

DANIELLE ABREU FOSCHETTI

**AFINIDADES  
IMUNOLÓGICAS ENTRE O  
ENVELHECIMENTO E O  
ESTRESSE CRÔNICO**

Orientadora: Dra. Ana Maria Caetano de Faria  
Co-orientadora: Dra. Débora D`Ávila Reis

Belo Horizonte  
2007

DANIELLE ABREU FOSCHETTI

**AFINIDADES  
IMUNOLÓGICAS ENTRE O  
ENVELHECIMENTO E O  
ESTRESSE CRÔNICO**

Dissertação apresentada ao Departamento  
de Bioquímica e Imunologia,  
do Instituto de Ciências Biológicas  
da Universidade Federal de Minas Gerais  
como requisito para obtenção ao  
título de mestre em Ciências

Orientadora: Prof. Ana Maria Caetano de Faria  
Co-orientadora: Prof. Débora D`Ávila Reis

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas

Belo Horizonte  
2007

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Imunobiologia  
do Departamento de Bioquímica e Imunologia  
do Instituto de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Minas Gerais

Apoio Financeiro: Conselho Nacional de Desenvolvimento  
Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à  
Pesquisa de Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)

“Você caiu do céu  
um anjo lindo que apareceu com olhos de cristal  
me enfeitiçou, eu nunca vi nada igual  
De repente, você surgiu na minha frente  
Luz tão brilhante, estrela em forma de gente”

Ao Leo, por tudo

“Eu tenho tanto para lhes falar  
Mas com palavras não sei dizer  
Como é grande o meu amor por vocês  
Nem mesmo o céu, nem as estrelas  
Nem mesmo o mar e o infinito  
Não é maior que o meu amor  
Nem mais bonito”

À minha família, o bem mais precioso da minha vida

Por ter aberto as portas da ciência em minha vida,  
por me estimular a crescer e sempre ver além  
Acima de tudo humana e amiga em todos os momentos.  
Somente agradecer não seria o bastante,  
mas saiba que possui todo meu carinho e admiração

À Ana, simplesmente obrigada por tudo

Um dia você escreveu:  
“Eu queria trazer-te uns versos muito lindos  
Colhido no mais íntimo de mim...  
Trago-te palavras, apenas... e que estão escritas  
Do lado de fora do papel... Não sei, eu nunca soube  
O que dizer-te...”  
Hoje, esses versos traduzem exatamente  
o que eu sinto e gostaria de dedicá-lo à você.  
Eu nunca imaginei que eu teria o prazer de ser  
orientada por uma grande amiga.  
Queria poder expressar toda admiração,  
carinho e o eterno agradecimento que tenho  
guardado no meu coração.

À Elaine, uma pessoa muito especial

## AGRADECIMENTOS

À prof. Ana Maria Caetano de Faria, ou simplesmente Ana, por todo carinho, dedicação, aprendizado e confiança em mim depositada ao longo desses anos.

À prof. Débora D'Ávila Reis, por todas as suas contribuições para esse trabalho. Além de co-orientadora, uma amiga.

À prof. Elaine Speziali da Univale, pessoa chatonilda, que contribuiu muito para o meu crescimento e para o desenvolvimento desse trabalho. Um muito obrigado não é o bastante.

Aos professores Nelson, Claudinha e Tomaz que sempre enriqueceram meu aprendizado.

À Tiza e Andréa Teixeira do Centro de Pesquisa René Rachou, pelas contribuições nos experimentos de citometria de fluxo.

À Celise pela disposição e boa vontade em ajudar sempre.

À todos os amigos do Laboratório de Imunobiologia pela ótima convivência cotidiana e pelo aprendizado constante.

À Ildinha, minha segunda mãe, pelo auxílio e cuidado com os animais no biotério e com os materiais do laboratório

À Frank, aluna de mestrado e técnica do laboratório, pela amizade, competência, pela imensa ajuda e boa vontade sempre.

À amiga Raphaela, pessoa doce, nobre e competente. Pela ajuda prestada em todos os momentos, compartilhando alegrias e tristezas. Por sempre estar ao meu lado. Obrigada por tudo.

À Erica Leandro, um anjo que me ajudou num dos momentos decisivos desse trabalho.

Aos amigos de outros laboratórios pela amizade e pela ajuda em diversos momentos.

À eterna amiga Magda, que hoje deixa muitas saudades...

À Leia, pessoa mágica, iluminada.

À amiga Luciana, ainda fico admirada com são as coisas nessa vida...

À amiga Carol, que participou do começo de tudo isso.

À minha mãe, meu pai, meus irmãos, tios, tias, primos, primas, avô e avós, por todo apoio e carinho sempre. Sou apaixonada por vocês!

Ao Leo, que nunca poupou esforços para me fazer feliz.

À família Baeta Guerra, minha segunda família, por sempre me tratarem com imenso carinho e por terem me adotado como filha.

À Phoebe, minha gatinha, minha filhotinha.

Aos amigos Abel, Aline, Clemir, Clélio, Cleide, Dione, Flavinha, Isabel, Marcos Vinícios, Marcos Paulo, Wellington, Maria, Verônica, Paulo, Paulinha, Raquel pelo apoio constante, que dividiram comigo minhas alegrias e minhas aflições.

À todos que de alguma forma contribuiu para a realização desse trabalho, muito obrigada!

E acima de tudo à Deus, que me guiou e me iluminou durante toda essa caminhada.

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	XII
LISTA DE FIGURAS .....	XIII
LISTA DE ABREVIACOES.....	XV
RESUMO.....	XVII
ABSTRACT.....	XIX
1. INTRODUÇÃO .....	20
1.1 - A Senescência .....	21
1.2 - Efeitos do envelhecimento e do estresse no timo .....	27
1.3 - Definição do estresse.....	30
1.4 - O efeito da ativação do eixo HPA no organismo durante o estresse .....	34
1.5 - Interações neuroimunoendcrinas .....	38
2. OBJETIVOS .....	46
2.1 - Objetivos Gerais .....	47
2.2 - Objetivos específicos: .....	47
3. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL .....	48
3.1 - Animais .....	49
3.2 - Indução de estresse de contenção .....	49
3.3 - Obtenção dos soros .....	50
3.4 - Extração do muco intestinal .....	50
3.5 - Análise do peso e celularidade do Timo .....	50
3.6 - Análise Histológica .....	51
3.7 - Avaliação dos níveis séricos de cortisol e DHEA .....	51
3.7.1 - <i>Active Cortisol (Saliva) EIA</i> .....	51
3.7.2 - <i>Active DHEA (Saliva) EIA</i> .....	52
3.8 - Contagem total e diferencial de leucócitos.....	53
3.9 - Medida de Imunoglobulinas séricas por ELISA.....	53
3.10 - Medida de IgA secretria total por ELISA.....	54
3.11 - Medida de IgE sérica por ELISA.....	55
3.12 - Preparaao de suspenso das células linfóides .....	55
3.12.1 - <i>Meio de cultura</i> .....	55

3.12.2 - Preparação de suspensões celulares.....	55
3.12.3 - Contagem das células viáveis .....	56
3.14 - Cultura de células e coleta do sobrenadante da cultura.....	56
3.15 - Medida de citocinas do sobrenadantes da cultura celular por ELISA .....	57
3.16 - Adrenalectomia .....	57
3.17 - Marcação (ou análise?) fenotípica das células por citometria de fluxo .....	58
3.17.1 - Marcação fenotípica dos leucócitos periféricos do sangue .....	58
3.17.2 - Marcação fenotípica dos leucócitos de órgãos linfóides .....	58
3.17.3 - Tipos de marcadores fenotípicos celulares .....	59
3.18 - Obtenção dos dados no citômetro de fluxo e análise dos resultados .....	59
3.18.1 - Estratégia de análise .....	59
3.19 - Análise estatística.....	60
3.20 - Soluções utilizadas .....	61
3.20.1 - Soluções usadas no teste de ELISA .....	61
3.20.3 -Soluções usadas na histologia .....	62
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>64</b>
4.1 - As alterações causadas no organismo pelo estresse crônico de contenção .....	65
4.2 - Níveis plasmáticos de cortisol e DHEA nos animais submetidos ao estresse crônico .....	65
4.3 - Contagem global e diferencial de leucócitos periféricos do sangue nos animais submetidos ao estresse crônico .....	66
4.4 - Os efeitos do envelhecimento e do estresse crônico no timo .....	68
4.5 - Medida de imunoglobulinas séricas totais, das classes IgM, IgG, IgA e IgE, e de IgA secretória em animais jovens normais ou submetidos ao estresse crônico de contenção e em animais idosos.....	72
4.6 - Produção de citocinas por células linfóides do baço em animais jovens normais ou submetidos ao estresse crônico de contenção e animais idosos.....	73
4.7 - Avaliação dos níveis plasmáticos de IL-6.....	78
4.8 - Característica do perfil fenotípico de linfócitos em animais jovens normais ou submetidos ao estresse crônico de contenção e idosos .....	78
4.9 - Análise histológica do intestino em animais jovens normais ou submetidos ao estresse crônico de contenção e idosos .....	89
4.10 - Resumo dos Resultados.....	91

5. DISCUSSÃO .....	93
6. CONCLUSÕES.....	119
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	121
ANEXO .....	141
Anexo A – Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética.....	142

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados comparativos dos níveis de imunoglobulinas entre animais jovens submetidos ao estresse crônico e idosos. SD = sem diferenças em relação aos animais controles. ....	91
Tabela 2: Resultados comparativos da produção de citocinas de células do baço quando estimuladas e do plasma entre animais jovens submetidos ao estresse crônico e idosos. SD = sem diferenças em relação aos animais controles.....	91
Tabela 3: Resultados comparativos da expressão geral de marcadores fenotípicos em linfócitos T do sangue, baço e LnM entre animais jovens submetidos ao estresse crônico e idosos. SD = sem diferenças em relação aos animais controles. ....	91
Tabela 4: Resultados comparativos da expressão geral de marcadores fenotípicos em linfócitos T do sangue, baço e LnM entre animais jovens submetidos ao estresse crônico e idosos. SD = sem diferenças em relação aos animais controles. ....	92

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Análise de leucócitos do sangue periférico por citometria de fluxo. ....	60
Figura 2: Medida de cortisol plasmático em camundongos BALB/c jovens, submetidos ao estresse crônico e em camundongos idosos. ....	65
Figura 3: Medida de DHEA plasmático em camundongos BALB/c jovens, submetidos ao estresse crônico e em camundongos idosos. ....	66
Figura 4: Contagem de leucócitos periféricos do sangue dos camundongos BALB/c controle, estressados e em camundongos idosos. ....	67
Figura 5: Porcentagem de leucócitos periféricos do sangue em camundongos BALB/c controle, submetidos as estresse crônico e em camundongos idosos. ....	68
Figura 6: Avaliação do peso do timo em animais jovens controles, submetidos ao estresse crônico e idosos. ....	69
Figura 7: Avaliação da celularidade do timo em animais jovens controles, submetidos ao estresse crônico e idosos. ....	69
Figura 8: Histologia do timo de animais jovens. controles, submetidos ao estresse crônico e idosos. ....	71
Figura 9: Níveis de imunoglobulinas séricas totais (Ig total) e das classes IgM, IgG, IgA e IgE. ....	72
Figura 10: Níveis de IgA secretória presente no muco intestinal. ....	73
Figura 11: Produção de IL-2 por células do baço medidas no sobrenadante da cultura de esplenócitos. ....	74
Figura 12: Produção de IFN- $\gamma$ por células do baço medidas no sobrenadante da cultura de esplenócitos. ....	74
Figura 13: Produção de TNF- $\alpha$ por células do baço medidas no sobrenadante da cultura de esplenócitos. ....	75
Figura 14: Produção de IL-6 por células do baço dosadas no sobrenadante da cultura de esplenócitos. ....	76
Figura 15: Produção de IL-4 por células do baço dosadas no sobrenadante da cultura de esplenócitos. ....	77
Figura 16: Produção de IL-10 por células do baço dosadas no sobrenadante da cultura de esplenócitos. ....	77

Figura 17: Medida de IL-6 plasmática dos animais jovens controles, submetidos ao estresse crônico e idosos. ....	78
Figura 18: Característica fenotípica de linfócitos T CD4+ do baço. ....	81
Figura 19: Característica fenotípica de linfócitos T CD8+ do baço. ....	82
Figura 20: Característica fenotípica de linfócitos B CD19+ do baço. ....	83
Figura 21: Característica fenotípica de linfócitos T CD4+ do LnM. ....	84
Figura 22: Característica fenotípica de linfócitos T CD8+ do LnM. ....	85
Figura 23: Característica fenotípica de linfócitos B CD19+ do LnM. ....	86
Figura 24: Característica fenotípica de linfócitos T CD4+ do sangue. ....	87
Figura 25: Característica fenotípica de linfócitos T CD8+ do sangue. ....	88
Figura 26: Característica fenotípica de linfócitos B CD19+ do sangue. ....	89
Figura 27 – Análise histológica do intestino delgado dos camundongos jovens normais ou submetidos ao estresse crônico de contenção e idosos. ....	90

## LISTA DE ABREVIACOES

µg	Micrograma
µL	Microlitros
µm	Micrmetros
mL	mililitros
mg	miligramas
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
APCs	Células apresentadora de antígeno
AVP	Hormônio arginina-vasopressina
BCR	Receptor de células B
CD	Grupo de diferenciação ( <i>cluster of differentiation</i> )
Con A	Concanavalina A
CRH	Hormônio de liberação de corticotrofina
DCs	Célula dendrítica
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DHEA-S	Dehidroepiandrosterona-sulfato
DNA	Acido desoxirribonucleico
EDTA	cido etileno diamino tetraacético
ELISA	Ensaio imuno adsorvente ligado à enzima
FITC	Isocianato de fluoresceína
GALT	Tecido linfóide associado ao intestino
GH	Hormônio do crescimento
GR	Receptor de glicocorticóide
H&E	Hematoxilina e eosina
HPA	Hipotálamo-pituitária-adrenal
HRP	Antígeno <i>horseradish peroxidase</i>
HSP	Proteínas de choque térmico ( <i>heat shock proteins</i> )
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulinas
IL	Interleucina
LE	<i>Locus ceruleus</i>

LnM	Linfonodo Mesentérico
LPS	Lipopolissacarídeo
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
MR	Receptor de mineralocorticóide
NE	Noradrenalina
NK	Células matadoras naturais ( <i>natural killer</i> )
NO	Oxido nítrico
nm	Nanômetros
°C	Grau centígrado
OPD	Ortofenileno-diamino
PBMC	Células mononucleares periféricas do sangue
PBS	Salina tamponada com fosfato
PE	Ficoeritrina
PNI	Psiconeuroimunologia
RPM	Rotações por minuto
SCF	Fator de células-tronco ( <i>stem cell factor</i> )
SNA	Sistema nervoso autônomo
SNC	Sistema nervoso central
SNE	Sistema nervoso entérico
SNS	Sistema nervoso simpático
TGF	Fator de transformação e crescimento
TCR	Receptor de células T
Th	Linfócito auxiliar ( <i>T helper</i> )
Th1	Resposta celular do tipo 1
Th2	Resposta celular do tipo 2
TNF	Fator de necrose tumoral
VIP	Peptídio vasoativo intestinal

## RESUMO

Os processos de estresse e envelhecimento têm sido associados, em humanos e em uma variedade de espécies animais, a várias alterações funcionais do sistema imune. Tais modificações podem ser observadas tanto em órgãos linfóides quanto nos componentes celulares do sistema imunológico. O estresse pode ser definido como o nível alterado da homeostase para o qual o organismo encontra problemas de ajuste. Geralmente consideramos o envelhecimento como um processo que se inicia em fases muito tardias da vida, mas as alterações biológicas e principalmente as imunológicas são um fenômeno gradual e constante durante todos os períodos do desenvolvimento desde o nascimento. A senescência é apenas uma fase final onde essas mudanças gradativas se acumulam e se acentuam. Ambos os processos resultam em uma variedade de alterações biológicas em que elementos do sistema imune, mediadores neurológicos e hormonais apresentam grande importância. Neste trabalho, nós comparamos as mudanças que ocorrem ao longo do processo de envelhecimento e aquelas desencadeadas pelo estresse crônico de contenção. Camundongos machos BALB/c de 8 semanas de idade foram submetidos ao estresse físico de contenção por 2 horas, por 5 dias consecutivos. Vinte e quatro horas após a última sessão de estresse, os animais foram sacrificados. Nós também analisamos camundongos machos BALB/c de 52 semanas de idade comparado ao controle de 8 semanas de idade. Os animais estressados apresentaram diarreia, queda de pêlo, aumento do número de neutrófilos mas redução dos linfócitos periféricos do sangue e um aumento dos níveis plasmáticos de cortisol de dehidroepiandrosterona (DHEA). Em camundongos BALB/c senescentes de 52 semanas de idade, a produção de imunoglobulinas séricas (Ig total, IgM, IgG, IgA e IgE) e de IL-4 pelos esplenócitos aumentam. Interessantemente, ambos animais estressados e idosos apresentaram uma redução drástica do peso tímico e da sua celularidade (aproximadamente 82% e 50% na região cortical), alterações em alguns isotipos de imunoglobulinas (como aumento de IgE sérica) e altos níveis de IgA secretória (sIgA) no intestino. A produção de IL-2, IL-6 e IFN-gama pelos esplenócitos estimulados in vitro com concanavalina A (Con A) ou com anticorpos monoclonais anti-CD3/anti-CD28, e a IL-6 plasmática também estava elevada em ambos. Entretanto, o perfil fenotípico de linfócitos T e B do baço, do sangue e do linfonodo mesentérico (LnM) são opostos, com predomínio de um perfil de células virgens nos animais

estressados, e de memória/ativação, no envelhecimento. Nossos resultados sugerem que o estresse crônico resulta em várias alterações que são observadas nos animais idosos.

