos ao estresse agudo de restrição.**

Uma vez que o estresse agudo por restrição promoveu redução do recrutamento de neutrófilos, leucócitos totais e células mononucleares, o próximo passo foi investigar se a ativação dos receptores  $\beta$ -adrenérgicos estariam envolvidos nesse processo.

Como demonstrado nas figuras **4A** e **4B**, o pré-tratamento com propranolol nos animais que foram submetidos ao estresse de restrição e receberam carragenina i.p impediu a redução do recrutamento de leucócitos totais e neutrófilos quando comparado ao grupo submetido ao estresse de restrição e que receberam carragenina i.p.. Em relação as células mononucleares (**Figura 4C**), houve tendência na restauração da migração, contudo, o resultado não foi estatisticamente significativo.



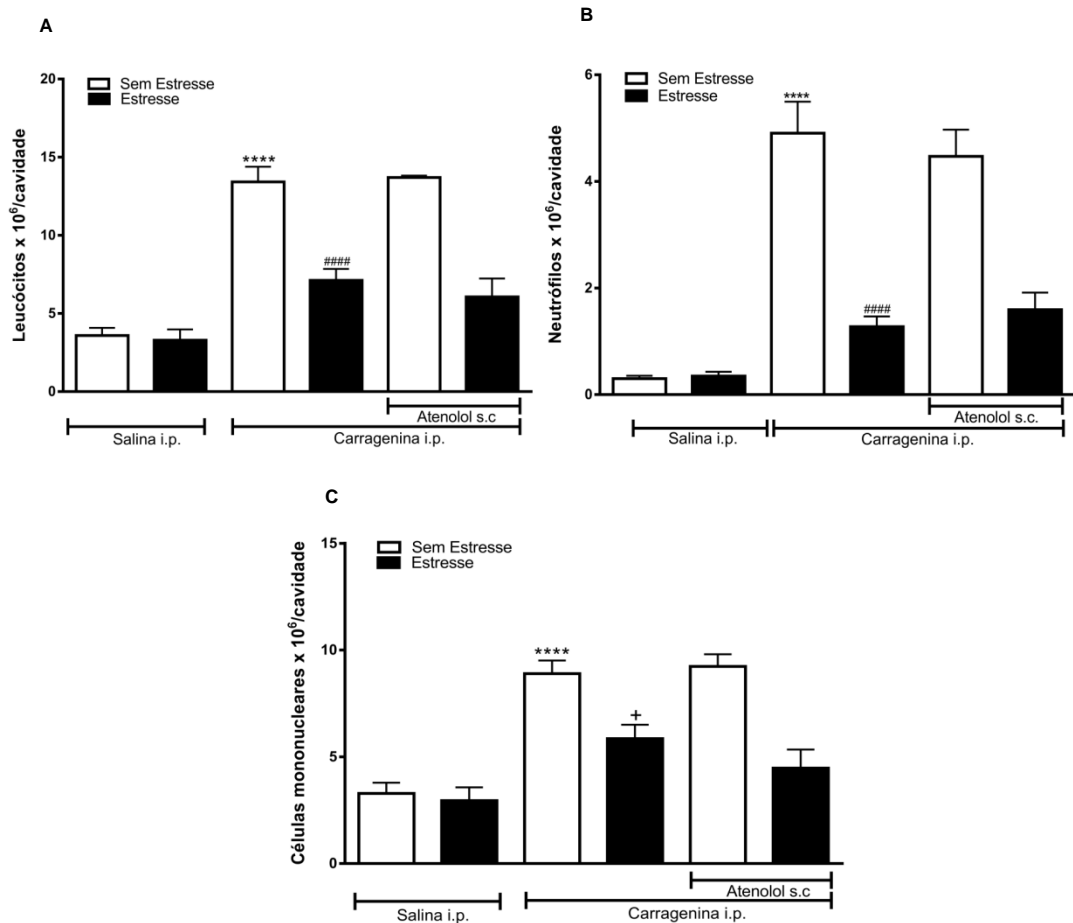
**Figura 4: Efeito do pré-tratamento com propranolol no recrutamento de leucócitos totais, neutrófilos e células mononucleares para cavidade peritoneal induzida por carragenina no estresse agudo de restrição.** Os animais foram pré-tratados, via subcutânea (s.c.), com propranolol 5 mg/kg ou salina. Após 30 minutos, os camundongos foram colocados no tubo cônico de centrífuga de 50 mL por 2 horas. Após período de restrição, injetou-se carragenina (500 µg/cavidade) ou solução salina i.p. O recrutamento de leucócitos totais (Figura 4A), neutrófilos (Figura 4B) e células mononucleares (Figura 4C) foi determinado após 4 horas. Os resultados são expressos como as médias ± EPM. (n= 8 a 15 por grupo experimental). Painel A) \*\*\*\* p <0,0001 vs sem estresse + salina.; ### p <0,0001 vs sem estresse + carragenina i.p.; + p <0,05 vs estresse + carragenina. Painel B) \*\*\*\* p <0,0001 vs sem estresse + salina; ### p <0,0001 vs sem estresse + carragenina; +++ p <0,001 vs estresse + carragenina. Painel C) \*\*\*\* p <0,0001 vs sem estresse + salina; (ANOVA, seguido pelo teste de Tukey).

#### **7.4. Efeito do pré-tratamento com atenolol no recrutamento de leucócitos totais, neutrófilos e células mononucleares para cavidade peritoneal induzido por carragenina no estresse agudo de restrição.**

Visto que o pré-tratamento com antagonista não seletivo dos receptores  $\beta_1$  e  $\beta_2$  atenuou a redução do recrutamento de leucócitos totais e neutrófilos para a cavidade peritoneal induzido por carragenina no estresse agudo de restrição, nesta fase do estudo, objetivamos determinar se a ativação dos receptores  $\beta_1$  durante o estresse estaria contribuindo com a redução do recrutamento. Para isso, os animais foram pré-tratados com atenolol (antagonista seletivo dos receptores  $\beta_1$ ) na dose de 20mg/kg/s.c 30 minutos antes de serem submetidos ao estresse de restrição.

Os resultados obtidos mostraram que o pré-tratamento com atenolol não reverteu de forma significativa a redução da migração de leucócitos totais (**Figura 5A**), neutrófilos (**Figura 5B**) e células mononucleares (**Figura 5C**) em animais que foram submetidos ao estresse de restrição e receberam carragenina i.p., comparado com animais que foram submetidos ao estresse de restrição em vigência do processo inflamatório.

