



QUANTIFICAÇÃO DAS POPULAÇÕES E SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS ATRAVÉS DE CITOMETRIA DE FLUXO EM INDIVÍDUOS SUBMETIDOS A RELATO ESCRITO DE EMOÇÕES NEGATIVAS.

SOUZA, Artur Bartasson de¹; VANDENBERGHE, Luc Marcel Adhemar²; PFRIMER, Irmtraut Araci Hoffmann³

Palavras-chave: emoções, linfócitos, citometria de fluxo.

1. INTRODUÇÃO

Em 1980 foi proposto o paradigma de Pennebaker, para a investigação experimental dos efeitos de compartilhar as experiências traumáticas. Um grupo de sujeitos recebe a tarefa de escrever ou falar sobre os eventos mais estressantes ou traumáticos da sua vida, enquanto o grupo controle escreve sobre assuntos banais. Geralmente as sessões têm uma duração entre 15 a 30 minutos e são repetidas três, quatro ou cinco vezes em um intervalo de uma semana. Depois de um período de semanas ou meses, as mudanças na saúde são avaliadas e comparadas entre os dois grupos. Muitas vezes a mudança é operacionalizada em termos de frequência de uso de serviços médicos ou ausência no trabalho por motivos de saúde antes e depois das sessões ou em termos de listas de sintomas avaliadas pelo próprio sujeito. PENNEBAKER & BAEL (1986) verificaram que escrever sobre os aspectos emocionais afetou a saúde, enquanto que escrever somente sobre aspectos factuais do episódio traumático não resultou neste efeito. A hipótese de Pennebacker (1989; PENNEBAKER & BAEL, 1986) era que expressar emoções que foram guardadas durante muito tempo, constitui o encerramento de um trabalho ativo e desgastante de inibição, que estava prejudicando a saúde do sujeito. As resenhas são de certa forma uma oportunidade para o participante reorganizar seu relato ou sua interpretação frente ao acontecimento (CAMPBELL & PENNEBAKER, 2003). Variações nas emoções, diante de um evento, mudam a resposta fisiológica em relação a este mesmo evento. Emoções diferenciadas podem ser relacionadas com contextos bioquímicos internos nos quais o sistema imunitário reconhece como relevantes, certos antígenos inofensivos, gerando problemas como alergias. A pessoa ao mudar a maneira na qual responde emocionalmente um trauma, pode mudar estes contextos, assim como certos antígenos não desencadeariam mais as mesmas respostas imunológicas deletérias (BOOTH & PETRIE, 2002). Esta relação entre depressão da imunidade e estresse crônico já foi estabelecido há muito tempo (O'LEARY, 1990). ZECH (1999; 2003) investigou os efeitos específicos da expressão emocional sobre a recuperação emocional do trauma, pedindo aos sujeitos para lembrar um episódio emocional negativo específico que eles tinham vivenciado. Esta recuperação é definida como mudança, na intensidade das emoções evocadas por lembranças ao trauma. Ainda sobre a recuperação, esta era medida como a evolução da intensidade das emoções ou das respostas fisiológicas evocadas pela

lembrança de um evento aversivo. PENNEBAKER (1997) descobriu que as pessoas que melhoraram, eram as que, além de verbalizar sobre emoções intensas, também mostraram uma mudança na interpretação do evento da primeira até a última sessão. Uma evolução na qualidade das resenhas era claramente relacionada com o efeito sobre a saúde. O estresse da vida cotidiana, principalmente nas situações mais exaustivas, tensas e crônicas, pode interferir numa série de elementos imunológicos. Entre essas alterações estão as funções de células T, a atividade de células NK, a resposta de anticorpos, a função dos macrófagos, entre outras, com graves implicações na saúde global da pessoa (BALLONE, 2002).

2. METODOLOGIA

Grupos de estudo

Participaram do presente estudo 12 voluntários entre 20 e 40 anos de ambos os sexos, com o primeiro grau completo, após concordarem em participar assinando termo de consentimento livre e esclarecido. Os candidatos primeiramente passaram por uma sessão de relaxamento por 15 minutos, em seguida foram encaminhados para a coleta de sangue. A seguir foi solicitado aos participantes o preenchimento de um questionário de depressão (BDI) e de ansiedade (STAI). Na entrevista, foram solicitados a evocar durante 5 minutos na imaginação o evento traumático que escolheram relatar durante o experimento. Ao retornarem 30 dias após uma nova coleta de sangue foi realizada.