## ABSTRACT

The aging and stress processes have been associated with alterations in the activities of the immune system. These modifications can be observed in lymphoid organs as well as in cellular components of the immune system. Stress is defined as any alteration in the functional and homeostatic stimulation of the organism. Usually, aging is considered as a process that starts in long periods of life, but the biological, and most important, immunological alterations are gradual and constant phenomena during all periods of development since birth. On the other hand, senescence is a final step in the gradual process of aging when biological changes are accumulated and accentuated. Both processes result in a variety of biological alterations among which hormones, neurological mediators and immunological elements play an important role. Herein, we compare the changes brought about by senescence and by chronic restraint stress. Eight-week-old BALB/c male mice were submitted to stress by physical contention for 2 hours for 5 consecutive days. Twenty-four hours after the last stress session, mice were sacrificed. We also analysed 52-week-old BALB/c male mice as compared to control 8-week-old mice. Stressed animals had diarrhea, hair loss, increase in the neutrophil numbers but reduction in lymphocytes in periférico blood and an augment of cortisol and dehidroepiandrosterona (DHEA) in plasma levels. In 52-week-old senescent BALB/c mice, production of serum immunoglobulins (total Ig, IgM, IgG, IgA and IgE) and IL-4 from splenocytes increases. Interestingly, both stressed and old animals showed drastic reduction of thymic weight and thymic celularity (approximately 82% and 50% in the cortical region), alterations of some serum immunoglobulin isotypes (such as increase of serum IgE) and high levels of secretory IgA (sIgA) in gut. Production of IL-2, IL-6 and IFN-gamma by spleen cells stimulated in vitro with Concanavalina A (Con A) or with monoclonal antibodies anti-CD3/anti-CD28, and plasmatic IL-6 were also increased in both. However, in stressed mice, the phenotypic profile of T and B cells in blood, spleen and mesenteric lymph node were naïve while in aging there were a prevalence of memory/activated cells profile. Our results suggest that chronic stress result in immunological and morphological alterations that are similar to the ones observed in aged animals.

## **1. INTRODUÇÃO**

Levantamentos estatísticos do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística em 2005 mostraram que a expectativa de vida humana aumentou consideravelmente nas últimas décadas. Estima-se que a população de indivíduos acima dos 80 anos de idade, que hoje é de aproximadamente 1 (um) milhão, aumente 5 vezes até o ano de 2050, sendo que em mulheres esse valor pode ser 9 vezes maior. (IBGE, 2005). Podemos relacionar esse aumento a vários fatores, como melhoria dos sistemas de saúde e sanitário, grande desenvolvimento da medicina, maior acesso à informação, dentre outros. No entanto, esse crescimento nem sempre está vinculado a uma melhoria da qualidade de vida da população. Sabemos que o ritmo da vida moderna está cada vez mais acelerado e essa aceleração se associa, na maioria das vezes, a um estado constante de estresse e a doenças claramente psiquiátricas como a ansiedade e a depressão assim como a síndromes psicossomáticas (Lauc *et al*, 1998; Mello *et al*, 2003; Reiche *et al*, 2004). Está bem documentada na literatura também a influência do estresse em doenças crônicas e degenerativas como as alergias e as doenças autoimunes em geral. Assim, dois processos distintos, porém sobrepostos, estão presentes como componentes da vida moderna: o aumento da expectativa de vida e o aumento dos fatores de estresse causadores de distúrbios clínicos importantes.

Vários autores afirmam que, em humanos, muitas das alterações observadas no envelhecimento são semelhantes às vistas durante o estresse. Ambos os processos têm sido associados a várias alterações funcionais do sistema imune. Diversas modificações ocorridas durante o envelhecimento, como involução tímica, redução de células T virgens e baixa capacidade proliferativa das células T em humanos, são similares aos efeitos encontrados durante o estresse crônico. Alguns pesquisadores acreditam que a senescência pode ser considerada até mesmo como um tipo de estresse crônico (Bauer, 2005). Por causa disso, nosso objetivo, nesse trabalho, será estudar, com maiores detalhes, os efeitos decorrentes de ambos os processos utilizando um modelo experimental murino.

### ***1.1 - A Senescência e a imuno-senescência***

Geralmente consideramos o envelhecimento como um processo que se inicia em fases muito tardias da vida, mas as alterações biológicas e principalmente as

imunológicas são um fenômeno gradual e constante durante todos os períodos do desenvolvimento desde o nascimento. A senescência é apenas uma fase final onde essas mudanças gradativas se acumulam e se acentuam (Malaguarnera *et al*, 2000, revisado por Bauer, 2005).

A imunosenescência tem sido bem descrita em humanos e em várias espécies animais sendo acompanhada de muitas alterações funcionais no sistema imune. Tais modificações podem ser encontradas tanto em órgãos linfóides quanto nos componentes celulares do sistema imune (Takeoka, 1996).

O termo imunosenescência se refere a um declínio da atividade do sistema imune, encontrada durante o envelhecimento, que se acredita poder ser responsável pelo aumento da susceptibilidade a doenças infecciosas, câncer e doenças autoimunes (Solana & Pawelec, 1998).

Segundo Pierpaoli (1998), o envelhecimento é causado por um desarranjo nos mecanismos de regulação do sistema central de sincronia e adaptação neuroendócrina e imunológica, denominado complexo pineal. A glândula pineal está relacionada à regulação do ciclo circadiano, secreção de melatonina, funções hormonais e imunidade (Pierpaoli, 1998). Esta glândula é controlada pela quantidade de luz, sendo que a presença da mesma é capaz de ativá-la levando à secreção de melatonina. Essa última afeta a secreção de hormônios gonadotróficos pela hipófise anterior (Guyton & Hall, 1996). Receptores de melatonina são encontrados em várias células e tecidos, inclusive do sistema neuroimune-endócrino. Durante a senescência, há um decréscimo das atividades da glândula pineal. (Pierpaoli, 1998).

A senescência está associada também a alterações nas atividades globais do sistema imune, tanto no sistema imune inato quanto no adaptativo. Em relação ao sistema imune inato, há uma perda da capacidade fagocítica, principalmente em neutrófilos; um decréscimo na geração de radicais óxidos e da explosão respiratória, embora ocorra um aumento na produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF (Straub, 2000).

Alguns trabalhos mostram que o sistema imune inato pode estar muito bem preservado nos chamados velhos saudáveis. Recentemente, novos estudos têm focado sua atenção em indivíduos centenários, comprovando que o envelhecimento não está necessariamente associado a uma deterioração do sistema imune e várias atividades imunológicas são substituídas por mecanismos compensatórios. Um exemplo disso são as células NK que estão bem preservadas em indivíduos idosos saudáveis, sendo

possível observar um aumento do seu número e da sua atividade citotóxica com o avançar da idade (Franceschi *et al*, 1995; Comin *et al*, 2007).

As mudanças que ocorrem no sistema imune adaptativo incluem um decréscimo na proliferação de células T e B, principalmente pela grande diminuição de produção de IL-2 e seu receptor – IL-2R; diminuição das células virgens ou *virgens*, aumento das células de memória e uma mudança no perfil de secreção de citocinas do tipo Th1 para o tipo Th2 (Straub, 2000; Bauer, 2005). A citocina IL-2 possui grande importância na proliferação de linfócitos, pois ela é considerada um fator de crescimento para linfócitos T estimulados por antígenos e é responsável pela expansão clonal das células T após o reconhecimento antigênico (Abbas & Lichman, 2005). Esses fenômenos também são vistos durante o estresse crônico (Bauer, 2005).

A redução na produção de IL-2 no envelhecimento é vista principalmente em células virgens enquanto que em células de memória permanece inalterado. A literatura mostra que administração de vitamina E é capaz de elevar a proliferação celular e a produção de IL-2 pelas células virgens, mas não pelas células de memória. Assim, a vitamina E se caracteriza pela capacidade de ativação de células virgens em idosos (Adolfsson, 2001).

Ao contrário da IL-2, a produção das citocinas IL-4, TGF- $\beta$  e IFN- $\gamma$  está aumentada em idosos, mas não foram encontradas diferenças na produção de IL-10 nesse mesmo período da vida quando comparado com aquela observada com jovens (Forsey *et al*, 2003; Born *et al*, 1995; Thoman, 1997). A influência do envelhecimento na secreção de IL-10 não é, no entanto, um consenso e outros trabalhos indicam que ocorre um aumento na produção de IL-10 em macrófagos durante a senescência (Pawelec, 2000).

As células apresentadoras de antígenos (APCs) apresentam baixa expressão de moléculas de MHC (complexo de histocompatibilidade principal) de classe II, diminuição da capacidade de tráfego e processamento de imuno-complexos (Straub, 2000; Herrero *et al*, 2002).

Foi demonstrado também que o envelhecimento está associado a alterações significativas nas células T periféricas. Foi observada uma diminuição da proporção de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, mas não de células T CD8<sup>+</sup>, quando comparados com animais controle (Collaziol *et al*, 2004).

Existem relatos na literatura mostrando que o envelhecimento está relacionado a alterações nos fenótipos e frequência dos tipos de linfócitos do sistema imune. Tais

alterações podem incluir mudanças nos marcadores de membrana como o receptor de adesão (CD44), receptores ligados à migração de linfócitos para linfonodos periféricos (CD62L e CD45RB), e moléculas co-estimulatórias (CD28) responsáveis pelos fenótipos de memória ou virgem de linfócitos T.

Em idosos, ocorre um aumento da expressão de marcadores de células ativadas e de memória. Segundo Solana & Pawelec (1998), durante o envelhecimento, em humanos, há uma redução da expressão de moléculas que caracterizam um fenótipo de células *virgens* na superfície de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (caracterizados pela expressão de CD28<sup>hi</sup>, CD62L<sup>hi</sup>, CD45RB<sup>hi</sup> e CD44<sup>lo</sup>). Por outro lado, a frequência de células ativadas seria bem maior (caracterizada pela expressão de CD28<sup>lo</sup>, CD62L<sup>lo</sup>, CD45RB<sup>lo</sup> e CD44<sup>hi</sup>) (Thoman, 1997; Solana & Pawelec, 1998).

Uma das alterações no sistema imune associadas ao envelhecimento é a diferença no padrão de síntese de citocinas pelos linfócitos de animais idosos, uma vez que as células T virgens secretam um perfil de citocinas diferente das células T ativadas. Segundo Engwerda, Fox e Handwerger (1996), o aumento da produção de IFN- $\gamma$  e o decréscimo da produção de IL-2 são detectados apenas nos linfócitos T do baço de animais idosos, quando comparados com animais controles (Engwerda, Fox & Handwerger, 1996).

Os mecanismos fisiológicos que regulam a proporção de células virgens ou de memória na periferia são desconhecidos. Recentemente foi proposto que o acúmulo de células de memória se deve a um aumento da expressão de CD95 em células virgens, aumentando sua sensibilidade a apoptose (Collaziol *et al*, 2004). A explicação mais aceita, no entanto, propõe que o decréscimo do número de linfócitos virgens é um resultado direto da redução da produção de novos linfócitos no timo (Linton & Dorshkind, 2004). Embora o timo continue funcionalmente competente em idosos, o percentual de exportação é insuficiente para repor as células T virgens perdidas diariamente na periferia. O número de timócitos emigrantes decai e a proliferação homeostática das células residentes é requerida para manter o *pool* celular. Como conseqüência disso, ocorre um aumento progressivo do número de células de memória, apresentando, porém, uma diversidade restrita e uma tendência, então, à oligoclonalidade. Com o tempo, essas mudanças se tornam mais pronunciadas e estão fortemente associadas com o aumento da incidência de doenças autoimunes, diminuição da capacidade de resposta frente a novos antígenos e até mesmo redução da expectativa de vida (Berzins *et al*, 2002).

No caso dos linfócitos B, a diminuição de células B progenitoras da medula óssea tem também um efeito direto sobre o *pool* periférico de células B virgens. Como o número total de linfócitos T e B na periferia não se altera, esse número é mantido, ao longo da vida, pela proliferação chamada de homeostática dos linfócitos ativados. Assim, a redução na produção desses dois tipos de linfócitos, leva não só ao acúmulo de linfócitos de memória como também à geração de um repertório oligoclonal (revisado por Weng, 2006).

O sistema imune adaptativo depende da habilidade dos linfócitos em se dividirem em resposta a um desafio antigênico. O tamanho do telômero pode agir como um fator limitante desse processo. Pelo fato do mesmo ser essencial para a manutenção da integridade cromossômica, células com encurtamento dos telômeros podem cessar a divisão celular e entrar em apoptose. A redução dos telômeros em linfócitos foi primeiramente demonstrada durante a diferenciação de células T CD4+ e CD8+ virgens para células de memória sendo que essas últimas apresentam telômeros mais curtos que as primeiras. Dessa forma, o tamanho do telômero não só controla a atividade replicativa celular, como é um marcador do declínio da função das células T associadas ao envelhecimento (Weng, 2006).

Uma consequência direta do decréscimo de linfócitos T virgens no envelhecimento é a diminuição da diversidade do repertório antígeno-específico. Analisando a cadeia V $\beta$  do TCR em células T humanas, constatou uma redução desse repertório de  $10^8$  em indivíduos adultos para  $10^6$  em idosos (Weng, 2006).

A senescência também é caracterizada por disfunções na imunidade humoral, com a redução, em animais experimentais e humanos idosos, da produção de anticorpos específicos para antígenos externos (Bauer, 2005). O sistema imune do idoso produz anticorpos de baixa afinidade, diminuindo a proteção contra infecções e autoreatividade. Foi descrito também que o número e a atividade de células B permanece intacta no envelhecimento, mas há alterações na geração das mesmas. Estas mudanças incluem um defeito dos genes V e uma diminuição do desenvolvimento de subtipos de células B, através de uma diminuição dos precursores pró-B e pré-B (Klinman & Kline, 1997). A capacidade de auto-renovação parece ser suficiente para garantir o número de células B na periferia. Uma consequência direta desses dois fatos é que a produção constante e estável de células B e de imunoglobulinas é mantida, nos indivíduos e animais idosos, por linfócitos B ativados de memória. Aparentemente, as imunoglobulinas produzidas por células B de memória apresentam diferentes tipos de genes V mas o mecanismo de

hipermutação somática nesses linfócitos é ineficiente (Song, 1997). Devido a essas modificações, pode-se observar uma mudança no repertório de células B, com diminuição de células B virgens, e conseqüente comprometimento da diversidade (Weksler & Szabo, 2000).

As alterações no sistema imune associadas ao envelhecimento também podem ser observadas nos tecidos linfóides associados à mucosa. Existem relatos mostrando que o padrão de imunoglobulinas da classe IgA presente no intestino está alterado durante o envelhecimento. Os níveis de IgA no muco intestinal e no soro de animais idosos está aumentado em relação aos animais jovens embora o nível de imunoglobulinas do isotipo IgM se encontre inalterado durante o processo de envelhecimento (Senda, 1988). Outro estudo afirma que a produção de IgA pelos plasmócitos se mantém inalterado nessa fase da vida, mas a migração destas células para sítios efetores no intestino pode estar comprometida (Schmuker, 2001).

Em relação a mudanças no sistema endócrino durante o envelhecimento, pode-se observar uma diminuição na concentração dos hormônios Dehidroepiandrosterona (DHEA), sua estrutura sulfatada (DHEA-S), estradiol, progesterona e testosterona tanto na adrenal quanto nas gônadas. Esse decréscimo é acompanhado por um aumento de alguns hormônios hipofisários como o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Da mesma maneira, hormônios como a prolactina e o hormônio do crescimento (GH) também estão diminuídos (Straub, 2000; Bauer, 2005). A redução na secreção de DHEA está morfológicamente relacionada a uma atrofia da zona reticular da glândula adrenal (Bauer, 2005). Esse hormônio e sua forma sulfatada apresentam propriedades imunomodulatórias, incluindo aumento da produção de IL-2, diminuição de IL-6 e TNF- $\alpha$ , inibição na diferenciação de células NK e da proliferação de linfócitos (Daynes, 2006; Bauer, 2005). Uma diminuição de testosterona, estrógenos e DHEA pode levar a um aumento das citocinas IL-6, IL-10 e TNF. Um declínio na produção de DHEA está diretamente relacionado com o elevado índice de IL-6 e IL-10 (Straub, 2000, Daynes1996).