Esses resultados sugerem que a redução do recrutamento de neutrófilos e leucócitos totais para o foco inflamatório observado no estresse de restrição é decorrente da ativação dos receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos.

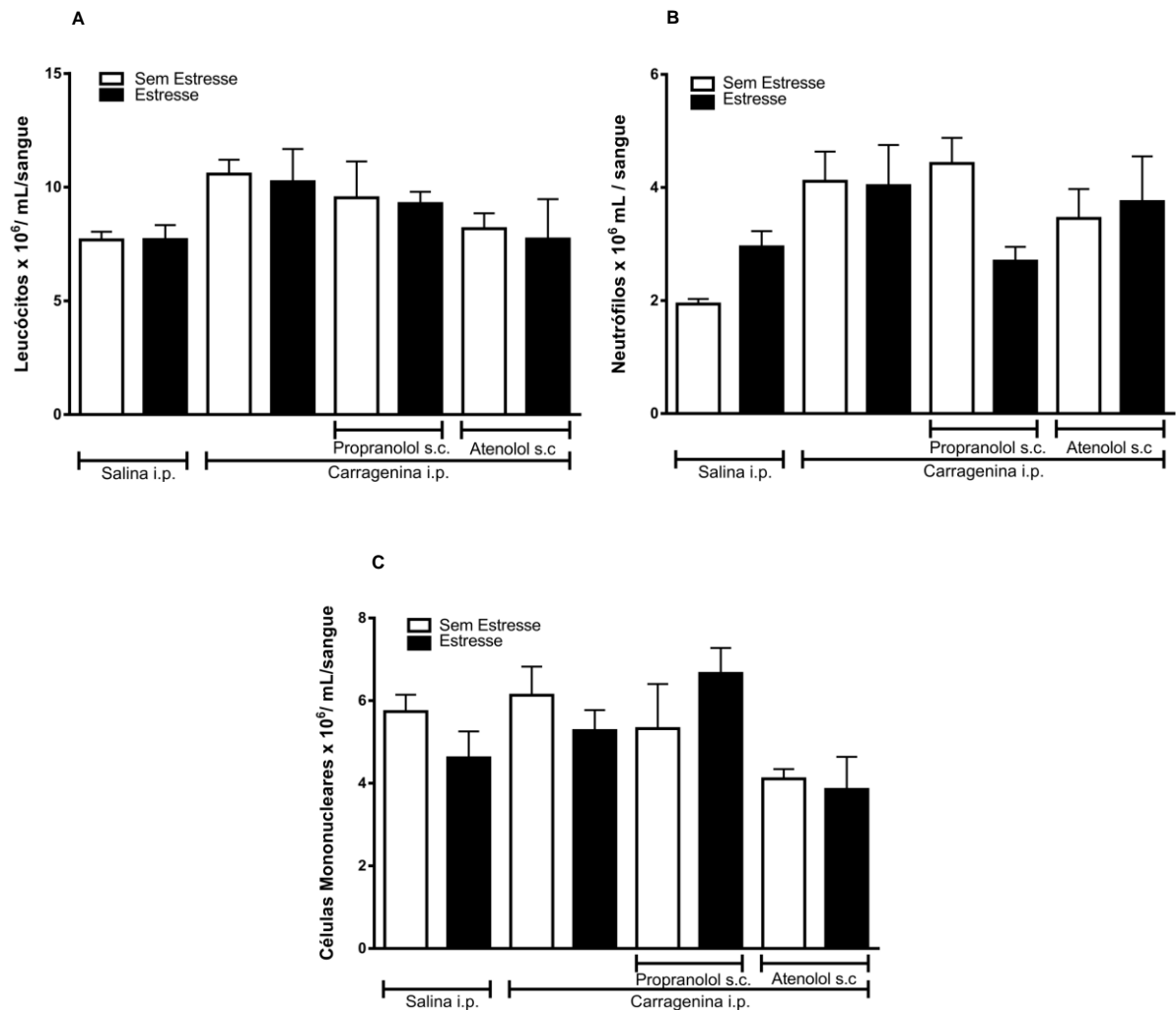


**Figura 5: Efeito do pré-tratamento com atenolol no recrutamento de leucócitos totais, neutrófilos e células mononucleares para cavidade peritoneal induzido por carragenina no estresse agudo de restrição.** Os animais foram pré-tratados, via subcutânea (s.c.), com atenolol 20mg/kg. Após 30 minutos, os camundongos foram colocados no tubo cônico de centrifuga de 50 mL por 2 horas. Após o período de restrição, injetou-se carragenina (500 µg/cavidade) ou solução salina i.p. O recrutamento de leucócitos totais (Figura 5A), neutrófilos (Figura 5B) e células mononucleares (Figura 5C) foram determinados após 4 horas. Os resultados são expressos como as médias ± EPM. (n= 4 a 15 por grupo experimental). Figura 4A e 4B) \*\*\*\* p<0,0001 vs sem estresse + salina i.p. ; ##### p<0,0001 vs sem estresse + carragenina; Figura 4C) \*\*\*\* p<0,0001 vs sem estresse + salina; + p<0,05 vs sem estresse + carragenina; (ANOVA, seguido pelo teste de Tukey).

### **7.5. Efeito do estresse agudo de restrição e do pré-tratamento com propranolol e atenolol no número de leucócitos totais, neutrófilos e monócitos circulantes após a administração de carragenina intraperitoneal.**

Nesta etapa do estudo foi avaliado se o estresse agudo de restrição poderia reduzir o recrutamento de leucócitos totais, neutrófilos e células mononucleares para o foco inflamatório por alterar o número leucócitos circulantes e, se a ativação de receptores  $\beta$ -adrenérgicos poderia estar envolvido nesse processo.