Quantificação das populações linfocitárias

A avaliação das populações e subpopulações linfocitárias foi realizada por imunofluorescência direta com tripla marcação utilizando-se o anticorpo monoclonal anti-CD3 associado aos marcadores que caracterizam cada fenótipo celular (anti CD4 para linfócito T helper e anti CD8 para linfócito T citolítico). Para as células NK foram utilizados os anticorpos monoclonais anti-CD56/PE e para os linfócitos B anti-CD19/PerCP. Como tubo controle para as marcações acima descritas foi utilizada a associação de IgG1/FITC, IgG1/PE e anti-CD19/PerCP. Os anticorpos IgG/FITC e IgG/PE, foram obtidos do clone X40 e são compostos de cadeia pesada Igy1 e cadeia leve Kappa, de camundongo. Os tubos foram homogeneizados e incubados por 20 minutos e posteriormente foi adicionado em cada tubo 1mL de solução de (FACS lysing solution, Becton Dickison, San Jose, USA), diluída 1/10 em água destilada para efetuar a lise dos eritrócitos. A reação foi incubada por 10 minutos e após esse período os tubos foram centrifugados por 2 minutos (800 x g). O sobrenadante foi desprezado por inversão e o precipitado ressuspense em 1 mL de salina tamponada fosfato (PBS) de uso. Esse procedimento foi repetido por duas vezes. Finalmente, após todo procedimento, foi adicionado a cada tubo 500µL de paraformaldeído a 1%. As incubações foram realizadas a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Para o alinhamento do citômetro de fluxo e análise, foi primeiramente aberto o programa *Cell Quest* e a amostra foi cadastrada. Para aquisição das células, foi criado um citograma em *dot plot* com os parâmetros do tamanho celular – FSC (forward side scatter) e complexidade interna – SSC (side scatter), ambos em escala linear, onde foi delimitada uma região de células de pequeno tamanho e baixa complexidade interna, corresponde à população linfocitária da amostra. Para células NK, foi observado anti-CD3/FITC no eixo das abscissas, e no eixo das ordenadas anti-CD56/PE. O fenótipo NK correspondeu às células com expressão do

antígeno CD56; e os antígenos CD3 e CD19 para o fenótipos LT e LB, respectivamente. A análise descritiva dos diferentes marcadores de voluntários nos dias 0 (controle) e 30 (retorno) foi representada pelas estimativas da média, erro padrão da média. Essas estimativas permitiram a construção de intervalos de confiança 95% (IC 95%) e sua representação gráfica dentro do esquema de “box plot” (Gráfico de caixa).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não foram observadas alterações quantitativas de linfócitos no sangue periférico dos voluntários no dia 0 quando comparado ao dia 30 ($p > 0,05$, teste t de Student). Em decorrência da amostragem se encontrar aquém do previsto e a análise estatística não refletir obrigatoriamente o que poderá ser observado ao final do estudo, com número maior de voluntários. Não foi observada alteração quantitativa de linfócitos do sangue periférico de indivíduos que escreveram sobre eventos traumáticos. Embora ZECH (1999;2003) tenha afirmado que os pacientes relataram uma melhora no seu humor após a realização das sessões, os dados relativos às resenhas no presente projeto ainda não foram analisados. Apesar de BALLONE (2002) relatar alterações imunológicas funcionais, não observamos alterações quantitativas o que não exclui a possibilidade destas células estarem alteradas qualitativamente.

4. CONCLUSÃO

Não foram observadas alterações quantitativas de linfócitos T (CD4+ e CD8+), B e células NK no sangue periférico de voluntários que escreveram sobre eventos traumáticos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ballone G.J. – Estresse – in. PsiqWeb Psiquiatria Geral, Internet, última revisão, 2002
- Booth, R. & Petrie, K. (2002). Emotional expression and Health Changes: Can we identify biological pathways? In: S. Lepore & J. Smyth (Orgs.). *The writing cure: How expressive writing promotes health and emotional well-being.* (pp. 157-176). Washington: American Psychological Association.
- Campbell, R. & Pennebaker, J. (2003). The secret life of pronouns: flexibility in writing style and physical health. *Psychological Science*, 14, 60-65.
- O’Leary, A. (1990). Stress, Emotion, and Human Immune Function. *Psychological Bulletin*, 108, 363-382.
- Pennebaker, J. (1997). *Opening Up: The Healing Power of Expressing Emotion.* New York: Guilford Press.
- Pennebaker, J. (1989). Confession, inhibition, and disease. In: L. Berkowitz (Org). *Advances in experimental social psychology* (XX, pp. 211-244). New York: Academic Press.
- Pennebaker, J. & Bael, S. (1986). Confronting a traumatic event: Toward an understanding of inhibition and disease. *Journal of Abnormal Psychology*, 93, 473-476.

Zech, E. (1999). Is it really helpful to verbalize ones emotions? *Gedrag en Gezondheid*, 27, 42-47.

Zech, E. (2003). *La verbalisation des expériences émotionnelles: effets sur la récupération émotionnelle et les bénéfices perçus*. In J. Colletta & A. Tcherkassof (Orgs). *Les émotions. Cognition, langage et développement* (pp. 85-90). Liège: Mardaga.

¹ Bolsista de iniciação científica. Graduando em Biomedicina da Universidade Católica de Goiás – PiBic-CNPq - , artbart@bol.com.br

² Co-orientador/CEPSI/UCG, bergneve@terra.com.br.

³ Orientador/Laboratório de Imunologia do Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde/UCG, pfrimer@brturbo.com.br