Relatos na literatura indicam que uma redução dos hormônios GH e prolactina pode prolongar o tempo de vida dos indivíduos. Camundongos *dwarf* (anões), geneticamente deficientes em ambos os hormônios, são capazes de viver até quatro anos sendo que camundongos normais vivem, no máximo, 2 anos. A hiper-expressão de GH em camundongos está associada a um envelhecimento prematuro. Os possíveis

mecanismos de ação desse hormônio na senescência incluem efeitos no metabolismo, nos recursos energéticos e na maturação sexual (Brown-Borg, 1996).

Existem evidências mostrando que o envelhecimento, assim como o estresse, está associado à ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), resultando num aumento de ACTH e cortisol, como também de catecolaminas através da ativação do sistema nervoso simpático (SNS), capaz de modular a resposta imune. Dessa maneira, é cada vez mais difícil dissociar mudanças neuroendócrinas, observadas na senescência, com aquelas produzidas por um estímulo psicológico (Bauer, 2005). Ainda de acordo com Bauer (2005), parece razoável especular que o aumento da secreção de cortisol e da redução de DHEA pode contribuir com as alterações imunológicas observadas durante o envelhecimento, que são idênticas às encontradas durante o estresse crônico (Bauer, 2005).

Apesar de todas essas mudanças, uma questão ainda permanece: se essas modificações têm alguma relação com a sobrevivência do indivíduo. Recentes estudos sugerem que a combinação do status imunológico, incluindo alta proliferação de células T, aumento do número de linfócitos B, de linfócitos CD4<sup>+</sup> e células CD16<sup>+</sup> (células NK) podem aumentar as chances de sobrevivência em até 2 anos a mais, em humanos idosos (Straub, 2000).

## ***1.2 - Efeitos do envelhecimento e do estresse no timo***

O envelhecimento, bem como o estresse, resultam em uma variedade de alterações biológicas em elementos do sistema imune, mediadores neurológicos e hormonais.

O principal efeito de ambos os processos no sistema imune pode ser observado no timo, local primário para desenvolvimento de células T. Esse órgão consiste de dois lobos localizados atrás do esterno. Pela análise histológica, podemos perceber que este ainda se divide em duas regiões: o córtex, que contém uma densa população de linfócitos T, e a medula, que, além de linfócitos T, contém linfócitos B, macrófagos, células NK, dentre outras. Pelo fato de o timo apresentar principalmente linfócitos e células epiteliais, este é descrito como um órgão linfóide. Os precursores dos linfócitos T se originam na medula óssea e migram para o córtex tímico, diferenciando-se nesse órgão em sub-populações: linfócitos T auxiliares e citotóxicos que podem ser

distinguidos pelas moléculas de membrana CD4 e CD8, respectivamente. Após a seleção tímica, os linfócitos T migram para os diversos órgãos linfóides (Westermann & Exton, 1996).

A principal função do timo é a “educação” dos linfócitos T: estes aprendem a distinguir entre os antígenos próprios e não-próprios através da apresentação feita pelas moléculas de MHC de classe I e classe II. A partir desse processo, o repertório de linfócitos T é construído, obtendo uma diversidade de aproximadamente  $10^{12}$ . Da grande população de linfócitos produzidos, apenas 5% deixam o timo via região medular e migram para outros órgãos linfóides (Westermann & Exton, 1996).

O timo, durante os processos de estresse e envelhecimento, sofre uma grande atrofia caracterizada pela perda da região cortical mas não da região medular acarretando, então, perda de timócitos imaturos e diminuição na população de células presentes neste local (Takeoka, 1996; Sudo, 1997; Bodey, 1997). Ao longo da vida, o peso do timo humano se mantém relativamente constante. Ele pesa aproximadamente 25 gramas na idade de 1 ano, 20 gramas nos adultos e 20 gramas acima dos 90 anos. Mas quando comparamos o tamanho dos diferentes compartimentos tímicos, observamos uma acentuada diminuição da região cortical e um aumento do tecido adiposo com o avançar da idade. (Westermann & Exton, 1996). Outros relatos indicam que há uma progressiva redução do tamanho desse órgão ao longo da vida, de aproximadamente 3% a 1% por ano (Solana & Pawelec, 1998; Bodey, 1997).

A involução tímica é um fenômeno fisiológico conhecido por ser uma das maiores causas do declínio das funções imunes dependentes de células T. Esse fenômeno é dependente de fatores intrínsecos e extrínsecos. Tanto o microambiente tímico como os precursores linfocitários sofrem modificações morfológicas e funcionais profundas (Takeoka, 1996; Solana & Pawelec, 1998). Apesar da drástica redução dos timócitos durante o envelhecimento, não há aparentemente uma diminuição do número de células precursoras de linfócitos T na medula óssea (Thoman, 1997; Mackall & Grees, 1997).

O microambiente tímico fornece citocinas e o estroma tímico, cruciais para o desenvolvimento de linfócitos T (Andrew & Aspinall, 2002). Esse microambiente é composto pelo estroma tímico, células epiteliais e células dendríticas (DCs), ambas essenciais para a seleção negativa além de macrófagos e fibroblastos. Durante a senescência, a capacidade de diferenciação de timócitos com fenótipo imaturo ( $CD44^+CD25^-$ ) para um mais maduro ( $CD44^+CD25^+$ ) no microambiente tímico diminui.

Além disso, segundo Solana & Pawelec (1998), há uma diminuição, nessas células, da expressão de RAG1 e RAG2, enzimas essenciais para promover a recombinação gênica em linfócitos T e B (Solana & Pawelec, 1998).

As duas citocinas mais importantes no desenvolvimento das células T são o fator de células-tronco (*stem cell factor* - SCF) e a interleucina-7 (IL-7), que estimulam a hematopoiese. A primeira possui um papel na manutenção da viabilidade e da capacidade proliferativa de células T imaturas. Já a IL-7 é produzida pelas células epiteliais e seu papel no desenvolvimento de timócitos está ligado à sobrevivência e proliferação dessas células auxiliando inclusive na etapa do rearranjo do receptor de células T (TCR). O receptor de IL-7 contém uma cadeia  $\alpha$  específica para IL-7 e uma cadeia  $\gamma$ , comum a outras citocinas como IL-2, IL-9 e IL-15 (Andrew & Aspinall, 2002). Foi descrito que a expressão de IL-7 decai com o avançar da idade. Alguns estudos indicam que a involução tímica não é causada pela redução da capacidade de diferenciação de células T precursoras (pró-T), mas sim devido a uma diminuição dessa citocina. Assim, ocorreria uma diminuição na expansão de precursores de células T devido a uma carência de IL-7 (Thoman, 1997). De fato, a administração exógena dessa citocina pode induzir a timopoiese, o que aponta para uma terapia potencial baseada no seu suprimento durante o envelhecimento (Aspinall & Andrew, 2001).

Mudanças nos sistemas neuro-endócrino ao longo do processo de envelhecimento têm um impacto importante no sistema imune (Solana & Pawelec, 1998). O timo reage sensivelmente aos hormônios que são liberados durante o estresse, como, por exemplo, os glicocorticóides. A ação desse hormônio ocorre no volume tímico total que se reduz drasticamente e particularmente no córtex que diminui sua população celular, principalmente de timócitos CD4+CD8+. A remoção da glândula adrenal é capaz de reverter a atrofia tímica, acelerando o processo de maturação de timócitos. (Tarcic *et al*, 1998; Sacedón *et al*, 1998; Hadden, 1998; Westermann & Exton, 1996). Altas concentrações de glicocorticóides são capazes de induzir a apoptose de timócitos (Vacchio *et al*, 2000). Não há influência de DHEA neste processo (Bodey, 1997).

Esses mesmos efeitos também são observados durante o envelhecimento, indicando que provavelmente também há uma desregulação do eixo HPA em fases mais tardias da vida (Solana & Pawelec, 1998; Bauer, 2005). Segundo Madden e colaboradores (1997), as inervações noradrenárgicas aumentam sua densidade no timo

durante o envelhecimento, assim como a concentração de noradrenalina nesse órgão (Madden *et al*, 1997).

Outros hormônios, como o hormônio do crescimento (GH), também agem sobre o timo, induzindo a migração intratímica de timócitos (Savino *et al*, 1998). Tanto no envelhecimento quanto no estresse a produção desse hormônio está diminuída (Bauer, 2005; Dunn, 2000). Os processos de senescência e de estresse têm sido associados a várias alterações funcionais do sistema imune. Diversas modificações ocorridas durante o envelhecimento, como involução tímica, redução de células T virgens e baixa capacidade proliferativa das células T, são similares aos efeitos encontrados durante o estresse crônico (Bauer, 2005).

### ***1.3 - Definição do estresse***

O termo “estresse” é utilizado pela literatura sempre relacionado a uma força ou pressão exercida sobre uma pessoa capaz de gerar mudanças no seu estado físico e psicológico. A partir dessa definição, se iniciaram as suposições sobre uma possível correlação entre fatores emocionais com o desenvolvimento das doenças físicas (Berczi, 1998).

Em 1910, o médico anatomista inglês Willian Osler propôs uma relação entre o trabalho excessivo e o surgimento de doenças coronarianas (revisado por Feindel, 2003). Estudos epidemiológicos ao longo dos anos demonstraram também uma ligação entre o estresse e o desenvolvimento de várias doenças tais como infecções virais, úlceras gástricas, doenças cardiovasculares, distúrbios psicológicos e câncer (Lauc *et al*, 1998; Mello *et al*, 2003).

A partir da década de 1930, os estudos sobre o estresse e seus mecanismos se intensificaram. O conceito de estresse foi primeiramente descrito por Cannon (1929) como uma reação de emergência que auxilia o organismo a mobilizar energia para resposta de fuga ou luta em situações de perigo. A teoria de Cannon descreve o que atualmente se denomina estresse agudo (revisado por Tewes, 1996).

O pesquisador Hans Selye, em 1936, influenciado pelos trabalhos de Cannon (1929), descreveu alterações no equilíbrio homeostático em animais submetidos a vários estímulos estressores. Os principais efeitos observados foram atrofia tímica, aumento da glândula adrenal e atrofia dos linfonodos. Esses efeitos eram reversíveis em animais

adrenalectomizados evidenciando então a participação de hormônios esteróides no processo (revisado por Berczi, 1998). Até então, segundo o estudo de Cannon *et al* em 1911, pensava-se que respostas neuroendócrinas a uma lesão eram restritas à liberação de catecolaminas, principalmente a adrenalina, (revisado por Szabo, 1998 e Tewes, 1996).

A resposta ao estresse é promovida pelo sistema de estresse localizado no sistema nervoso central (SNC) e na periferia. Esse sistema recebe e integra uma grande diversidade de neurosensores (ex: auditivos, gustativos, olfatório, visual, límbico, visceral) e sinais via vasos sanguíneos (hormônios, citocinas e outros mediadores). Ativação do sistema de estresse leva a mudanças tanto físicas como comportamentais (Chrousos, 1998 e 2000).

Em 1946, Selye descreveu a resposta ao estresse como Síndrome do Estresse ou Síndrome de Adaptação, baseados em seus dados experimentais. Essa síndrome se caracterizava, primariamente, por uma reação de choque e depois, tardiamente, se desenvolvia uma resistência ao agente estressor (revisado por Szabo, 1998). O organismo adaptava as mudanças ocorridas de modo a melhorar as chances do indivíduo sobreviver (Chrousos, 1998 e 2000).

Durante a resposta ao estresse, é possível observar várias alterações físicas e comportamentais, além das já descritas, tais como aumento do estado de alerta e vigilância, aumento do número de leucócitos sanguíneos, aumento da região cortical da glândula adrenal com aumento da deposição de grânulos de lipídios, involução tímica com depleção de timócitos. A persistência do estresse por períodos longos afetaria também outros órgãos como o baço e os linfonodos, podendo causar involução dos mesmos (Berczi, 1998). Segundo Selye (1936), alterações estruturais como avaliação do peso do timo, baço e glândula adrenal poderiam indicar a intensidade do estresse, método comumente usado entre os anos 1940 e 1950 (revisado por Szabo, 1998). Esse mesmo pesquisador, em 1974, criou uma definição para o estresse e essa definição tem mudado ao longo dos anos, mas seu significado permanece o mesmo. Para ele, o estresse seria o reconhecimento de diversos agentes da natureza pelo organismo (por exemplo, calor ou frio excessivo, imobilização forçada ou exercícios e agentes químicos, físicos e psicológicos) capazes de ativar uma resposta neuroendócrina específica, a qual consiste na ativação do sistema nervoso autônomo (SNA) e do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (Engelmann *et al*, 2004; Szabo, 1998).

Muitas das funções do organismo são controladas e mantidas em um estado estável (*steady-state*) dinâmico, referido como um equilíbrio homeostático. Vários fatores psicológicos apresentam um papel na manutenção desse equilíbrio interno (Tewes, 1996). Segundo Chrousos (1998 e 2000) e Engelmann *et al* (2004), uma outra definição para o estresse seria um distúrbio da homeostase do indivíduo devido a forças perturbadoras, chamadas estressores. O restabelecimento contra a ação dessas forças é denominada resposta adaptativa. Uma resposta adaptativa pode ser inadequada para o restabelecimento da homeostase, quando o equilíbrio não é alcançado surgindo a doença como consequência (Chrousos, 1998 & Engelmann *et al*, 2004). Resumidamente, agente estressor seria o estímulo causador do estresse e esse último seria definido como o fenômeno ou a resposta do organismo a um estressor (Szabo, 1998).

De acordo com as definições de Hans Selye (1974) e George Chrousos (1998 e 2000), um estímulo se torna um agente estressor se há ativação do eixo HPA e o desenvolvimento de um mecanismo de restabelecimento da homeostase pelo indivíduo (Engelmann *et al*, 2004; Vrezas *et al*, 2003 & Szabo, 1998).

Os produtos neuroendócrinos decorrentes da ativação do eixo HPA afetam vários órgãos. As três maiores alterações observadas macroscopicamente e conhecidas como tríade do estresse ou tríade patológica são: hipertrofia da glândula adrenal, ulcerações gastrointestinais e atrofia tímica. Dessa maneira, o eixo HPA apresenta um papel chave na resposta do organismo ao estresse (Szabo, 1998).

Ainda de acordo com Selye, (1956), o estresse se desenvolveria em três fases: a fase de alerta, a de resistência e de exaustão. Durante o estresse, o organismo redistribui suas fontes de energia, devido à ativação do sistema de luta ou fuga pelo SNA (locomotor e sensorial), para o SNC e locais afetados diretamente afetados pelo estresse. Há um aumento das funções cardiovasculares (como o ritmo cardíaco e pressão arterial), respiratórias e metabólicas, enquanto que os sistemas secundários (digestivo, imune, reprodutivo, etc) estão temporariamente deprimidos (Chrousos, 1998 e 2000). Esses efeitos caracterizam a fase de alerta, caracterizada também pela rápida liberação de ACTH e cortisol. Esse estado é vantajoso em uma situação de real perigo, mas se os estímulos persistirem por mais tempo, como é o caso de estresse crônico, o dano ao organismo será inevitável. Nesse momento, o organismo passa pela fase de resistência, onde a secreção de cortisol é ainda maior, podendo levar uma hipertrofia do córtex adrenal. Na última fase, o organismo apresenta um estado de compensação,

apresentando resistência a outros estressores, o que pode resultar colapso total (Lauc *et al.*, 1998).

A importância do sistema nervoso simpático foi negligenciada por Selye e posteriormente outros pesquisadores propuseram um modelo dual para descrever os efeitos da reação do organismo ao estresse (Pinel, 1993, Dunn, 1989 e Sachar, 1980). A resposta a tais estímulos é acompanhada simultaneamente pela ativação do sistema nervoso simpático e mobilização dos recursos energéticos, levando à liberação de adrenalina pela medula adrenal e noradrenalina nas terminações nervosas. Esses efeitos em conjunto preparam o organismo para reagir rapidamente através da reação de fuga ou luta. Os sintomas típicos após a ativação desse mecanismo são aumento dos batimentos cardíacos, dilatação dos vasos sanguíneos nos músculos e no cérebro, dilatação da pupila, dentre outros (Ursin & Olf, 1993; Kvetnansky & Sabban, 1998).

Durante o estresse, há a ativação do SNA, paralelamente ao eixo HPA, podendo ocorrer estimulação primária da medula da adrenal, com liberação de adrenalina e estímulos noradrenérgicos em muitos órgãos como o timo, medula óssea e outros órgãos linfóides periféricos. A adrenalina e noradrenalina apresentam efeitos supressores significativos na resposta imune (Dunn, 1998).

A medula óssea e o timo apresentam-se conectados por fibras simpáticas e parassimpáticas. As fibras parassimpáticas podem liberar acetilcolina, neuropeptídeos inibitórios, óxido nítrico ou peptídeo vasoativo intestinal (VIP). Já as fibras simpáticas são capazes de secretar neuropeptídeo Y (Watkins, 1997).

A indução do estresse em modelos experimentais é mais facilmente estudada. Diferentes estressores podem ser precisamente definidos e descritos, e a reação a um mesmo estímulo se apresenta de maneira similar na maioria dos animais. Já em humanos, existem várias dificuldades para esses estudos, principalmente pela grande variabilidade entre os indivíduos tanto em fatores psicológicos, quanto físicos e sociais (Tewes, 1996).