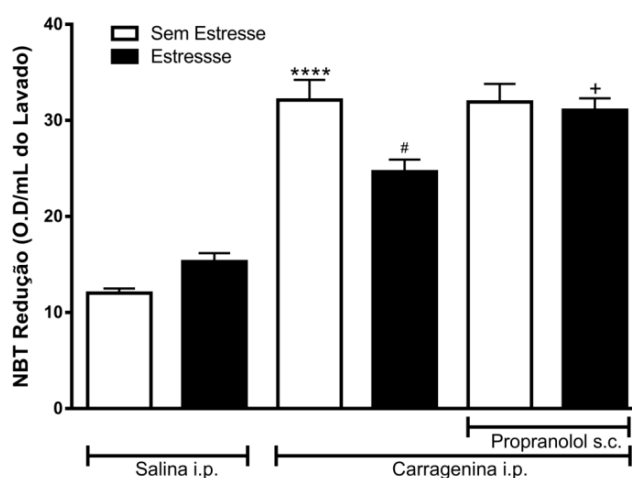
Os resultados obtidos mostraram que o número de leucócitos totais, neutrófilos e células mononucleares presentes no sangue (**Figura 6A, 6B e 6C**) não foi alterado pelo estresse de restrição, assim como o pré-tratamento com propranolol e atenolol não modificou esses parâmetros.



**Figura 6: Efeito do estresse agudo de restrição e do pré-tratamento com propranolol e atenolol nos níveis de leucócitos totais, neutrófilos e células mononucleares circulantes após a administração de carragenina intraperitoneal.** Os animais foram pré-tratados, via subcutânea (s.c.), com propranolol 5 mg/kg ou atenolol 20mg/kg. Após 30 minutos, os camundongos foram colocados no tubo cônico de centrifuga de 50 mL por 2 horas. Após o período de restrição, injetou-se carragenina (500 µg/cavidade) ou solução salina i.p.. Os leucócitos totais (Figura 6A), neutrófilos (Figura 6B) e células mononucleares (Figura 6C) presentes no sangue foram quantificados após 4 horas da administração de carragenina. Os resultados são expressos como as médias ± EPM. Figura 6A, 6B e 6C). Não houve diferença significativa entre os grupos experimentais (ANOVA, seguido pelo teste de Tukey).

### 7.6. Efeito do estresse agudo de restrição e do pré-tratamento com propranolol na produção do ânion superóxido no lavado peritoneal.

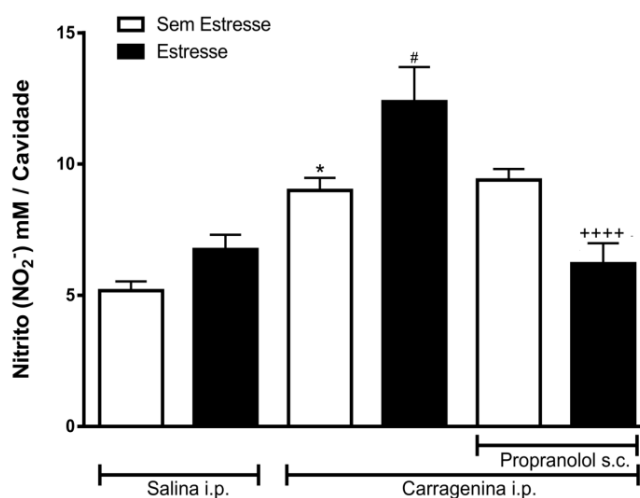
Os resultados encontrados (**Figura 7**) demonstram que os animais que receberam carragenina i.p produziram mais ânion superóxido no exsudato peritoneal quando comparados com os animais que receberam salina i.p.. Além disso, os animais que passaram pelo estresse agudo de restrição e posteriormente receberam carragenina i.p. apresentaram uma menor capacidade em produzir ânion superóxido quando comparados com animais que receberam carragenina i.p. e não foram submetidos ao estresse agudo de restrição. O pré-tratamento com propranolol nos animais que foram submetidos ao estresse de restrição e receberam carragenina i.p impediu a redução da formação de ânion superóxido quando comparado ao grupo submetido ao estresse de restrição e que receberam carragenina i.p..



**Figura 7: Efeito do estresse agudo de restrição e do pré-tratamento com propranolol no metabolismo oxidativo na cavidade peritoneal.** Os animais foram pré-tratados, via subcutânea (s.c.), com propranolol 5 mg/kg. Após 30 minutos, os camundongos foram colocados no tubo cônico de centrifuga de 50 mL por 2 horas. Após período de restrição, injetou-se carragenina (500 µg/cavidade) ou solução salina i.p. O ânion superóxido foi determinado após 4 horas através do ensaio de tetrazólio nitroazul (NBT). Os resultados são expressos como as médias  $\pm$ EPM. (n= 7 a 10 por grupo experimental). \*\*\*\* p<0,0001 vs sem estresse + salina; # p <0,05 vs sem estresse + carragenina; + p<0,05 vs estresse + carragenina. (ANOVA, seguido pelo teste de Tukey).

### 7.7. Efeito do estresse agudo de restrição e do pré-tratamento com propranolol na produção de óxido nítrico no exsudato peritoneal.

Os resultados obtidos demonstram que os animais que receberam carragenina i.p. produziram mais nitrito no exsudato peritoneal quando comparados com os animais que receberam salina i.p. (**Figura 8**). Além disso, os animais que passaram pelo estresse agudo de restrição e posteriormente receberam carragenina i.p. produziram mais NO quando comparados com animais que receberam carragenina i.p. e não foram submetidos ao estresse agudo de restrição. O pré-tratamento com propranolol nos animais que foram submetidos ao estresse de restrição e receberam carragenina i.p. impediu o aumento da formação de nitrito quando comparado ao grupo submetido ao estresse de restrição e que recebeu carragenina i.p.



**Figura 8: Efeito do estresse agudo de restrição e do pré-tratamento com propranolol na produção de nitrito na cavidade peritoneal.** Os animais foram pré-tratados, via subcutânea (s.c.), com propranolol 5 mg/kg. Após 30 minutos, os camundongos foram colocados no tubo cônico de centrifuga de 50 mL por 2 horas. Após período de restrição, injetou-se carragenina (500 µg/cavidade) ou solução salina i.p.. O óxido nítrico foi determinado após 4 horas da administração de carragenina através da quantificação de nitrito pelo ensaio de Griess. Os resultados são expressos como as médias  $\pm$ EPM. (n= 7 a 10 por grupo experimental). \* p<0,05 vs sem estresse + salina; # p <0,05 vs sem estresse + carragenina; +++++ p<0,0001 vs estresse + carragenina. (ANOVA, seguido pelo teste de Tukey).