Um outro problema é tentar diferenciar o estresse agudo do crônico. Os estressores podem ser diferenciados não só pela qualidade ou pela intensidade como também pela duração e pela frequência. Não existem na literatura critérios definidos para diferenciar entre o estresse agudo ou crônico. Um estímulo de curta duração pode ser acatado como estresse agudo e, se esse mesmo estímulo permanece por períodos prolongados, considera-se como estresse crônico (Tewes, 1996).

#### ***1.4 - O efeito da ativação do eixo HPA no organismo durante o estresse***

O cérebro transmite mensagens por duas vias eferentes: através dos nervos e pelo sistema endócrino. Estes estão intimamente relacionados a algumas glândulas (hipotálamo, hipófise posterior e medula adrenal) que são derivados do sistema nervoso (Schürmeyer *et al*, 1996).

Hormônios são quimicamente definidos como substâncias que são secretadas pelas glândulas endócrinas e exercem seus efeitos a uma certa distância do local em que foram produzidas. Os hormônios podem ser divididos em vários grupos de acordo com sua estrutura química. Os hormônios esteróides são derivados do colesterol e produzidos pelos ovários, testículos, glândula adrenal e placenta, e são categorizados como estrogênios, progesterona, androgênios, glico e mineralocorticóides. As catecolaminas (adrenalina, noradrenalina e dopamina) são derivadas do metabolismo do aminoácido fenilalanina e sintetizados via tirosina e dopa e apresentam dupla função como hormônios e neurotransmissores. Apenas uma pequena fração do hormônio é responsável pelo efeito hormonal no tecido-alvo (Schürmeyer *et al*, 1996). Os receptores dos hormônios esteróides são intracelulares, ocorrendo no citoplasma; já os receptores de neurotransmissores são encontrados aderidos à membrana plasmática (Schürmeyer *et al*, 1996).

Os principais componentes do sistema de estresse estão localizados no hipotálamo, incluindo o hormônio de liberação de corticotrofina (CRH – *corticotripin-release-hormone*), no *locus ceruleus* (LC) e nas células secretoras de noradrenalina (NE) da medula (citados como sistema LC/NE). O sistema de estresse periférico são os sistemas simpáticos e parassimpáticos e o eixo HPA (Chrousos, 1998 e 2000). O CRH e NE são os principais reguladores do eixo HPA e do sistema LC/NE. A ativação deste último atua como um mecanismo de emergência ou alarme, tendo uma estreita ligação com o SNA (Mello *et al*, 2003; Kvetnansky & Sabban, 1998).

O hipotálamo recebe sinais de quase todas as fontes possíveis do sistema nervoso, sendo considerado um órgão coletor de informações que dizem respeito ao bem-estar interno do corpo, o que é usado para controlar as secreções de muitos hormônios hipofisários importantes. Frente a um estímulo, o hipotálamo envia mensagens para a hipófise e para o SNA. Quase toda a secreção da hipófise (também conhecida como pituitária) é controlada por sinais hormonais ou nervosos do hipotálamo (Guyton & Hall, 1996).

A secreção da hipófise posterior, ou neurohipófise, é controlada por sinais nervosos que se originam no hipotálamo e terminam na hipófise posterior. Em contraste, a secreção pela hipófise anterior, ou adenohipófise, é controlada por hormônios de liberação hipotalâmicos secretados dentro do próprio hipotálamo e depois conduzidos para a hipófise anterior por diminutos vasos sanguíneos, chamados de vasos porta hipotalâmicos-hipofisários para dentro dos sinusóides da hipófise anterior. Assim, a porção mais inferior do hipotálamo, chamada eminência média, se conecta inferiormente com a haste hipofisária (Guyton & Hall, 1996).

Dentre os diversos hormônios secretados pelo hipotálamo, destaca-se o CRH, principal hormônio regulador hipotalâmico do eixo HPA na resposta ao estresse, que causa a liberação de adrenocorticotrofina (ACTH) pela hipófise anterior (Guyton & Hall, 1996 & Chrousos, 1998 e 2000). A região cortical da glândula adrenal é o principal órgão-alvo desse hormônio hipofisário (Chrousos, 1998 e 2000). Uma produção excessiva desses dois hormônios pode levar a uma desregulação do sistema de estresse, podendo gerar neoplasia da glândula adrenal (Vrezas *et al*, 2003; Raison *et al*, 2003).

O CRH é expresso pelos neurônios parvocelulares localizados no núcleo paraventricular do hipotálamo. Uma vez secretado, esse hormônio passa pelos vasos porta hipotalâmicos-hipofisários ligando-se aos receptores específicos na hipófise anterior e causando a liberação de ACTH. Existem dois tipos de receptores de CRH no cérebro. O tipo 1 está vastamente distribuído e está relacionado a transdução dos efeitos do CRH durante o estresse. Foi demonstrado que camundongos alterados geneticamente a fim de eliminar a expressão deste receptor (*knockout*), apresentaram uma diminuição da ansiedade. Em contraste, animais *knockout* para o tipo 2 se mostraram mais excitados e ansiosos, evidenciado que esse receptor possui um papel contrário em relação ao tipo 1 (Mello *et al*, 2003; Smagin *et al*, 2001). A liberação de CRH é dependente do ciclo circadiano, apresentando um aumento durante as primeiras horas do dia, resultando num conseqüente aumento de ACTH e cortisol na circulação (Chrousos, 1998 e 2000). Por outro lado, o CRH inibe a secreção de prolactina e hormônio do crescimento, além de estimular a liberação de noradrenalina via *locus ceruleus*, o que leva a ativação do SNS (Dunn, 2000).

O hormônio hipotalâmico arginina-vasopressina (AVP) também é expresso pelos neurônios parvocelulares, que sozinho atua como um fraco estimulador de ACTH, mas em sinergia com o CRH, potencializa a secreção desse hormônio hipofisário pela

adenohipófise. Este último, por sua vez, se liga a receptores do córtex adrenal a fim de estimular a produção e a secreção de cortisol (Mello *et al*, 2003; Raison *et al*, 2003).

Em humanos, as duas glândulas adrenais se localizam nos pólos superiores dos rins. Cada glândula é composta por duas partes distintas: a medula adrenal e o córtex adrenal. A medula adrenal está funcionalmente relacionada ao sistema nervoso simpático (SNS); secretando catecolaminas em resposta à estimulação simpática. O córtex adrenal secreta um grupo inteiramente diferente de hormônios, chamados de corticosteróides. Estes hormônios são todos sintetizados a partir do esteróide colesterol (Guyton & Hall, 1996).

Dois tipos principais de hormônios adrenocorticais são secretados pelo córtex adrenal: os mineralocorticóides e os glicocorticóides. Além destes, são secretados pequenas quantidades de hormônios sexuais androgênicos. Os mineralocorticóides afetam especialmente os eletrólitos dos líquidos extracelulares, principalmente sódio e potássio. Já os glicocorticóides apresentam um efeito importante aumentando a concentração de glicose sanguínea, o metabolismo de proteínas e lipídios, dos batimentos cardíacos e da pressão sanguínea (Mello *et al*, 2003; Sapolsky *et al*, 2000 & Guyton & Hall, 1996). Dos vários tipos de esteróides secretados pelo córtex adrenal, destacam-se a aldosterona, principal mineralocorticóide, e o cortisol, principal glicocorticóide, responsável por aproximadamente 95% de toda atividade de glicocorticóide. A corticosterona é responsável por cerca de 4% da atividade glicocorticóide total e apresenta uma menor ação quando comparada ao cortisol (Guyton & Hall, 1996). Em ratos e camundongos, o principal glicocorticoide é a corticosterona (Raison *et al*, 2003).

O córtex adrenal é composto por três camadas distintas: zona glomerulosa, que secreta aldosterona; zona fasciculada e zona reticular, que secretam cortisol e dehidroepiandrosterona (DHEA), respectivamente (Chrousos, 1998 e 2000; Schürmeyer *et al*, 1996; Shwartz *et al*, 2004). Fatores como a estimulação pelo hormônio ACTH da adenohipófise podem levar a uma hipertrofia da zona fasciculada, causando um aumento da secreção de cortisol (Guyton & Hall, 1996 e Berczi, 1998).

Quase todos os tipos de estresse, físicos ou psicológicos, como traumatismos, infecção, frio ou calor intenso, cirurgia, imobilização forçada de um animal, dentre outros, causam um aumento imediato e acentuado da secreção de ACTH pela adenohipófise, seguido de uma grande liberação de cortisol pelo córtex adrenal,

lançados na corrente sanguínea (Guyton & Hall, 1996, Raison *et al*, 2003 & Dunn, 1993).

O cortisol apresenta efeitos centrais e periféricos, mediados por dois tipos de receptores: o receptor de alta afinidade tipo 1 (ou receptor de mineralocorticóide - MR) e o de baixa afinidade tipo 2 (ou receptor de glicocorticóide - GR). O receptor tipo 1 responde aos níveis basais de cortisol, enquanto o tipo 2 é sensível aos grandes picos de cortisol durante o ciclo circadiano ou durante o estresse. A ligação do cortisol aos receptores tipo 2 no hipotálamo e nos diversos componentes do eixo HPA, atua como um potente regulador da atividade do eixo HPA (Mello *et al*, 2003 & Sapolsky *et al*, 2000). O receptor tipo 2 também é encontrado em diversas outras partes do corpo como no timo, baço e linfonodos (Bauer, 2001).

A secreção do cortisol apresenta maiores níveis durante as primeiras horas do dia e durante as refeições. Mas ele também é secretado em resposta ao estresse. Os picos de liberação de cortisol são precedidos por pulsos de ACTH liberados pela hipófise (Schürmeyer *et al*, 1996).

A produção aguda de cortisol durante o estresse são responsáveis pelo aumento das funções cardiovasculares, mobilização de energia e inibição do crescimento e das funções reprodutivas, assim como de algumas respostas imunológicas. A secreção crônica desse hormônio é quase sempre deletéria, resultando em resistência à insulina, deposição de gordura, osteopenia, osteoporose, diminuição da massa muscular, comprometimento do processo de cicatrização, sensações de medo e efeito supressor nas respostas inflamatórias e imunológicas (Mello *et al*, 2003; Chrousos, 1998 e 2000; Watkins, 1997; Schürmeyer *et al*, 1996).

Foi demonstrado que os efeitos do estresse podem ser bloqueados por um antagonista do receptor de glicocorticóide (Demetrikopoulos, 1996).

O andrógeno Dehidroepiandrosterona (DHEA) e sua forma sulfatada (DHEA-S) também são produzidos e secretados pelo córtex adrenal, sinergicamente com o cortisol, em resposta ao ACTH e CRH. Ele se encontra em maiores concentrações em indivíduos jovens e em menores quantidades nos idosos. Segundo Shwartz (2002), Shwartz *et al* (2004) e Kroboth *et al* (1999), esse hormônio possui ação anti-envelhecimento, podendo ser utilizado como um marcador fisiológico nessa etapa da vida (Shwartz, 2002; Shwartz *et al*, 2004; Kroboth *et al*, 1999). Ao contrário do cortisol, o DHEA é capaz de aumentar as atividades do sistema imune, proporcionando um contrabalanço dos efeitos decorrentes da estimulação do eixo HPA (Butcher & Lord, 2004). Esse andrógeno

também possui um efeito inibidor na secreção de catecolaminas e neurotransmissores (Zinder & Dar, 1999).

A ativação do eixo HPA é influenciada por fatores físicos, mentais e pelo estresse. A resposta ao estresse pode ocorrer em poucos minutos. A sinapse neuronal no hipotálamo ativa a secreção de CRH, que estimula a liberação de ACTH e, conseqüentemente, inicia a produção de cortisol. Há também a ativação do sistema LC/NE e liberação de catecolaminas. O efeito do cortisol pode durar horas, ao contrário das catecolaminas. Ambos os sistemas atuam promovendo a manutenção da homeostase (Schürmeyer *et al*, 1996; Elenkov & Chrousos, 1999).

### ***1.5 - Interações neuroimunoendócrinas***

Existem hoje várias evidências que sugerem que a mente (psicologia), o cérebro (neurologia) e as defesas naturais do corpo (imunologia) comunicam-se entre si através dos hormônios, neuropeptídeos e citocinas. A investigação dessas conexões entre a mente e o corpo são conhecidas atualmente como um novo ramo da ciência chamada Psiconeuroimunologia (PNI) (Watkins, 1997). A partir dessa definição, outros novos termos também foram criados como neuroimunomodulação, que se refere às influências do sistema nervoso nas respostas imunes; e neuroendocrinoimunologia, que é o estudo de influências neuroendócrinas nas funções de células imunocompetentes e nas funções neurais e atividades endócrinas (Reichlin, 1993).

Os mecanismos de homeostase do organismo estão integrados pelos sistemas nervoso, endócrino e imune. Respostas imunes alteram funções endócrinas e nervosas, e o contrário, atividades neurais e endócrinas modificam funções imunológicas. Muitos peptídios e seus receptores são encontrados tanto no cérebro quanto no sistema imune (Reichlin, 1993).

Vários estudos em PNI evidenciam que todo o sistema imune está sob o controle do SNC. Assim, toda idéia ou pensamento tem uma conseqüência neuroquímica, e neuropeptídios fluem do SNC sendo capazes de se ligarem a receptores presentes em virtualmente todos os leucócitos, regulando sua função (Watkins, 1997). Tais descobertas poderiam explicar como fatores emocionais ou respostas ao estresse podem modificar a capacidade de uma pessoa lidar com doenças como infecções, tumores e doenças autoimunes (Reichlin, 1993).

Para se entender melhor a dificuldade de se analisar a complexidade de interações neuroimune-endócrinas, três aspectos devem ser considerados: a complexidade dos sistemas imune e nervoso, os difusos limites entre condições fisiológicas e patológicas, e as interações de *feedback* entre os sistemas nervoso e imune em condições basais. Esses aspectos ilustram as múltiplas possibilidades de interações entre os sistemas neuroimune-endócrinos. A comunicação entre esses sistemas pode ser vista, então, como uma rede de interações (Besedovsky & Del Rey, 1996).

Durante o reconhecimento de antígenos, algumas células ativadas liberam substâncias que atuam como mensageiros para o cérebro. Alguns desses produtos, como citocinas, algumas frações do complemento, imunoglobulinas, histamina, serotonina, mediadores da inflamação, fazem a comunicação entre o sistema imune e o nervoso (Besedovsky & Del Rey, 1996).

Segundo Tournier & Hellmann (2003), as interconexões moleculares entre os sistemas imune e nervoso poderiam ser chamadas de “sinapses neuro-imunológicas”, conceito usado para descrever as zonas de contato entre os neurônios adrenérgicos e os linfócitos ou células apresentadoras de antígenos (APCs). O termo sinapse, restrito a estruturas especializadas no sistema nervoso, tem sido utilizado também para se referir a outros contatos como as “sinapses imunológicas” que ocorrem entre as APCs e células T. Análises em microscopia eletrônica detectaram neurônios em íntimo contato com linfócitos e APCs em determinadas regiões do baço e do tecido linfóide associado ao intestino (McKay & Bienenstock, 1994). A secreção de determinadas citocinas pode modular a liberação de neuromediadores, como a noradrenalina, indicando que essas sinapses neuro-imunológicas são possivelmente bidirecionais (Tournier & Hellmann, 2003).

Os primeiros trabalhos que sugeriram influências psicológicas na função do sistema imune foram realizados por Black *et al*, em 1963. Nesses estudos, através da hipnose, foi possível inibir uma resposta de hipersensibilidade do tipo imediata. Nos anos seguintes, pesquisadores demonstraram que situações de estresse vividas por um indivíduo resultaram em uma diminuição da atividade imunológica sendo detectados altos níveis de anticorpos anti-herpes viral, diminuição na atividade e proliferação de células NK. Pacientes diagnosticados com depressão também apresentaram diminuição na imunidade celular, com diminuição do número e da capacidade proliferativa de linfócitos e atividade das células NK; aumento da imunidade humoral, apresentando elevados níveis de IgA, IgM e IgE (Greer, 1998).

Uma diminuição das atividades citotóxicas de células T e NK pode afetar vários processos desencadeados pelo sistema imune, como o de vigilância imunológica contra tumores e eventos que desencadeiam a acumulação de mutações somáticas e instabilidade do genoma (Reiche *et al*, 2004).

Como dito anteriormente, o processo de estresse é capaz de ativar ou inibir a liberação de uma variedade de hormônios e neurotransmissores que tem sua ação comprovada sobre o sistema imune, estimulando-o ou suprimindo-o. (Dunn, 1998; Gaillard *et al*, 1998). Há evidências indicando que uma ampla variedade de funções de leucócitos podem ser inibidos ou estimulados por hormônios produzidos pelo SNC e tecidos endócrinos periféricos. Hormônio do crescimento, tireotrofina, hormônio da tireóide, gonadotrofina coriônica humana, vasopressina e prolactina apresentam atividade imuno-reguladora (Watkins, 1997).

O efeito do estresse sobre o sistema imune pode variar muito, dependendo da duração, da intensidade, da idade, das condições de saúde, resistência do indivíduo ao estresse, duração do tempo entre a avaliação imunológica e aplicação do agente estressor (Watkins, 1997; Dunn, 1998;).

No processo recíproco de comunicação entre os sistemas imune e neuroendócrino, interleucinas como IL-1, IL-6 e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) são capazes de modular a síntese de neuropeptídios e neuroesteróides e a atividade noradrenérgica central. Elas desempenham um importante papel na ativação do eixo HPA, atuando sobre o hipotálamo, hipófise e adrenal, induzindo a liberação de CRH, AVP, hormônios hipofisários e conseqüente liberação de cortisol. Esse hormônio possui vários efeitos sobre o sistema imune como supressão da atividade imunológica e da produção de citocinas inflamatórias, através da inibição da proliferação, migração, citotoxicidade celular, indução da apoptose e supressão da produção de IL-2 e interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Tais alterações podem contribuir para um aumento da susceptibilidade a agentes patológicos (Watkins, 1997; Dunn, 1998; Gaillard *et al*, 1998; Chrousos, 2000; Elenkov & Chrousos, 1999; Moynihan & Stevens, 2001; Bauer *et al*, 2001; Besedovsky & Del Rey, 2001).

Outros estudos também mostraram que o cortisol atua sobre as células apresentadoras de antígenos (APCs) suprimindo a produção de IL-12 com a conseqüente inibição de uma resposta do tipo Th1. Paralelamente, a expressão do receptor de IL-12 em células T e NK também diminui. Já a produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-4 e IL-10 não está afetadas, ao contrário, estas podem se mostrar

mais elevadas (Elenkov & Chrousos, 1999; Moynihan & Stevens, 2001; Coe, 1996; Besedovsky & Del Rey, 2001).

As respostas imunes são reguladas ainda pela atividade de APCs como os monócitos, macrófagos, células dendríticas e outras células fagocitárias, componentes da imunidade inata. Linfócitos T auxiliares (Th – *T helper*) subclasses Th1, Th2, Th3, Tr1 fazem parte da imunidade adaptativa. Células com um perfil Th1 secretam IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF, sendo importantes nas reações celulares do tipo hipersensibilidade tardia (*delayed type hypersensitivity* ou DTH); enquanto células Th2 secretam diferentes tipos de citocinas como IL-4, IL-10, IL-13 e promovendo reações de hipersensibilidade do tipo I e troca de isotipos para IgG1 e IgE. Como a IL-12 é extremamente potente em induzir a produção de IFN- $\gamma$  e inibir a de IL-4 pelos linfócitos T, a supressão na produção de IL-12 pode indicar a influência desse hormônio no balanço Th1/Th2 de citocinas (Elenkov & Chrousos, 1999; Calcagni & Elenkov, 2006). Existem também os linfócitos T CD4+ com função reguladora como as células Th3 que secretam principalmente TGF- $\beta$  e as células Tr1 produtores de IL-10, ambas citocinas anti-inflamatórias, e são referidas como células T reguladoras adaptativas, diferentes das células T naturais (CD4+CD25+) (Faria & Weiner, 2005; Groux et al, 1997).

Não somente o cortisol, mas as catecolaminas também são capazes de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias, influenciando sua ação no balanço de citocinas secretadas por linfócitos T tanto CD4+ quanto CD8+ (Elenkov & Chrousos, 1999; Chrousos, 2000; Moynihan & Stevens, 2001; Besedovsky & Del Rey, 2001).

Durante o estresse, podemos observar varias outras modificações imunológicas. O número e a proporção de leucócitos no sangue é uma representação do estado de ativação do sistema imune e o padrão de distribuição de células imunes pelo corpo (Dhabhar, 1996). Foi descrito por McKinnon e colaboradores (1989) e por Dhabhar (2000) que o estresse desencadeia um aumento do número e da porcentagem de neutrófilos e um decréscimo de linfócitos no sangue. A interrupção do estresse induz o restabelecimento de valores normais (revisado por Coe, 1996; Dhabhar, 2000). Animais adrenalectomizados mostraram que estas alterações estão diretamente relacionadas com a liberação de hormônios pela adrenal durante o estresse (Dhabhar, 1995 e 1996). A redução de leucócitos sanguíneos pode estar vinculada a sua migração para outros compartimentos como órgãos linfóides, mucosas e pele; processo mediado pela expressão de moléculas de adesão, como  $\beta$ -2 integrina, também alterada durante o estresse (Padgett *et al*, 1998; Bauer, 2001).

Da mesma forma, as catecolaminas também são capazes de afetar a distribuição de leucócitos no corpo. Esses hormônios apresentam o efeito de aumentar a quantidade de leucócitos no sangue, aumentando o número de neutrófilos e células NK e reduzindo os linfócitos T e B. Um pré-tratamento com catecolaminas induz um maior acúmulo de linfócitos no baço, timo e nos linfonodos e sua diminuição no sangue (Dhabhar, 2000).

O efeito de estressores sobre o desenvolvimento de linfócitos pode ter um papel extremamente importante na função do sistema imune em situações de estresse (Dunn, 1998). Os linfócitos se originam de células hematopoiéticas progenitoras indiferenciadas que podem se desenvolver em linfócitos T e B e células NK de acordo com estímulos do micro-ambiente e de fatores solúveis como citocinas e hormônios (Abbas & Lichtman, 2005).

Em trabalhos sobre estresse, já está bem documentado seu efeito sobre o timo, causando uma involução do mesmo. Tanto nesse órgão como no baço, ocorre uma drástica redução de linfócitos, principalmente no número de células imaturas ( $CD4^+CD8^+$ ) e células  $CD4^+CD8^-$ , mas não há alteração nas células  $CD4^-CD8^+$ . Já na medula óssea, o estresse induz aumento significativo na proporção e no número de linfócitos  $CD3^+CD4^+$ ,  $CD3^+CD8^+$ ,  $B220^{bright}IgM^+$  e  $CD3^+CD25^+$  (Sudo *et al*, 1997).

Em camundongos *nude* (atímicos) submetidos ao estresse, foi observado um decréscimo na secreção de ACTH e corticosterona. Quando os mesmos foram repovoados por células T  $CD4^+$ , houve um aumento significativo na produção desses hormônios. Dessa forma, esses linfócitos também apresentam um papel importante na regulação da liberação de hormônios hipofisários e adrenérgicos, e possivelmente do eixo HPA como um todo (Gaillard *et al*, 2000).

Segundo Coe (1996), utilizando um anticorpo monoclonal para detectar os marcadores de superfície expressos em diferentes populações de linfócitos, foi observado que, durante o estresse, há uma diminuição das células  $CD4^+$  quando comparadas com as células  $CD8^+$ , diminuição das células NK e linfócitos B, e da capacidade proliferativa de linfócitos (Coe, 1996; Dhabhar, 2000).

Como os eventos de ativação, proliferação e diferenciação de células estimuladas pelas APCs precedem o aumento nos níveis de cortisol durante a ativação do eixo HPA, algumas funções do sistema imune não são afetadas. Foi demonstrado que a IL-1, uma citocina com ação pro-inflamatória, possui atividade protetora em linfócitos T  $CD4^+$ , mas não em linfócitos  $CD8^+$ , frente à ação desse hormônio. Por isso, células em estágios avançados de ativação podem ser afetadas diferentemente em relação a

células imaturas na presença de cortisol (Besedovsky & Del Rey, 1996; Kusuhara, 2006).

Segundo Sapolsky (1994), dependendo do tipo e da intensidade do estresse, diferentes efeitos podem ser observados no sistema imune. O estresse do tipo agudo pode aumentar, enquanto o estresse crônico pode suprimir a imunidade (revisado por Moynihan & Stevens, 2001). Para isso, faz-se necessário estabelecer as diferenças entre o estresse agudo e crônico. De acordo com Moynihan & Stevens (2001), o estresse agudo envolveria apenas uma única exposição ao estressor enquanto que o estresse crônico se refere a múltiplas sessões do estressor por um período de tempo maior, como dias ou semanas (Dhabhar, 2000; Moynihan & Stevens, 2001).

Há hipóteses defendendo que o estresse agudo seja capaz de aumentar a atividade do sistema imune enquanto que o estresse crônico seria imunossupressor. Segundo Dhabhar, 2000, esse aumento da atividade imunológica pode estar relacionado a uma resposta preparatória do organismo para possíveis desafios imunológicos (Dhabhar, 2000). Também já foi descrito que esse efeito do estresse agudo pode afetar imunidade inata. Foi detectado um aumento da função de macrófagos e monócitos, da fagocitose, produção de óxido nítrico (NO) e IL-6, em animais estressados de maneira aguda por calor excessivo ou eletro-choque. Já o estresse agudo por contenção pode suprimir a resposta imune (Moynihan & Stevens, 2001). Outro dado observado foi um aumento na reação de hipersensibilidade tardia e na produção de anticorpos específicos para antígenos externos durante o estresse agudo (Persoons *et al*, 1995; Yin *et al*, 2000; Fukui *et al*, 1997).

Segundo Bauer e colaboradores (2001), o estresse por contenção, tanto agudo quanto crônico, apresenta efeitos diferentes. Durante o estresse agudo, ocorre uma maior produção de corticosterona em ratos Sprague Dawley, quando comparados com o estresse crônico. Foi observado também que, durante o estresse agudo, há um aumento da capacidade proliferativa de células T do baço, embora os leucócitos sanguíneos apresentem uma redução na proliferação frente a antígenos. Os mesmos resultados não foram encontrados durante o estresse crônico (Bauer *et al*, 2001).

O estresse crônico de contenção induz uma diminuição no número de linfócitos do baço, possivelmente pelo aumento na expressão do receptor CD95, que induz ativação da cascata de caspases e nucleases resultando em morte celular por apoptose. O bloqueio do ligante do CD95, ou a eliminação do gene para esse receptor em camundongos, inibe essa redução de linfócitos (Yin *et al*, 2000). Esse tipo de estresse

também causa uma diminuição na produção de IL-2, com conseqüente redução da capacidade proliferativa de linfócitos (Bauer *et al*, 1999).

Segundo Iwakabe e colaboradores (1998), o estresse por contenção em camundongos, assim como vários tipos de estresses, é capaz de diminuir a atividade de células NK, provocar uma redução na produção de IFN- $\gamma$  pelos esplenócitos, enquanto que a produção de IL-4 não é afetada. Esses efeitos são paralelos à liberação de corticosterona sérica. Uma vez interrompido o estresse, há uma recuperação da atividade das células NK e diminuição desse hormônio no soro. Dessa maneira, o estresse por contenção também induz uma des-regulação do balanço de produção de citocinas por linfócitos T CD4+ pela polarização para o tipo Th2 (Iwakabe *et al*, 1998).

Estudos mostram que o estresse está associado a um aumento do estresse oxidativo, baixa atividade da telomerase e encurtamento dos telômeros; fenômenos que são conhecidos para se determinar a longevidade e a senescência celular. Segundo Epel e colaboradores (2004), mulheres que sofrem de altos índices de estresse apresentam telômeros mais curtos, equivalente à pelo menos 10 anos de envelhecimento, quando comparadas com mulheres com baixos índices de estresse (Epel *et al*, 2004). Esses dados sugerem que o estresse pode ser capaz de acelerar os efeitos do envelhecimento. Segundo Toussaint e colaboradores (2002<sup>a</sup> e 2002<sup>b</sup>), vários tipos celulares, quando expostos *in vitro* a agentes estressores, mostram sinais de um envelhecimento prematuro (Toussaint *et al*, 2002<sup>a</sup> e 2002<sup>b</sup>).

A partir desses dados, e ainda outros descritos na literatura, podemos observar que o estresse acarreta diversas alterações imunológicas e que algumas se mostraram semelhantes a encontradas durante a senescência. Com isso, nesse estudo, nosso objetivo será estudar em maior detalhe os efeitos decorrentes de ambos os processos, analisando parâmetros imunológicos e morfológicos.

## **2. OBJETIVOS**

## 2.1 - Objetivos Gerais

Comparar as mudanças imunológicas e morfológicas relacionadas ao envelhecimento e aquelas desencadeadas pelo estresse crônico de contenção em camundongos BALB/c.

## 2.2 - Objetivos específicos:

1. Comparar, em camundongos machos BALB/c senis (52 semanas de idade) e jovens (9 semanas) submetidos ao estresse crônico de contenção, os seguintes parâmetros:

- Morfologia do timo e intestino
- Peso e celularidade do timo
- Níveis séricos de cortisol e DHEA.
- Contagem total e diferencial de leucócitos do sangue
- Características fenotípicas das subpopulações de linfócitos T CD4 e CD8, linfócitos B convencionais e B1 isolados do baço, sangue e linfonodos mesentéricos.
- Medir os níveis de imunoglobulinas séricas (Ig total, IgM, IgG, IgE e IgA) e de IgA secretória presente nas fezes.
- Medir a produção de citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, IFN- $\gamma$ , IL-10 e TNF- $\alpha$ ) no sobrenadante de cultura de células isoladas de baço estimuladas *in vitro* com Concanavalina A e com anticorpos monoclonais anti-CD3 e anti-CD28.
- Medir os níveis plasmáticos da citocina IL-6

2. Comparar os efeitos imunológicos do estresse crônico em camundongos adrenalectomizados e normais.

### **3. ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL**

### **3.1 - Animais**

Foram utilizados, nesse trabalho, camundongos machos BALB/c com 9 semanas (jovens) e 52 semanas de idade (idosos), fornecidos pelo Biotério Central (CEBIO) e mantidos no biotério do Laboratório de Imunobiologia do ICB-UFMG. Antes de serem disponibilizados para o uso, os camundongos passaram por um período de quarentena (total de 14 dias) no biotério e foram previamente tratados contra vermes e sarna, através de ingestão de 1 mg/mL de Albendazol diluído em água e através de imersão rápida em uma solução de Ectomosol 0,005%, respectivamente. O modelo experimental de indução de estresse foi submetido pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (Anexo 1).

### **3.2 - Indução de estresse de contenção**

Para a indução do estresse crônico de contenção, os animais ficaram imobilizados, dentro de um tubo tipo Falcon de 50 mL com orifícios para passagem de ar, por 2 horas, durante 5 dias consecutivos. Foi estabelecido um horário, entre 10 as 12 horas, em que os animais eram submetidos ao estresse de contenção. Durante a aplicação do estresse, os animais do grupo controle ficaram privados de água e ração pelo mesmo intervalo de tempo. Para impedir a interferência de outros agentes estressores durante a indução do estresse, os animais foram mantidos em um ambiente controlado, com temperatura entre 20° a 25°C, mantendo um ciclo de claro/escuro de 12 horas de luz por dia, e baixa sonoridade. Após 24 horas da última sessão de estresse, era feito o sacrifício dos animais. Como a concentração sanguínea dos hormônios adrenocorticais variam ao longo do dia, apresentando picos nas horas iniciais do dia, a coleta de sangue e o sacrifício eram realizados entre 10-12 horas da manhã.

### ***3.3 - Obtenção dos soros***

Os animais foram previamente anestesiados utilizando 200µL de solução de Cloridrato de ketamina e Xilazina. Em seguida, o sangue foi coletado através de uma incisão na veia axilar e coletado em tubos cônicos de 1.5 ml. Os soros foram obtidos após coagulação por centrifugação a 2500 rpm e estocados a -20°C para posteriores análises.

### ***3.4 - Extração do muco intestinal***

Foi utilizada, para a coleta do muco intestinal, a técnica descrita por Menezes (Menezes, 2001): O intestino delgado dos camundongos foi retirado e repartido em duas metades. Cada porção foi lavada com 5 mL de PBS pH 7,8 gelado, utilizando uma agulha (22G) e uma seringa de 5 mL introduzida no interior do órgão. Em seguida, o muco foi coletado em tubos tipo Falcon, homogenizado e centrifugado a 2000 rpm, a 4°C, por 30 minutos. Foi retirado 1 mL do sobrenadante e armazenados em tubos cônicos de 1.5 ml a -20°C, para medida de IgA secretória por ELISA.

### ***3.5 - Análise do peso e celularidade do Timo***

O timo foi retirado cirurgicamente e pesado utilizando uma balança analítica. Em seguida, o órgão foi macerado com êmbolo e a suspensão de células foi colocada em meio RPMI 1640. As mesmas foram centrifugadas a 1200rpm por 5 minutos. Em seguida, as células foram ressuspensas em meio completo e fez-se a contagem das células viáveis utilizando o corante eritrocina, que cora células mortas. Após a contagem na Câmara de Neubauer, o número de células é expresso de acordo com a fórmula:  $n^\circ \text{ de células/ml} = (\text{células viáveis} \times \text{diluição} \times 10^4) / n^\circ \text{ campos contados na Câmara de Neubauer}$ .

### **3.6 - Análise Histológica**

Os órgãos foram fixados em formol tamponado 10% por 24 horas e, em seguida, são transferidos para álcool 70%. Os órgãos foram desidratados em diferentes concentrações de álcoois, diafanizados em xilol, incluídos em parafina, de onde são obtidos cortes de 5µm. As lâminas são coradas pelo método da hematoxilina-eosina (HE), segundo o protocolo estabelecido pelo laboratório Biologia do Sistema Linfóide e da Regeneração.