## 8. DISCUSSÃO

O neutrófilo é a principal e predominante célula recrutada para controlar os processos infecciosos e inflamatórios agudos, uma vez no sítio infeccioso, estas células realizam o processo de fagocitose, resultando na formação de fagossomas [1]. A eliminação dos patógenos ocorre dentro dos fagolisossomas através da liberação de enzimas lisossomais, como elastase e defensinas, espécies reativas de oxigênio (EROs) e nitrogênio (RNS). Além da fagocitose, há a liberação de NETs (do inglês: neutrophil extracellular traps) que imobilizam os microrganismos e os eliminam através da capacidade proteolítica [36]. Portanto, o recrutamento dos neutrófilos e o perfeito funcionamento dos mecanismos de eliminação dos agentes invasores são fundamentais para manutenção da primeira linha de defesa, além de evitar a instalação de processos infecciosos e promover a eliminação de agentes desencadeantes da inflamação [37,38]. Contudo, sabe-se que vários fatores podem modificar as respostas imunológicas frente aos agentes invasores, dentre eles, podemos destacar o estresse, que através da liberação dos glicocorticoides modula negativamente o processo inflamatório [39,40]. Além disso, estudos tem destacado o papel imunomodulador negativo das catecolaminas liberadas durante o estresse, que exercem seu efeito através da ligação aos receptores adrenérgicos [41,42,43,44]

Neste contexto, a primeira etapa do presente estudo demonstrou que o modelo de estresse agudo de restrição utilizado foi efetivo, pois, através da avaliação comportamental no teste de campo aberto, os animais submetidos ao estresse de restrição permaneceram mais tempo na zona periférica quando comparados com os animais que não receberam o estresse, além disso, o estresse reduziu a atividade exploratória da zona central do teste, mostrando que os animais apresentaram comportamento ansiogênico similar, corroborando com o estudo realizado por Lima [45]. Ademais, podemos inferir que o método utilizado induz estresse, pois Matsuhisa e colaboradores demonstraram aumento da atividade do sistema nervoso autônomo simpático (SNAS) e do eixo HHA através da elevação nas concentrações adrenalina, noradrenalina e glicocorticoides, utilizando o método agudo de restrição [46].

Demonstramos pela primeira vez que o recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal em vigência do processo inflamatório induzido por carragenina

foi modulado negativamente em animais previamente submetidos ao estresse agudo de restrição. De fato, estudos demonstram que o estresse agudo de restrição modula negativamente a resposta inflamatória, uma vez que diminui atividade celular e fenótipo de células natural killer (NK) [46], promove inibição de células T [47] e supressão da fagocitose de macrófagos e neutrófilos [48].

Estudos recentes mostram que a ativação dos receptores beta-adrenérgico está envolvida com a redução do recrutamento de neutrófilos [13,18]. Silva e colaboradores verificaram que o isoproterenol, agonista beta adrenérgico não seletivo, reduz a migração de neutrófilos induzida por carragenina para cavidade peritoneal de camundongos, bem como a síntese de mediadores envolvidos direta e indiretamente na quimiotaxia dos neutrófilos como o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e KC/CXCL1 e, que esses efeitos são abolidos através do pré-tratamento com propranolol, antagonista não seletivo  $\beta_1$  e  $\beta_2$  - adrenérgico [13]. Ademais, Marino e colaboradores demonstraram que o pré-tratamento com adrenalina ou isoprenalina reduz a quimiotaxia dos neutrófilos induzida por N-Formylmethionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP), e que o bloqueio seletivo dos receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos com o antagonista ICI-118,551 impede a redução da quimiotaxia e o mesmo resultado não foi encontrado com o uso de CGP-12177 e L-74,8337, evidenciando desta maneira a importância da ativação de receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos na redução da recrutamento de neutrófilos [18]. Outrossim, ensaios *in vitro* mostram que a ativação de receptores beta-adrenérgicos com adrenalina reduz a quimiotaxia de polimorfonucleares de humanos induzida por fMLP, além de diminuir a expressão da molécula de adesão CD11b na superfície de neutrófilos, a qual é responsável pela adesão ao endotélio, etapa esta, importante no recrutamento dos neutrófilos [17]. É importante ressaltar que esses estudos não utilizaram o modelo de estresse agudo de restrição em suas abordagens. Nosso trabalho verificou que o pré-tratamento com propranolol dos animais submetidos ao estresse agudo de restrição impediu a redução da migração dos neutrófilos para a cavidade peritoneal na vigência de processo inflamatório agudo, além disso, o mesmo resultado não foi encontrado com o pré-tratamento com atenolol, bloqueador específicos dos receptores  $\beta_1$ -adrenérgicos, demonstrando que a ativação dos receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos promove a redução da migração dos neutrófilos durante o estresse agudo de restrição. Assim, nossos resultados em conjunto com os dados da literatura reforçam

a conexão existente entre o SNAS, pois demonstramos que a ativação  $\beta_2$ -adrenérgico é responsável pela redução do recrutamento de neutrófilos [13,18,41,49,50,51].

Dados encontrados na literatura, sugerem que o estresse pode modular o número de leucócitos totais circulantes e neutrófilos [52]. Desta forma, a próxima etapa do estudo foi determinar se a redução do recrutamento de neutrófilos observada no estresse de restrição, poderia ser decorrente da redução do número de leucócitos circulantes. Não observamos diferenças estatisticamente significantes na contagem de leucócitos totais, neutrófilos e monócitos sanguíneos em nossos experimentos, indicando que a redução da migração de neutrófilos observada em nosso modelo experimental não é decorrente de um menor número de neutrófilos circulantes, contudo, houve uma tendência de aumento na contagem de neutrófilos. Esses resultados corroboram em parte com dados encontrados na literatura, onde verificou-se que o estresse induz o aumento dos neutrófilos circulantes e reduz o número de leucócitos totais [52, 53].