No caso do intestino delgado, este foi retirado e colocado em PBS pH 7,8 gelado. O conteúdo intestinal foi lavado com PBS gelado e o intestino cortado em 2 partes (a primeira porção contém duodeno e jejuno proximal e a segunda, jejuno distal e íleo). Estes foram abertos e enrolados, como um “rocambolé”. Em seguida, foram fixados e mantidos 24h em formol e, posteriormente, em álcool 70%.

### **3.7 - Avaliação dos níveis séricos de cortisol e DHEA**

Os níveis séricos de cortisol e DHEA foram dosados através do método de ELISA indireta, de acordo com o protocolo dos kits *Active Cortisol (Saliva) EIA* e *Active DHEA (Saliva) EIA*, respectivamente (ambos da Diagnostic Systems Laboratories, Inc.).

#### **3.7.1 - Active Cortisol (Saliva) EIA**

- Preparar a Solução Conjugada Enzimática diluindo-se com o Diluente de Conjugado
- Pipetar 25 µL dos Padrões, Controles e Amostras nas cavidades
- Adicionar 100 µl da Solução Conjugado Enzimático em cada cavidade, agitando gentilmente por 5-10 segundos
- Adicionar 100 µl do Anti-soro Cortisol em cada cavidade, agitando gentilmente por 5-10 segundos
- Incubar as cavidades, agitando no agitador orbital de microplacas ajustado de 500-700 rpm por 45 minutos a temperatura ambiente

- Aspirar e lavar cada cavidade 5 vezes com a solução de lavagem e secar por inversão em material absorvente
- Adicionar 100 µl de Solução Cromógena TMB a cada cavidade e incubar a temperatura ambiente por 15-30 minutos em agitador ajustado a 500-700 rpm
- Adicionar 100 µl da Solução de Interrupção em cada cavidade e agitar a placa com as mãos por 5-10 segundos
- Ler a absorbância da solução contida nas cavidades dentro de 30 minutos, usando um leitor de microplacas ajustado para 450 nm

### 3.7.2 - *Active DHEA (Saliva) EIA*

- Preparar a Solução Conjugada Enzimática diluindo-se com o Diluente de Conjugado
- Pipetar 100 µL dos Padrões, Controles e Amostras nas cavidades
- Adicionar 50 µl da Solução Conjugado Enzimático em cada cavidade, agitando gentilmente por 5-10 segundos
- Adicionar 100 µl do Anti-soro DHEA em cada cavidade, agitando gentilmente por 5-10 segundos
- Incubar as cavidades, agitando no agitador orbital de microplacas ajustado de 500-700 rpm por 1 hora a temperatura ambiente
- Aspirar e lavar cada cavidade 5 vezes com a solução de lavagem e secar por inversão em material absorvente
- Adicionar 100 µl de Solução Cromógena TMB a cada cavidade e incubar a temperatura ambiente por 15-30 minutos em agitador ajustado a 500-700 rpm
- Adicionar 100 µl da Solução de Interrupção em cada cavidade e agitar a placa com as mãos por 5-10 segundos
- Ler a absorbância da solução contida nas cavidades dentro de 30 minutos, usando um leitor de microplacas ajustado para 450 nm

### **3.8 - Contagem total e diferencial de leucócitos**

O sangue foi coletado utilizando 10 µL de EDTA por tubo. Para a contagem total de leucócitos, foi utilizado 10 µL do sangue não-coagulado diluído em 190 µL da solução de azul de metileno 0,025%. Em seguida as células foram contadas na Câmara de Neubauer e o número total de leucócitos foi obtido utilizando a fórmula: N° de leucócitos (mm<sup>3</sup>) = n° células contadas nos quatro campos x 50.

Para a contagem diferencial de leucócitos, foi retirado aproximadamente 20 µL do sangue não-coagulado e feito um esfregaço em lâminas de vidro e coradas com May-Grunwald e Giemsa. Depois, foi contado um total de 100 células em microscópio ótico com aumento total de 1000x, e a proporção de cada tipo de leucócito foi expresso em porcentagem.

### **3.9 - Medida de Imunoglobulinas séricas por ELISA**

Os anticorpos são detectados por ensaios imunoenzimáticos padrão, de acordo com a metodologia descrita por Menezes (Menezes, 2001), descrita a seguir:

Microplacas de poliestireno (NUNC, Roskilde, Denmark) são sensibilizadas com 100 µL/ poço com anticorpos policlonais de cabra anti-imunoglobulinas de camundongo (1:2000) (Southern Biotechnology Associate Inc.), diluídos em tampão carbonato pH 9,6 e mantidas *overnight* a 4°C. Após este período, as placas foram lavadas com salina contendo 0,05% Tween-20 (solução salina-Tween) (SIGMA Chemical Co.), e bloqueadas com 200 µL/ poço de 0,25% caseína diluída em PBS (PBS-caseína), por no mínimo, 1 hora a temperatura ambiente. As placas foram lavadas com salina-Tween e, em seguida, foram adicionados 100 µL/ poço dos soros diluídos 1:100 ou 1:1000 em diluições seriadas (fator 0.5) a partir de 1/2000 para Igs totais e IgG, e 1/200 para IgM e IgA sérica em PBS-caseína, e mantidas durante uma hora a 37°C. Para controle positivo padrão, foram utilizados anticorpos purificados de camundongos de cada isotipo (Southern Biotechnology Associate Inc.), além do controle negativo da própria placa sem adição de soro (branco). Em seguida, as placas foram lavadas com salina-Tween e incubadas com 100 µL/ poço da solução do anticorpo policlonais de cabra específicos para as cadeias  $\mu$ ,  $\gamma$ ,  $\alpha$  ou Ig total ligado à biotina (1:10000) (Southern Biotechnology Associate Inc.) durante uma hora a 37°C. Novamente

as placas foram lavadas com salina-Tween e incubadas com 100 µL/ poço de uma solução de streptavidina conjugada à peroxidase (1:5000) (Southern Biotechnology Associate Inc.) durante uma hora a 37°C. Mais uma vez as placas foram lavadas com salina-Tween e foram reveladas através da incubação com 100 µL/ poço do substrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + OPD) diluído em tampão citrato pH 5 durante 20 minutos, ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com 20 µL/ poço da solução de ácido sulfúrico 2N. Ao final, a reação foi detectada através de uma leitura no leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader), usando o filtro de 492 nm.

### **3.10 - Medida de IgA secretória total por ELISA**

Em resumo, microplacas de poliestireno (NUNC, Roskilde, Denmark) são sensibilizadas com 100µL/ poço com anticorpos policlonais de cabra anti-imunoglobulinas de camundongo (1:2000) (Southern Biotechnology Associate Inc.), diluídos em tampão carbonato pH 9,6 e mantidas *overnight* a 4°C. Após este período, as placas foram bloqueadas com 200 µL/ poço de PBS-caseína, por no mínimo, 1 hora a temperatura ambiente. Foi adicionado 100 µL/ poço do muco intestinal (1:20) diluídos em diluições seriadas (fator 0.5 - 1:200 a 1:12800) em PBS-caseína, e mantidas durante uma hora a 37°C. Para controle positivo padrão, foram utilizados anticorpos IgA purificados de camundongos (Southern Biotechnology Associate Inc.), além do controle negativo da própria placa sem adição de soro (branco). Em seguida, as placas foram incubadas com 100 µL/ poço da solução do anticorpo anti-IgA marcada com biotina (1:10000) (Southern Biotechnology Associate Inc.) durante uma hora a 37°C. As imunoglobulinas ligadas foram detectadas utilizando 100 µL/ poço de uma solução de streptavidina conjugada à peroxidase (1:5000) (Southern Biotechnology Associate Inc.) durante uma hora a 37°C. As placas foram reveladas através da adição de 100 µL/ poço do substrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + OPD) diluído em tampão citrato pH 5 durante 20 minutos, ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com 20 µL/poço da solução de ácido sulfúrico 2N. Ao final, a reação foi detectada através de uma leitura no leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader), usando o filtro de 492 nm.

### **3.11 - Medida de IgE sérica por ELISA**

Em resumo, microplacas de poliestireno (NUNC, Roskilde, Denmark) são sensibilizadas com 50 µL/ poço com anticorpos de cabra anti-IgE totais de camundongo (1:250) (Southern Biotechnology Associate Inc.), diluídos em tampão carbonato pH 9,6 e mantidas *overnight* a 4°C. Após este período, as placas foram bloqueadas com 200 µL/ poço de PBS-caseína, por no mínimo, 1 hora a temperatura ambiente. Foram adicionados 50 µL/ poço do soro total e mantidas durante uma hora a 37°C. Para controle positivo padrão, foram utilizados anticorpos IgE purificados de camundongos (Southern Biotechnology Associate Inc.), além do controle negativo da própria placa sem adição de soro (branco). Em seguida, as imunoglobulinas ligadas foram detectadas utilizando 50 µL/ poço da solução do anticorpo anti-IgE marcada com biotina (1:500) (Southern Biotechnology Associate Inc.) durante uma hora a 37°C. As placas foram incubadas com 50 µL/ poço de uma solução de streptavidina conjugada à peroxidase (1:5000) (Southern Biotechnology Associate Inc.) durante uma hora a 37°C. Para revelação, foi adicionado 100 µL/ poço do substrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + OPD) diluído em tampão citrato pH 5 durante 20 minutos, ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com 20 µL/ poço da solução de ácido sulfúrico 2N. Ao final, a reação foi detectada através de uma leitura no leitor de ELISA automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader), usando o filtro de 492 nm.

### **3.12 - Preparação de suspensão das células linfóides**

#### *3.12.1 - Meio de cultura*

Foi utilizado meio RPMI 1640 como meio incompleto e, como meio de cultura, RPMI 1640 enriquecido com 2 nM de L-glutamina, 50 mM de 2-mercapto-etanol, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de fungizona, 1mM de piruvato de sódio, 0,1 mM de aminoácidos não-essenciais, 25 mM de HEPES e 5-10% de soro fetal bovino inativado.

#### *3.12.2 - Preparação de suspensões celulares*

As suspensões de células do baço e linfonodo mesentérico (LnM) foram preparadas de acordo com a seguinte técnica, padronizada em nosso laboratório:

- retirar os órgãos e mantê-los em meio incompleto;
- o baço foi colocado em um macerador de vidro e pressionado em meio incompleto. No caso do timo e LnM, foram macerados utilizando as extremidades ásperas de lâminas de vidro;
- transferir a suspensão de células para um tubo de 10 mL;
- centrifugar a 1200 rpm, por 10 minutos, a 4°C;
- desprezar o sobrenadante e ressuspender as células em meio completo e contar as células viáveis;

Obs: no caso do baço, desprezar o sobrenadante e acrescentar 9 mL de água destilada para lisar as hemácias, e imediatamente depois, adicionar 1 mL de PBS 10X concentrado. Centrifugar novamente a 1200 rpm, por 10 minutos, a 4°C. Ressuspender as células em meio completo e contar as células viáveis.

### *3.12.3 - Contagem das células viáveis*

Para a contagem das células viáveis, foi utilizado o corante eritrocina. Misturar 50 µl da suspensão celular em volume igual de eritrocina e colocar na Câmara de Neubauer. Após a contagem das células não-coradas (viáveis), o número de células é expresso de acordo com a fórmula:  $n^{\circ}$  de células / ml = (células viáveis x diluição x  $10^4$ )/ $n^{\circ}$  campos contados na Câmara de Neubauer.

### *3.14 - Cultura de células e coleta do sobrenadante da cultura*

Foi colocado 125 µl/ poço da suspensão de células, com concentração igual a  $5 \times 10^6 - 1 \times 10^7$  células/ mL em uma placa de 96 poços. Foram adicionados 125 µl/ poço da solução do mitógeno Concanavalina A (Con A) (SIGMA) ou de uma solução de anticorpos anti-CD3 e anti-CD28 (BD Pharmingen), para estimulação inespecífica do sistema imune *in vitro*. Para controle negativo de ativação, foi adicionado 125 µl/ poço de meio completo. As células foram mantidas em cultura em uma estufa umidificada com uma atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Após 24h e 72h, foi coletado 200 µl de sobrenadante para dosagem de citocinas.

### **3.15 - Medida de citocinas do sobrenadantes da cultura celular ou plasmática por ELISA**

As placas foram sensibilizadas com 100 µl/ poço de anticorpos monoclonais (BD Pharmingen) reativos contra IL-2, IFN-γ, IL-4, IL-6, IL-10 e TNF-α, 1 µg/ mL, diluídos em tampão carbonato pH 9,6 e mantidas *overnight* a 4°C. Em seguida, foram adicionados os sobrenadantes coletados após 24 horas de cultura para medida de IL-2 e TNF-α, e após 72 horas para a dosagem das demais citocinas, ou amostras do plasma. As placas foram incubadas *overnight* a 4°C. As citocinas ligadas foram detectadas utilizando 100 µl/ poço de anticorpos monoclonais (BD Pharmingen) específicos para IL-2, IFN-γ, IL-4, IL-6, IL-10, TNF-α e TGF-β de camundongo, 0,5 µg/ mL marcados com biotina, por 1 hora a temperatura ambiente. Uma solução adicional de detecção contendo estreptavidina conjugada a peroxidase (100 µl/ poço) (Southern Biotechnology Associate Inc.), em uma diluição de 1/10000, foi adicionada e incubada por 1 hora a temperatura ambiente. As placas foram reveladas através da incubação com 100 µl/ poço do substrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + OPD) diluído em tampão citrato pH 5 durante 20 minutos, ao abrigo da luz. A reação foi interrompida pela adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (20 µl/poço) e lida no leitor de *ELISA* automático (Bio-Rad Model 450 Microplate Reader), usando o filtro de 492 nm.

### **3.16 - Adrenalectomia**

A técnica da adrenalectomia foi padronizada pela estudante, conforme descrita a seguir:

Os animais foram anestesiados com 50-100 µL de anestésico veterinário e, no primeiro dia, era retirado apenas uma das glândulas adrenais por procedimento cirúrgico. Em seguida, fazia-se a sutura com um fio de poliamida (nylon) (Ultralon 5-0, Biosut). Depois de 2 dias, era feita uma nova cirurgia para se retirar a glândula adrenal restante e realizava o mesmo procedimento pós-cirúrgico. Os experimentos só foram iniciados depois do período de recuperação dos animais, em média uma semana após a cirurgia.

### **3.17 - Análise fenotípica das células por citometria de fluxo**

Para a marcação fenotípica de leucócitos por citometria de fluxo, foi utilizada a metodologia descrita segundo Andrade (2003).

#### *3.17.1 - Marcação fenotípica dos leucócitos periféricos do sangue*

O sangue foi coletado utilizando 10 µL de EDTA por tubo. Foi adicionado em um tubo 10 µL de uma solução de diferentes anticorpos monoclonais anti-marcadores fenotípicos conjugados com FITC (isocianato de fluoresceína), CyChrome ou PE (ficoeritrina) (BD Pharmingen) diluídos em PBS-W. Foi retirado 50 µL do sangue não-coagulado e colocados em cada um dos tubos contendo diferentes anticorpos. Após a homogeneização, os tubos foram incubados a 4°C, por 30 minutos ao abrigo da luz. Para a lise das hemácias, foi adicionado 1 mL da solução de Billing, deixando reagir por 45 segundos. A reação foi interrompida acrescentando 2 mL de PBS. As células foram centrifugadas por 10 minutos a 1200 rpm a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado por inversão rápida, lavado com PBS e centrifugado novamente por 10 minutos a 1200 rpm a 4°C, repetindo esse processo duas vezes. Ao final, os leucócitos foram ressuspensos em 200 µL de solução fixadora MacFacsFix, para em seguida fazer a leitura no citômetro.

#### *3.17.2 - Marcação fenotípica dos leucócitos de órgãos linfóides*

Depois de isoladas do baço e LnM, as células foram ressuspensas em PBS pH 7,2 contendo 0,2% de soro fetal bovino e 0,1% de azida sódica, a uma concentração de  $2 \times 10^7$  células /mL. Foram colocado 25 µl da suspensão celular em uma placa com fundo em U e incubadas por 30 minutos, a 4° C, com 10 µl de solução dos anticorpos monoclonais anti-marcadores fenotípicos conjugados com FITC, CyChrome ou PE diluídos em PBS-W. Após esse período, centrifugar as placas por 10 minutos a 1200 rpm a 4° C, desprezar o sobrenadante por inversão rápida e, em seguida, lavadas com PBS-azida por duas vezes. Ao final, os leucócitos foram ressuspensos em 200 µL de solução fixadora MacFacsFix, para em seguida fazer a leitura no citômetro.

### *3.17.3 - Tipos de marcadores fenotípicos celulares*

Para a obtenção de dados qualitativos sobre os fenótipos apresentados pelos linfócitos do sangue, baço e LnM, foram utilizados a seguinte combinação de anticorpos anti-moléculas de superfície de camundongos:

CD3 CyChrome / CD4 FITC / CD8 PE – subpopulações de linfócitos T

CD3 CyChrome / CD4 FITC / CD25 PE – células T ativadas

CD3 CyChrome / CD4 ou CD8 FITC / CD62L PE – células T virgens ou ativadas

CD3 CyChrome / CD4 ou CD8 FITC / CD69 PE – células T ativadas

CD3 CyChrome / CD4 ou CD8 FITC / CD45RB PE – células T virgens ou ativadas

CD3 CyChrome / CD4 ou CD8 FITC / CD28 PE – células T virgens ou ativadas

CD19 PE / CD5 FITC – subpopulação de linfócitos B e B1

CD19 FITC / CD21 PE – células B ativadas

Em todos os órgãos, foram utilizados os anticorpos IgG2a FITC e IgG2b PE para o controle negativo, consistindo de células incubadas com imunoglobulinas do mesmo isotipo usado no anticorpo marcado.

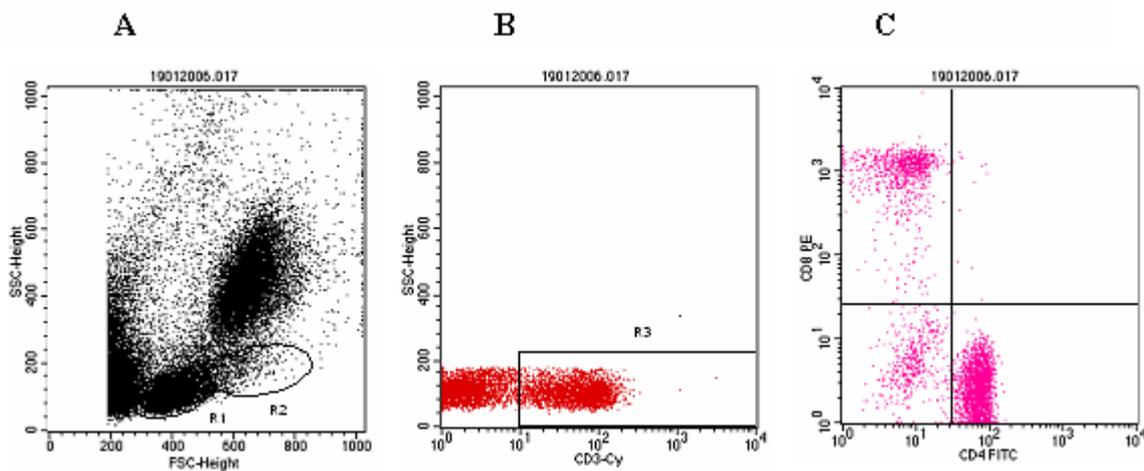
### ***3.18 - Obtenção dos dados no citômetro de fluxo e análise dos resultados***

A análise de citometria de fluxo de três cores foi feita usando um FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, California). A porcentagem de células positivas foi analisada através do *software Cell Quest* em comparação ao controle negativo. Durante a aquisição, foram coletados 30.000 eventos para análise. A identificação das populações celulares de interesse, bem como a determinação do valor percentual de populações e sub-populações celulares, foi realizada através de um sistema computacional acoplado ao citômetro.

#### *3.18.1 - Estratégia de análise*

Os dados obtidos foram analisados de acordo com Speziali (2004) e Speziali, *et al* (2004). A figura 1 mostra, de maneira esquemática, a seqüência de procedimentos necessários para a análise dos dados do fenótipo celular. O primeiro passo consiste na identificação de populações de leucócitos em estudo: os linfócitos. Na figura 1a temos um gráfico do tipo pontual (*dot plot*) onde se pode avaliar o tamanho celular (FSC) e a

granulosidade (SSC). Após a seleção da região de interesse, a mesma é analisada utilizando-se a intensidade de fluorescência apresentada pelas células presentes na região selecionada, em gráficos de fluorescência 3 (FL3 – fluorescência roxa obtida pela marcação com CyChrome) versus SSC (Figura 1b). Seleciona-se a população de células positivas para FL3, e feita a análise em gráficos de fluorescência FL1 (FL1 – fluorescência verde obtida pela marcação com FITC) versus fluorescência 2 (FL2 – fluorescência laranja obtida pela marcação com PE) (Figura 1c).



**Figura 1: Análise de leucócitos do sangue periférico por citometria de fluxo.**

A figura 2a representa um perfil celular de tamanho e granulosidade (FSC vs SSC), onde foi selecionada a região R1 correspondente à população de linfócitos. A figura 2b representa um perfil celular obtido em gráfico de FL3 (CD3-CyChrome) versus granulosidade, em que foi selecionado a população de células CD3 positivas (região R3), dentro da região R1. A figura 2c representa um perfil celular obtido em gráfico de FL1 (CD4-FITC) versus FL2 (CD8-PE), selecionada a partir das regiões R1 e R3.

### 3.19 - Análise estatística

Foi utilizado o *software* “Minitab® Release 14 Statistical Software” para análise da distribuição normal dos dados, e utilizado o *software* “GraphPad Prism® 4” para análise de variância (ANOVA) para testar a hipótese de que os valores médios entre os grupos experimentais são diferentes, com significância  $p < 0,05$ ,

### **3.20 - Soluções utilizadas**

#### *3.20.1 - Soluções usadas no teste de ELISA*

Tampão Carbonato pH 9,6

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,015M

NaHCO<sub>3</sub> 0,035M

Tampão Fosfato (PBS) pH 7,2

NaCl 0,0015M

KCl 0,0081M

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O 0,1369M

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,0027M

PBS-caseína

Tampão fosfato pH 7,2

Caseína 25%

Salina fisiológica

NaCl 0,85%

Salina-Tween

Salina fisiológica 0,85%

Tween 20 0,05%

Tampão Citrato pH 5

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,2M

Ácido cítrico (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>) 0,1M

Solução de ácido sulfúrico

H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N

Solução do substrato (por placa)

OPD: 4 mg

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 2 µl

Tampão citrato pH 5: 10 mL

#### *3.20.2 - Soluções usadas na marcação fenotípica de linfócitos*

PBS-azida

Tampão fosfato pH 7,2

Azida sódica 0,01%

PBS-W

Tampão fosfato pH 7,2

BSA (albumina sérica bovina) 5%

Mac Facs Fix

NaCl: 0,15M

Cacodilato de sódio

Paraformaldeído 1%

Solução de Billing pH 7,85

Citrato de sódio

Formaldeído 1%

Dietilenoglicol 3%

Heparina usp/mL (100.000)

### *3.20.3 -Soluções usadas na histologia*

Formol tamponado 10%

Fosfato de sódio monobásico

Fosfato de sódio dibásico

Formol

Solução May-Grunwald

Azul de metileno

Álcool metílico

Solução de Giemsa

Giemsa em pó

Glicerina

Álcool metílico

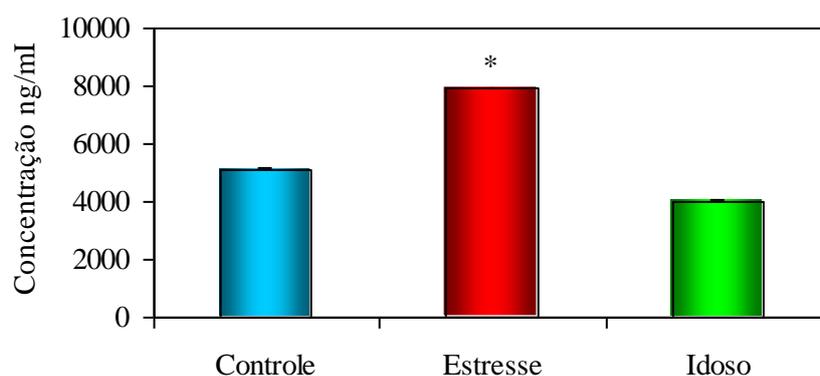
## **4. RESULTADOS**

#### ***4.1 - As alterações causadas no organismo pelo estresse crônico de contenção***

Para a indução do estresse de contenção, camundongos machos BALB/c jovens (9 semanas de idade) ficaram imobilizados dentro de tubos tipo Falcon de 50mL, por duas horas, durante 5 dias consecutivos. Logo nos primeiros dias de sessões de estresse, os animais apresentaram diarreia. Ao final, pode ser observada queda do pêlo na região torácica, efeito conhecido como alopecia.

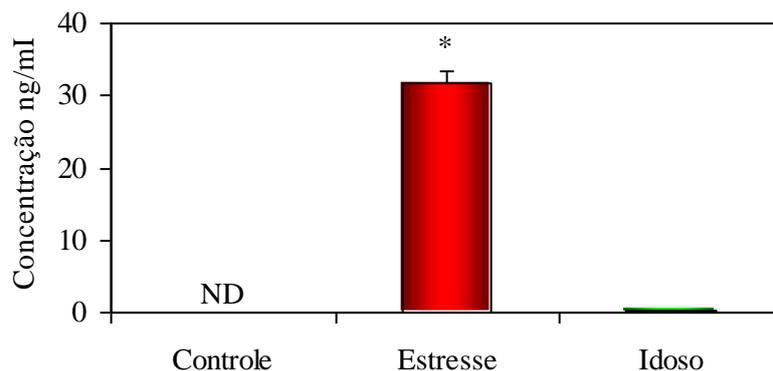
#### ***4.2 - Níveis plasmáticos de cortisol e DHEA nos animais submetidos ao estresse crônico***

Após as sessões de estresse, os animais foram sangrados, utilizando-se anti-coagulante, e foram coletados plasmas para medida dos hormônios cortisol e DHEA plasmáticos. De acordo com as figuras 2 e 3, os níveis desses hormônios estão significativamente aumentados durante o estresse crônico em relação aos animais controles e idosos, respectivamente.



**Figura 2: Medida de cortisol plasmático em camundongos BALB/c jovens, submetidos ao estresse crônico e em camundongos idosos.**

As barras representam a média dos valores obtidos em cada grupo (n=5), acompanhadas do desvio padrão. O asterisco indica uma diferença significativa entre os animais estressados e os demais grupos ( $p < 0,05$ ).



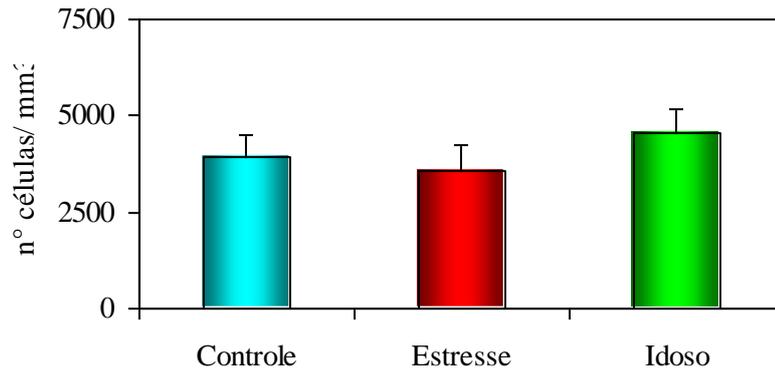
**Figura 3: Medida de DHEA plasmático em camundongos BALB/c jovens, submetidos ao estresse crônico e em camundongos idosos.**

As barras representam a média dos valores obtidos em cada grupo (n=5), acompanhadas do desvio padrão. O asterisco indica uma diferença significativa entre os animais estressados e os demais grupos ( $p < 0,05$ ). ND= não detectado.

#### ***4.3 - Contagem global e diferencial de leucócitos periféricos do sangue nos animais submetidos ao estresse crônico***

Para análise da distribuição de leucócitos periféricos do sangue, os animais foram sangrados no plexo axilar e o sangue coletado com anti-coagulante. Em seguida, foram retirados 10  $\mu$ l do sangue e feita a contagem de leucócitos em Câmara de Neubauer utilizando o corante azul de metileno 0,025%.

Podemos observar na figura 4 que tanto nos animais idosos quanto naqueles submetidos ao estresse físico de contenção, não houveram diferenças quanto ao número de leucócitos periféricos presentes no sangue, quando comparados com o grupo controle.



**Figura 4: Contagem de leucócitos periféricos do sangue dos camundongos BALB/c controle, estressados e em camundongos idosos.**

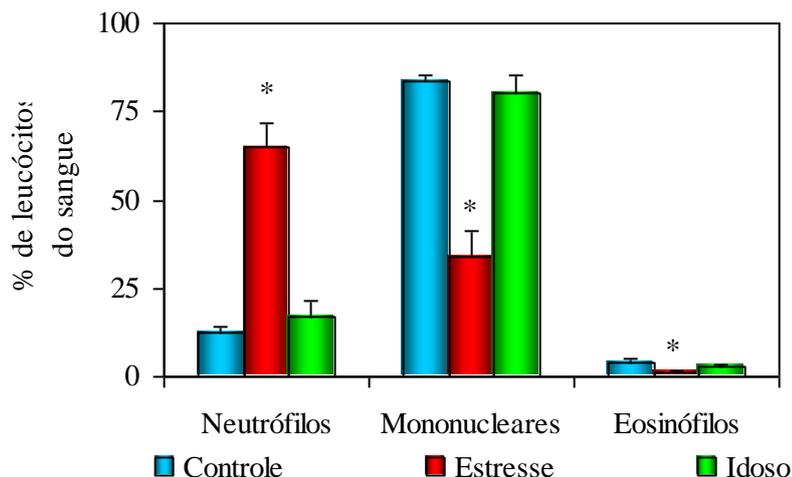
O número de células foi expresso utilizando a fórmula:  $n^\circ \text{ de células/mm}^3 = n^\circ \text{ células contadas nos quatro campos} \times 50$ . As barras representam a média dos valores obtidos em cada grupo ( $n=5$ ), acompanhadas do desvio padrão.

Porém, quando analisamos os tipos de leucócitos circulantes, há uma diferença entre os grupos.

Para a contagem diferencial de leucócitos, foram coletados 10  $\mu\text{l}$  do sangue não-coagulado e feito um esfregaço sanguíneo em lâminas de vidro. Foi feita a contagem de células em imersão, utilizando-se um microscópio ótico com objetiva de 100x. A quantidade dos diferentes tipos de leucócitos encontrados foi expressa em porcentagem.

De acordo com a figura 5, nos animais submetidos ao estresse crônico houve um aumento significativo no número de neutrófilos, cerca de 5 vezes maior, e uma grande diminuição de células mononucleares e eosinófilos, quando comparados com os grupos controle e idosos.

Não foram encontradas diferenças significativas na quantidade de neutrófilos nem de eosinófilos entre os grupos controle e idoso.

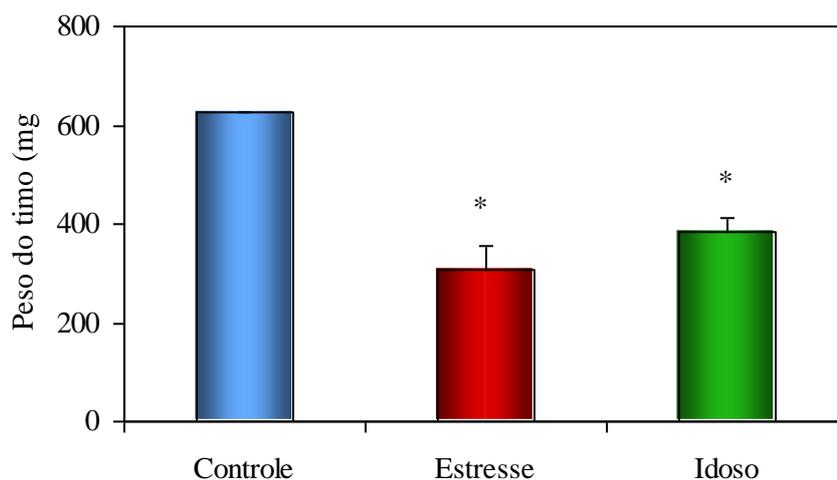


**Figura 5: Porcentagem de leucócitos periféricos do sangue em camundongos BALB/c controle, submetidos as estresse crônico e em camundongos idosos.**

A contagem diferencial foi realizada em um microscópio ótico, utilizando uma objetiva de aumento de 100x em óleo de imersão. Foi contado um total de 100 leucócitos e o resultado foi dado em porcentagem de cada tipo de leucócito encontrado. As barras representam a média dos valores obtidos em cada grupo (n=5), acompanhadas do desvio padrão. O asterisco indica uma diferença significativa entre os animais estressados e os demais grupos ( $p < 0,05$ ).