A produção de EROs e ânion superóxido são fundamentais para o recrutamento de neutrófilos no foco inflamatório [54,55]. De fato, a administração intraperitoneal de carragenina promove aumento da produção de ânion superóxido [56]. Neste contexto, nossos resultados demonstram que os animais submetidos ao estresse de restrição apresentam redução na formação do ânion superóxido no exsudato peritoneal após a administração de carragenina, e que esse efeito é mediado pela ativação de receptor beta-adrenérgico, uma vez que o pré-tratamento dos animais submetidos ao estresse de restrição com propranolol impediu a redução na produção do ânion superóxido na vigência da inflamação aguda. A produção deficiente de ânion superóxido está associada com a redução na migração de neutrófilos para o foco inflamatório ou infeccioso. Hattori e colaboradores realizaram diversos estudos *in vitro* e *in vivo* demonstrando que o uso de inibidores da enzima NADPH oxidase reduz a produção de ROS e ânion superóxido e consequente diminuição na migração de neutrófilos para o foco inflamatório [57]. Estudo realizado por Scanzo e colaboradores mostraram *in vitro* que a ativação de receptores beta-adrenérgicos com adrenalina reduz a produção de EROs em polimorfonucleares humanos induzida por fMLP. Este estudo demonstrou que a redução da produção de EROs foi provocada pela ativação de receptores  $\beta$ -adrenérgicos, pois, a pré-

incubação com propranolol bloqueou o efeito da adrenalina, além disso, o bloqueio dos receptores  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$  adrenérgicos não produziu o mesmo efeito na produção de EROs [17].

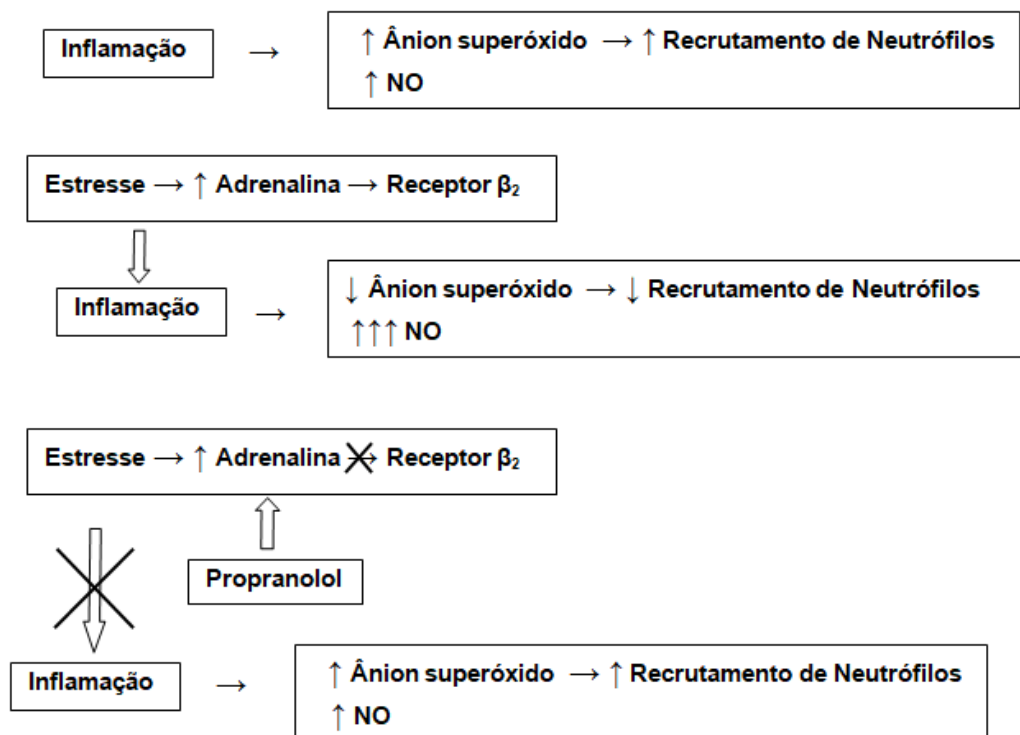
A ativação dos receptores beta adrenérgicos também influencia a produção de NO, pois Chi e colaboradores demonstraram que a associação de LPS com adrenalina ou noradrenalina potencializaram a expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e conseqüentemente a produção de NO em macrófagos, e o pré-tratamento com propranolol impediu esse efeito sinérgico [57]. Desta maneira, podemos inferir que o presente estudo corrobora com os resultados descritos, pois, demonstramos que o estresse de restrição associado ao processo inflamatório agudo aumentou significativamente a produção de NO quando comparado aos animais que foram somente submetidos ao processo inflamatório, além disso, o pré-tratamento com propranolol impediu esse aumento significativo.

O NO é um mediador químico sintetizado através da enzima óxido nítrico sintase (NOS) que utiliza o aminoácido L-arginina como substrato [57]. Atua em diversos processos fisiológicos como neurotransmissão, controle da pressão sanguínea e coagulação, além disso, sua produção é aumentada durante o processo inflamatório agudo, tendo papel importante na destruição de micro-organismos invasores intracelulares através da ação microbicida [58]. Contudo, estudos têm demonstrado que o aumento da produção de NO durante a inflamação aguda, proveniente da iNOS, está relacionado com a diminuição do recrutamento de neutrófilos através da redução da indução da expressão de moléculas de adesão no endotélio como a ICAM-1 [21] e, da dessensibilização e internalização do receptor quimiotáxico CXCR2 (um dos receptores da citocina IL-8), receptor expresso na superfície dos neutrófilos e de extrema importância para o recrutamento destes leucócitos para o sítio da inflamação [20,21,22]. Neste contexto, podemos inferir que a redução do recrutamento de neutrófilos está associado ao aumento de NO motivado pelo sinergismo do estresse agudo de restrição e processo inflamatório, pois o pré-tratamento com propranolol reduziu a produção de NO e impediu a redução do recrutamento de neutrófilos. De fato, a administração de moléculas doadoras de NO diminui o rolamento e adesão de neutrófilos ao endotélio vascular, enquanto a inibição farmacológica ou a deficiência gênica da iNOS potencializa as interações entre leucócito-endotélio [20,21,59,60,61,62].

Em resumo, nossos resultados demonstram pela primeira vez que o estresse agudo de restrição modula negativamente a migração de neutrófilos para o sítio inflamatório induzida pela administração de carragenina, por mecanismos dependentes da ativação de receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos. É importante ressaltar que estão envolvidos nesse processo a redução da produção de ânion superóxido e aumento de óxido nítrico no foco da inflamação. Assim, os resultados sugerem que o estresse agudo de restrição promove modulação negativa da resposta imunológica inata, o que pode gerar implicações como o aumento da susceptibilidade a infecções.

## **9. CONCLUSÃO**

Desta forma, o conjunto de resultados apresentados demonstram pela primeira vez que estresse agudo de restrição promove redução da resposta imunológica inata mediante a ativação de receptores  $\beta_2$  – adrenérgicos, pois o bloqueio destes receptores com o uso de propranolol impediu a redução da produção de ânion superóxido e o aumento exacerbado de óxido nítrico, impedindo a redução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal na vigência do processo inflamatório.



**Figura 9: Efeito do estresse agudo de restrição e do pré-tratamento com propranolol na produção de óxido nítrico, ânion superóxido e no recrutamento de neutrófilos na inflamação.** O estresse agudo de restrição promove redução do recrutamento de neutrófilos durante o processo inflamatório via ativação dos receptores  $\beta_2$  – adrenérgicos, pois a ativação destes receptores promove aumento exacerbado do NO e redução de ânion superóxido e este efeito é bloqueado com o uso de propranolol.

## CONFLITO DE INTERESSES

Os autores negam conflito de interesse.

## FINANCIAMENTO

Não houve financiamento deste estudo.

## AGRADECIMENTO

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de pesquisa.

## 10. REFERÊNCIAS

1. MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame. **Cell**, v. 140, p. 771-776, 2010.
2. ALVES-FILHO, J.C.; FREITAS, A.; SPILLER, F.; SOUTO, F.O.; Cunha, F.Q. The role of neutrophils in severe sepsis. **Shock**, v. 30, p. 3–9, 2008.
3. MCDONALD, B.; PITTMAN, K.; MENEZES, G.B.; HIROTA, S.A.; SLABA, I.; WATERHOUSE, C.C.; BECK, P.L.; MURUVE, D.A.; KUBES, P. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. **Science**, v. 330, p. 362–366, 2010.
4. SOLOMON, G.F.; MOSS, R.H. Emotions immunity, and disease; A speculative theoretical integration. **Arch Gen Psychiatry**, v. 11, p. 657-674, 1964.
5. LOURES, D.L.; ANNA, I.S.; BALDOTTO, C.S.R.; SOUSA, E.B.; NÓBREGA, A.C.L. Estresse Mental e Sistema Cardiovascular. **Arq Bras Cardiol**, v.78, p. 525–530, 2002.
6. STEPTOE, A.; KIVIMAKI, M. Stress and cardiovascular disease. **Nat Ver Cardiol**, v. 9, p. 360–370, 2012.
7. FINK, G. Stress: Concepts, Cognition, Emotion, and Behavior: Handbook in Stress Series. San Diego: **Academic press**, 2016. 502p.
9. HASKÓ, G.; NÉMETH, Z.H.; SZABÓ, C.; ZSILLA, G.; SALZMAN, A.L.; VIZI, E.S. Isoproterenol inhibits IL-10, TNF- $\alpha$ , and nitric oxide production in RAW 264.7 macrophages. **Brain Res Bull**, v. 45, p. 183–187, 1998.
10. SELÉNYI, J.; KISS, J.P.; VIZI, E.S. Differential involvement of sympathetic nervous system and immune system in the modulation of TNF- $\alpha$  production by  $\alpha$ 2- and  $\beta$ -adrenoceptors in mice. **J Neuroimmunol**, v. 103, p. 34–40, 2000.
11. SZELÉNYI, J.; KISS, J.P.; VIZI, E.S. Differential involvement of sympathetic nervous system and immune system in the modulation of TNF- $\alpha$  production by  $\alpha$ 2- and  $\beta$ -adrenoceptors in mice. **J Neuroimmunol**, v. 103, p. 34–40, 2000.
12. MERT, T.; TUGTAG, B.; KILINC, M.; SAHIN, E.; OKSUZ, H.; GUNES, Y. Preventive and therapeutic effects of a beta adrenoceptor agonist, dobutamine, in carrageenan-induced inflammatory nociception in rats. **Inflammation**, 37, p. 1814–1825, 2014
13. SILVA, R.L.; CASTANHEIRA, F.V.; FIGUEIREDO, J.G; BASSI, G.S. FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q.; CUNHA, T.M.; KANASHIRO, A. Pharmacological Beta-Adrenergic Receptor Activation Attenuates Neutrophil Recruitment by a Mechanism Dependent on Nicotinic Receptor and the Spleen. **Inflammation**, v. 39, p. 1405-1413, 2016.
14. KAVELAARS, A. Regulated expression of alpha-1 adrenergic receptors in the

immune system. **Brain Behav Immun.** v. 16, p. 799-807, 2002.

15. KOLMUS, K.; TAVERNIER, J.; GERLO, S.  $\beta$ 2-Adrenergic receptors in immunity and inflammation: stressing NF- $\kappa$ B. **Brain Behav Immun**, v. 45, p. 297-310, 2015.

16. VIDA, G.; PEÑA, G.; KANASHIRO, A.; THOMPSON-BONILLA, M.R.; PALANGE, D.; DEITCH, E.A.; ULLOA, L.  $\beta$ 2-Adrenoreceptors of regulatory lymphocytes are essential for vagal neuromodulation of the innate immune system. **FASEB Journal**, v. 25, p. 4476–4485, 2011.

17. SCANZANO, A.; SCHEMBRI, L.; RASINI, E.; LUINI, A.; DALLATORRE, J.; LEGNARO, M.; BOMBELLI, R.; CONGIU, T.; COSENTINO, M.; MARINO, F. Adrenergic modulation of migration, CD11b and CD18 expression, ROS and interleukin-8 production by human polymorphonuclear leukocytes. **Inflamm Res.** v. 64, p. 127-135, 2015.

18. MARINO, F., SCANZANO, A., PULZE, L., PINOLI, M., RASINI, E., LUINI, A., COSENTINO, M.  $\beta$ 2-Adrenoceptors inhibit neutrophil extracellular traps in human polymorphonuclear leukocytes. **J Leukoc Biol.** v 104, p.603-614, 2018

19. CHI, D.; QUI, M.; KRISHNASWAMY, G.; LI, C.; STONE, W. Regulation of nitric oxide production from macrophages by lipopolysaccharide and catecholamines. **Nitric Oxide**, v. 8, p. 127–132, 2003.

20. DAL SECCO, D.; PARON, J.A.; DE OLIVEIRA, S.H.; FERREIRA, S.H.; SILVA, J.S.; CUNHA, F. Q. Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. **Nitric Oxide**, v. 9, p.153-164, 2003

21. DAL SECCO, D.; MOREIRA, A.P.; FREITAS, A.; SILVA, J.S.; ROSSI, M.A.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Nitric oxide inhibits neutrophil migration by a mechanism dependent on ICAM-1: role of soluble guanylate cyclase. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, v.15, n.1, p.77-86, 2006.

22. DAL SECCO, D.; FREITAS, A.; ABREU, M. A.; GARLET, T. P.; ROSSI, M. A.; FERREIRA, S. H.; SILVA, J.S.; ALVES-FILHO, J.C.; CUNHA, F. Q. Reduction of ICAM-1 expression by carbon monoxide via soluble guanylate cyclase activation accounts for modulation of neutrophil migration. **Naunyn-Schmied Arch Pharmacol**, v. 381, p. 483–493, 2010.

23. SPENGLER, R.N.; CHENSUE, S.W.; GIACHERIO, D.A.; BLENK, N.; KUNKEL, S.L. Endogenous norepinephrine regulates tumor necrosis factor- $\alpha$  production from macrophages in vitro. **J Immunol**, v. 152, p. 3024–3031, 1994.

24. CAO, L.; HUDSON, C.A.; LAWRENCE, D.A. Immune Changes during Acute Cold/Restraint Stress-Induced Inhibition of Host Resistance to *Listeria*. **Toxicol Sci**, v. 74, p. 325–334, 2003.

25. AVITSUR, R.; HUNZEKER, J.; SHERIDAN, J.F. Role of early stress in the individual differences in host response to viral infection. **Brain Behav Immun**, v. 20,

p. 339-348, 2006.

26. SHERIDAN, J. F., FENG, N., BONNEAU, R. H., ALLEN, C. M., HUNEYCUTT, B. S., & GLASER, R.. Restraint stress differentially affects anti-viral cellular and humoral immune responses in mice. **Journal of Neuroimmunology**, v. 31, p. 245–255, 1991.

27. SEI, Y.; MCINTYRE, T.; SKOLNICK, P.; ARORA, P.K. Stress modulates calcium mobilization in immune cells. **Life Sci**, v. 49, p. 671–676, 1991.

28. MATSUHISA, F.; KITAMURA, N.; SATOH, E. Effects of acute and chronic psychological stress on platelet aggregation in mice. **Stress**, v. 17, p. 186–192, 2014.

29. MONTGOMERY KC. The relation between fear induced by novel stimulation and exploratory behavior. **J Comp Physiol Psychol**, v. 48, p. 254-260, 1955.

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

31. KORTE, S.M.; De BOER, S.F. A robust animal model of state anxiety: fear-potentiated behaviour in the elevated plus-maze. **Eur j Pharmacol**, v. 28, p. 163-175, 2003.

32. LISBOA, S.F.; OLIVEIRA, P.E.; COSTA, L.C.; VENÂNCIO, E.J.; MOREIRA, E.G. Behavioral evaluation of male and female mice exposed to fluoxetine during pregnancy and lactation. **Pharmacology**, v. 80, p. 49-56, 2008.

33. FREITAS, A.; ALVES-FILHO, J.C.; SECCO, D.D.; NETO, A.F.; FERREIRA, S.H.; BARJA-FIDALGO, C.; CUNHA, F.Q. Heme oxygenase/carbon monoxide-biliverdin pathway down regulates neutrophil rolling, adhesion and migration in acute inflammation. **Br J Pharmacol**, v. 149, p. 345-354, 2006.

34. HARRIGAN, T.J.; ABDULLAEV, I.F.; JOURD'HEUIL, D., MONGIN, A.A. Activation of microglia with zymosan promotes excitatory amino acid release via volume-regulated anion channels: the role of NADPH oxidases. **J. Neurochem**. v. 106, p. 2449– 2462, 2008.

35. GREEN, L.C., WAGNER, D.A., GLOGOWSKI, J., SKIPPER, P., WISHNOK, J.S., TANNENBAUM, S.R., 1982. Analysis of nitrate, nitrite and [15N]nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem**. 126, 131 – 138.

36. WARTHA, F.; BEITER, K.; NORMARK, S.; HENRIQUES-NORMARK, B. Neutrophil extracellular traps: casting the NET over pathogenesis. **Curr Opin Microbiol**. v. 10, p. 52-56, 2007

37. MOCSAI, A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. **J Exp Med**. v. 210, p. 1283–99, 2013.


38. MAYADAS, T.N.; CULLERE, X.; LOWELL, C.A. The multifaceted functions of neutrophils. **Annu Rev Pathol**. v. 9, p.181–218, 2014.

39. DE BOSSCHER, K., VANDEN BERGHE, W.; HAEGEMAN, G. Cross-talk between nuclear receptors and nuclear factor  $\kappa$ B. **Oncogene**. v. 25, p. 6868–6886. 2006.
40. RHEN, T.; CIDLOWSKI, J. A. Antiinflammatory Action of Glucocorticoids — New Mechanisms for Old Drugs. **New England Journal of Medicine**. v. 353, p. 1711–1723. 2005.
41. ELENKOV, I.J.; WILDER, R.L.; CHROUSOS, G.P.; ANDVIZI, E.S. Thesympathetic nerve—an integrative e interface between two super systems:the brain and the immune system. **Rev Pharmacol**, v. 52, p. 595- 538. 2000.
42. LEY, S., WEIGERT, A., BRUNE, B.,. Neuromediators in inflammation – a macrophage/nerve connection. **Immunobiology**. v. 215, p. 674-684. 2010.
43. SANDERS, V.M. The beta2-adrenergic receptor on T and B lymphocytes: do we understand it yet? **Brain Behav. Immun.** v. 26, p.195–200. 2010.
44. THERON, A.J., STEEL, H.C., TINTINGER, G.R., FELDMAN, C., ANDERSON, R. Can the anti-inflammatory activities of beta2-agonists be harnessed in the clinical setting? **Drug Des. Dev. Ther.** v. 7, p. 1387–1398. 2013.
45. LIMA, A. P. N. Efeitos do estresse agudo de contenção sobre a caracterização fenotípica e funcional de células dendríticas em camundongos Balb/c. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental e Comparada) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, **Universidade de São Paulo**, São Paulo, 2014.
46. MATSUHISA, F.; KITAMURA, N.; SATOH, E. Effects of acute and chronic psychological stress on platelet aggregation in mice. **Stress**, v. 17, p. 186–192. 2014.
47. TYMEN, S. D.; ROJAS, I. G.; ZHOU, X.; FANG, Z. J.; ZHAO, Y.; MARUCHA, P. T. Restraint stress alters neutrophil and macrophage phenotypes during wound healing. **Brain, Behavior and Immunity**. v. 28, p. 207–217. 2013.
48. IWAKABE, K.; SHIMADA, M.; OHTA, A.; YAHATA, T.; OHMI, Y.; HABU, S.; AND NISHIMURA, T. The restraint stress drives a shift in Th1/Th2 balance toward Th2-dominant immunity in mice. **Immunol. Lett.** v. 62, p. 39–43. 1998.
49. KOHM, A.P.; SANDERS, V.M. Norepinephrine and beta2-adrenergic receptor stimulation regulate CD4+T and B lymphocyte function in vitro and in vivo. **Rev Pharmacol.** v. 53, p. 487–525. 2001.
50. MARINO, F.; COSENTINO, M. Adrenergic modulation of immune cells: an update. **Amino Acids**. v. 45, p. 55–71. 2013.
51. KENNEY, M.J.; GANTA, C.K. Autonomic nervous system and immune system interactions. **Compr. Physiol.** v. 4, p. 1177–1200. 2014.

52. ZIEZIULEWICZ, T.J.; MONDAL, T.K.; GAO, D.; LAWRENCE, D.A. Stress-induced effects, which inhibit host defenses, alter leukocyte trafficking. **Cell Stress and Chaperones**. v.18, p. 279-291. 2012.
53. SCHWAB CL, FAN R, ZHENG Q, MYERS LP, HEBERT P, PRUETT SB: Modeling and predicting stress-induced immunosuppression in mice using blood parameters. *Toxicol Sci*. v. 83, p. 101–113. 2005
54. HATTORI, H.; SUBRAMANIAN, K. K.; SAKAI, J.; et al. Small-molecule screen identifies reactive oxygen species as key regulators of neutrophil chemotaxis. **Proc Natl Acad Sci**. v. 107, p. 3546–3551. 2010.
55. WITKO, V. S.; RIEU, P.; DESCAMPS, L. B.; LESAVRE, P.; HALBWACHS, M. L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. **Lab. Invest**. v. 80 p. 617–653. 2000.
56. MIZOKAMI, S.S.; HOHMANN, M.S.N.; FERRARI L. S.; CARVALHO T.T.; ZARPELON A.C.; POSSEBON M.I; et al. Pimaradienoic Acid Inhibits Carrageenan Induced Inflammatory Leukocyte Recruitment and Edema in Mice: Inhibition of Oxidative Stress, Nitric Oxide and Cytokine Production. **PLoS ONE**. v. 19, p.11-12 2016.
57. DUSSE, L.M.S., VIEIRA, L.M , CARVALHO, M.G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 343-350, 2003.
58. KOPINCOVÁ, J.; PÚZSEROVÁ, A.; BERNÁTOVÁ, I. Biochemical aspects of nitric oxide synthase feedback regulation by nitric oxide. **Toxicology**; v 4,n.2, p.63–68, 2011.
59. KUBES, P.; SUZUKI, M. & GRANGER, D.N. Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88, p. 4651-4655, 1991.
60. SPIECKER, M.; DARIUS, H.; KABOTH, K. & LIAO, J.K. Differential regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by nitric oxide donors and antioxidants. **J Leukoc Biol**, v. 63, p.732- 739, 1998.
61. AHLUWALIA, A.; FOSTER, P.; SCOTLAND, R.S.; MCLEAN, P.G.; MATHUR, A.; PERRETTI, M.; MONCADA, S. & HOBBS, A.J. Antiinflammatory activity of soluble guanylate cyclase: cGMP- dependent down-regulation of P-selectin expression and leukocyte recruitment. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, p.1386-1391, 2004
62. RIOS-SANTOS, F.; ALVES-FILHO, J.C.; SOUTO, F.O.; SPILLER, F.; FREITAS, A.; LOTUFO, C.M.; SOARES, M.B.; DOS SANTOS, R.R.; TEIXEIRA, M.M.; CUNHA, F.Q. Down-regulation of CXCR2 on neutrophils in severe sepsis is mediated by inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide. **Am J Respir Crit Care Med**, v. 175, p. 490-497, 2007.

## 11. ANEXO

## 11.1. Parecer comissão de ética para uso de animais.



**Universidade  
Estadual de Londrina**

---

**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

**OF. CIRC. CEUA Nº 159/2018** **Londrina, 27 de Setembro de 2018.**


**Prezado (a) professor (a)**

Certificamos que o projeto intitulado: **“Avaliação do efeito do estresse agudo por contenção no recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal na vigência do processo inflamatório induzido por carragenina”** protocolo CEUA nº **14993.2018.74** sob a responsabilidade de **Andressa de Freitas Mendes Dionísio**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em **27/09/2018**.

Este projeto tem por objetivo determinar se durante o estresse agudo por contenção ocorre redução do recrutamento de neutrófilos na vigência do processo inflamatório e, se essa modulação negativa do recrutamento de neutrófilos para o sítio da inflamação é decorrente da ativação de receptores beta-adrenérgicos. Grau de invasividade=3

Finalidade	( ) Ensino ( x ) Pesquisa científica
Vigência da autorização	27/09/2018 a 09/03/2020
Espécie/ linhagem/ raça	Camundongo heterogêneo/ Swiss
Nº de animais	280
Peso/ Idade	20-22g/ 30 dias
Sexo	Macho
Origem	Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina
Amostras a serem coletadas	Sangue, Lavado peritoneal

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.  
Coloco-me à disposição, para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessários. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente.

  
 Profa. Dra. Maria Fernanda Rodrigues Graciano  
 Coordenadora da CEUA/UEL

**Ilmo.(a) Sr.(a)**  
**Prof. (a) Dr (a). Andressa de Freitas Mendes Dionísio**  
 Responsável pelo projeto  
 Departamento de Ciências Fisiológicas/CCB

C/C para o Biotério Central/CCB  
 C/C para a Chefia do Depto de Ciências Fisiológicas /CCB  
 C/C para a Direção de Centro do CCB

---

Campus Universitário: Rodovia Celso Garcia Cid (PR 445), km 380 - Fone (043) 3371-4000 PABX - Fax 3328-4440 - Caixa Postal 10.011 - CEP 86057-970 - Internet <http://www.uel.br>  
 LONDRINA - PARANÁ - BRASIL