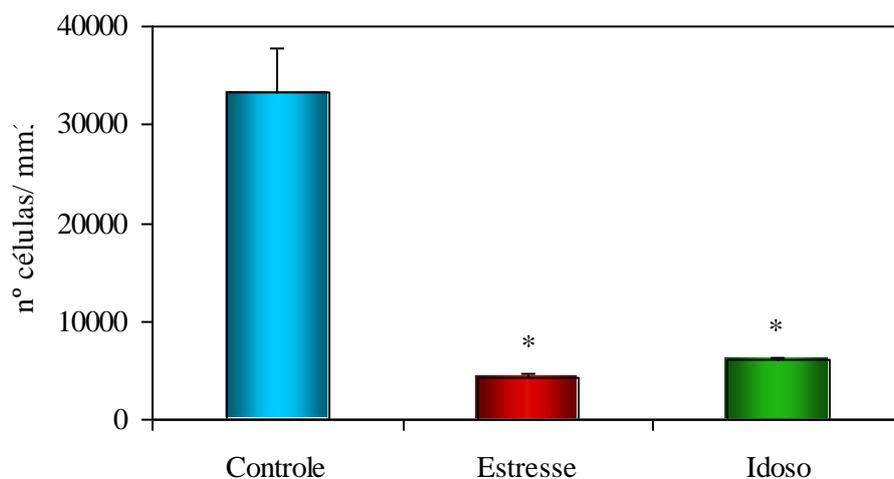
#### ***4.4 - Os efeitos do envelhecimento e do estresse crônico no timo***

A avaliação da involução tímica foi realizada através da medida do peso, da celularidade e da avaliação da histologia desse órgão. As figuras 6 e 7 mostram que há uma acentuada diminuição do peso, cerca de 50%, e da quantidade de células presentes nesse órgão, de mais de 4 vezes menos, nos animais idosos e aqueles submetidos ao estresse crônico, quando comparados com o grupo controle.



**Figura 6: Avaliação do peso do timo em animais jovens controles, submetidos ao estresse crônico e idosos.**

Camundongos BALB/c foram sacrificados e tiveram seus timos removidos e pesados em uma balança analítica. As barras representam a média dos valores obtidos em cada grupo (n=5), acompanhadas do desvio padrão. O asterisco indica uma diferença significativa entre os grupos estresse e idosos em relação aos animais controles ( $p < 0,05$ ).



**Figura 7: Avaliação da celularidade do timo em animais jovens controles, submetidos ao estresse crônico e idosos.**

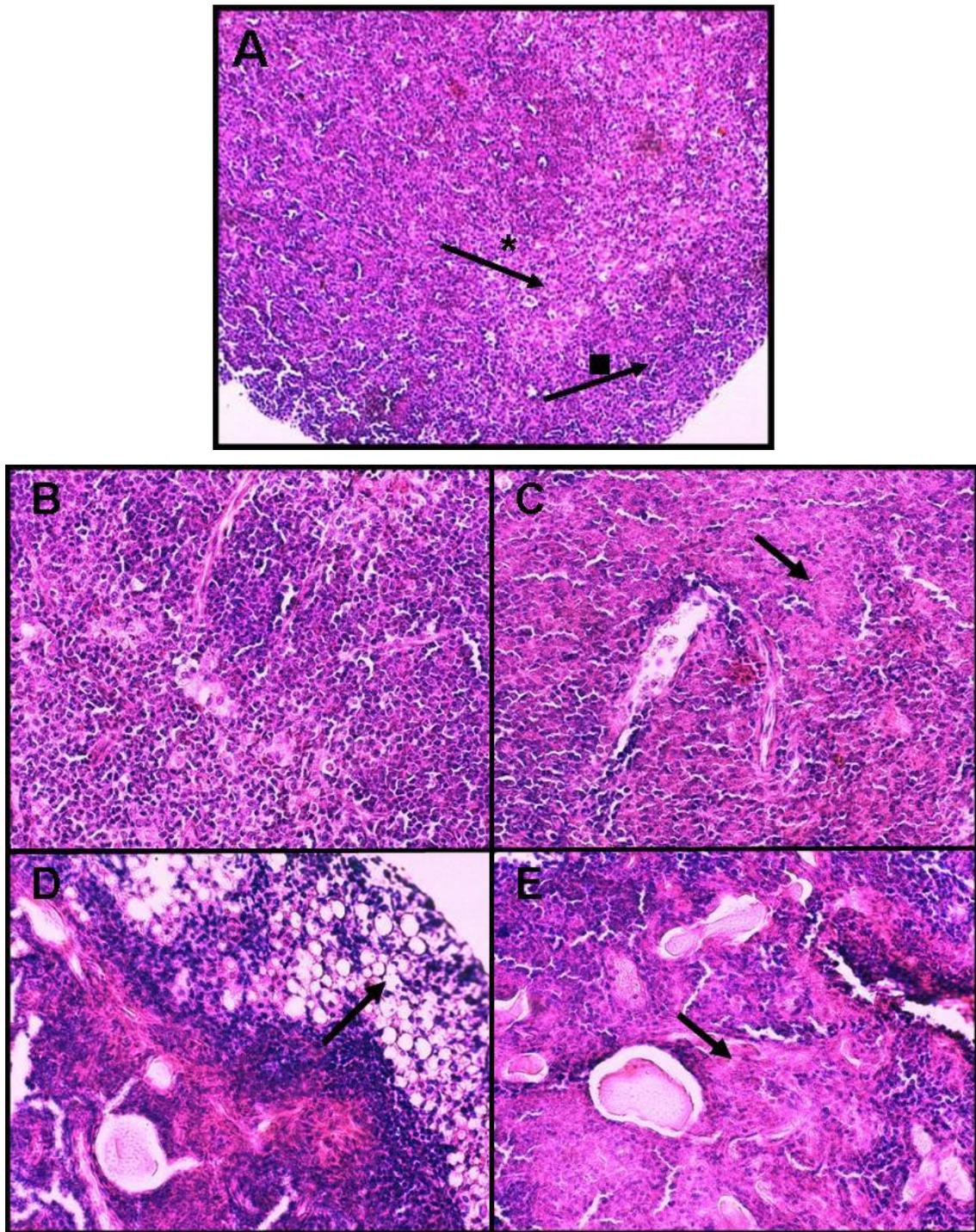
Camundongos BALB/c foram sacrificados e tiveram seus timos removidos. Em seguida o órgão foi macerado, as células ressuspendidas em meio de cultura e contadas em Câmara de Neubauer. As barras representam a média dos valores obtidos em cada grupo (n=5), acompanhadas do desvio padrão. O asterisco indica uma diferença significativa entre os grupos estresse e idosos em relação aos animais controles ( $p < 0,05$ ).

Para se obter maiores detalhes da sobre alterações morfológicas na estrutura tímica, o órgão foi coletado e processado para análise histológica. Após a montagem em lâminas, foi realizada a coloração, utilizando os corantes hematoxilina-eosina (HE).

A figura 8A representa um timo de camundongos jovens (controle), em que estão representados, pela seta com asterisco, a região cortical e, pela seta com quadrado, a região medular (aumento de 10x da objetiva). A figura 8B também caracteriza ambas as regiões tímicas dos animais jovens, porém em maior detalhe (aumento de 20x da objetiva).

Análises microscópicas do timo dos animais submetidos ao estresse crônico revelaram que há uma diminuição da celularidade em todo o órgão com uma mudança na arquitetura medular e grande deposição de tecido conjuntivo substituindo o tecido medular (figura 8C, indicado pela seta).

O timo dos animais idosos também sofreu uma drástica alteração morfológica. Além da redução celular, a figura 8D mostra que há uma substituição do tecido cortical por tecido adiposo (figura 8D, indicado pela seta). Na figura 8E, é possível observar que, assim como nos animais estressados, a região medular é preenchida por tecido conjuntivo, sugerindo o desenvolvimento de um processo fibrótico nesse compartimento (indicado pela seta).

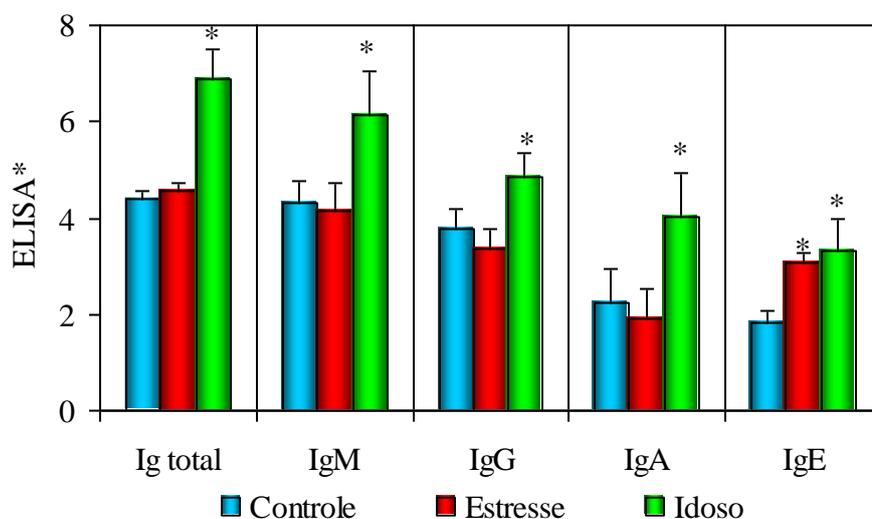


**Figura 8: Histologia do timo de animais jovens, controles, submetidos ao estresse crônico e idosos.** A e B: animais controles, C: animais submetidos ao estresse crônico e D e E: animais idosos. Os timos foram fixados com formol tamponado 10%, transferido para diferentes concentrações de álcoois e posteriormente incluídos em parafina e cortados em um micrótomo para montagem das lâminas. Foi utilizado o método de coloração hematoxilina-eosina (HE). As figuras foram analisadas no microscópio ótico, com uma objetiva de aumento de 20X. Na figura A, a seta com asterisco indica a região medular do timo e a seta com quadrado, a região cortical (aumento 10x). Na figura C, a seta indica o processo fibrótico presente na região medular. Na figura D, a seta indica o desenvolvimento de tecido adiposo junto à região cortical. Na figura E, a seta indica fibrose na região medular.

#### 4.5 - Medida de imunoglobulinas séricas totais, das classes IgM, IgG, IgA e IgE, e de IgA secretória em animais jovens normais ou submetidos ao estresse crônico de contenção e em animais idosos

Para a medida de imunoglobulinas do soro, os animais foram anestesiados e sangrados pelo plexo axilar para a coleta de sangue. Após a centrifugação, foi extraído o soro para posterior análise dos níveis de anticorpos séricos das amostras, realizado pelo teste de ELISA. Foram avaliados os níveis de imunoglobulinas totais (Ig total), bem como os isotipos IgG, IgM, IgA e IgE.

A figura 9 demonstra que, durante o envelhecimento, há um aumento significativo da produção de imunoglobulinas totais séricas e dos isotipos IgM, IgG, IgA e IgE em relação aos demais grupos. Já nos animais submetidos ao estresse crônico, foi observado apenas um aumento na produção de IgE sérica.

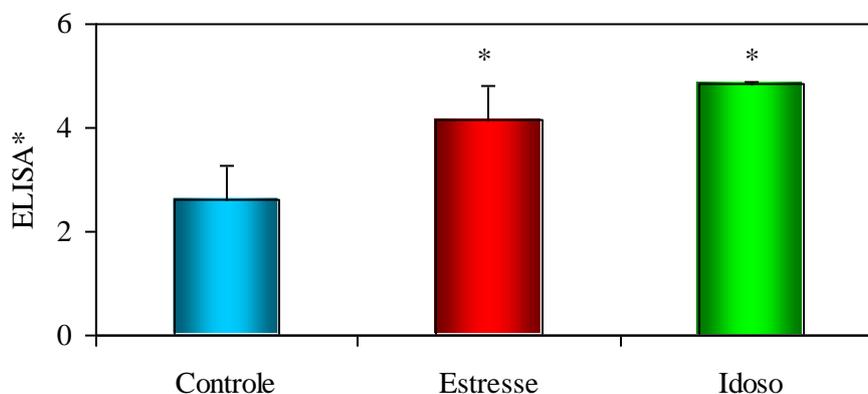


**Figura 9:** Níveis de imunoglobulinas séricas totais (Ig total) e das classes IgM, IgG, IgA e IgE.

Camundongos BALB/c controle, estressados e idosos foram sangrados no plexo axilar para posterior análise dos títulos de imunoglobulinas no soro. As barras representam a média da somatória da absorbância das diluições (ELISA\*) obtidas em cada grupo (n=5), acompanhadas do desvio padrão. O asterisco indica uma diferença significativa entre os animais idosos e os demais grupos; e entre os animais estressados (somente no caso de IgE sérica) e os grupos controle e idosos ( $p < 0,05$ ).

Para a medida dos níveis de IgA secretória (sIgA) presente no muco intestinal, os animais foram sacrificados e houve a retirada do intestino delgado. Em seguida, foi feito um lavado do conteúdo intestinal com PBS e, após a centrifugação, os sobrenadantes foram coletados para análise dos níveis de sIgA por ELISA.

A figura 10 ilustra que tanto no envelhecimento quanto no estresse crônico há um aumento da quantidade de sIgA no lúmen intestinal, comparado com o grupo controle.



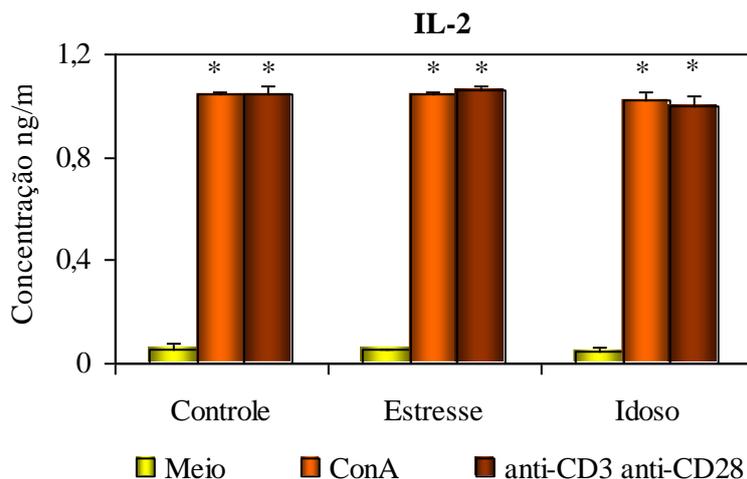
**Figura 10: Níveis de IgA secretória presente no muco intestinal.**

Camundongos BALB/c controle, estressados e idosos tiveram o muco intestinal extraído para posterior análise dos níveis de sIgA. As barras representam a média da somatória da absorbância das diluições (ELISA\*) obtidas em cada grupo (n=5), acompanhadas do desvio padrão. O asterisco indica uma diferença significativa entre os grupos estresse e idosos em relação aos animais controles ( $p < 0,05$ ).

#### ***4.6 - Produção de citocinas por células linfóides do baço em animais jovens normais ou submetidos ao estresse crônico de contenção e animais idosos***

Para a quantificação das citocinas produzidas durante o estresse crônico e o envelhecimento, as células do baço de camundongos controle, camundongos submetidos ao estresse crônico de contenção e em camundongos idosos foram mantidas em cultura em meio completo ou estimuladas com ativadores mitóticos Concanavalina A (Con A) ou anticorpos anti-CD3 e anti-CD28. Os sobrenadantes foram coletados 24 horas depois para dosagem de IL-2 e TNF- $\alpha$  ou após 72 horas, para as demais citocinas.

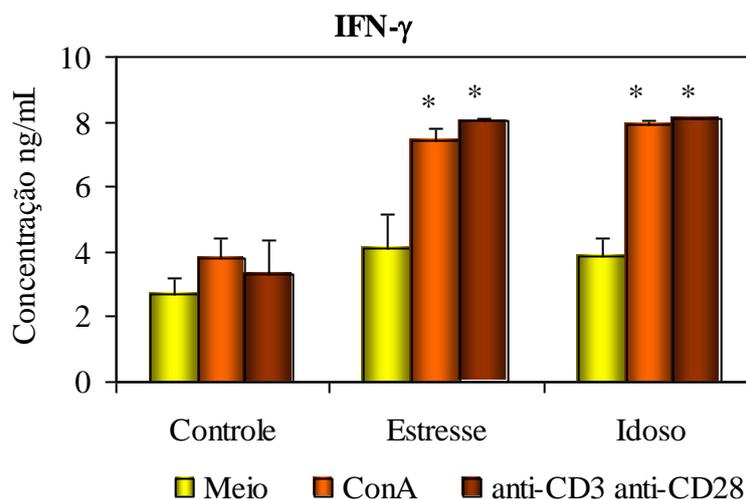
Em relação ao perfil de citocinas do tipo Th1, a figura 11 mostra que a produção de IL-2 aumenta quando as células são estimuladas com Con A ou com anti-CD3/ anti-CD28 em todos os grupos, sendo que a produção dessa citocina não se altera com a idade ou com o estresse.



**Figura 11: Produção de IL-2 por células do baço medidas no sobrenadante da cultura de esplenócitos.**

Células do baço de camundongos BALB/c de cada grupo foram cultivadas em meio RPMI completo contendo diferentes estímulos (Con A ou anti-CD3/anti-CD28) e o sobrenadante foi colhido após 24 horas e testados por ELISA para a presença de IL-2. As concentrações foram calculadas com base na curva padrão construída a partir da leitura da densidade ótica obtida para IL-2 recombinante. As barras representam a média da somatória das concentrações obtidas em cada grupo (n=5), acompanhadas do desvio padrão. O asterisco indica uma diferença significativa entre as células mantidas com meio e aquelas cultivadas com diferentes estímulos ( $p < 0,05$ ).

De acordo com a figura 12, a produção de IFN- $\gamma$  está elevada quando as células são estimuladas com Con A ou com anti-CD3/ anti-CD28, tanto no envelhecimento quanto durante o estresse crônico, em relação ao grupo controle.

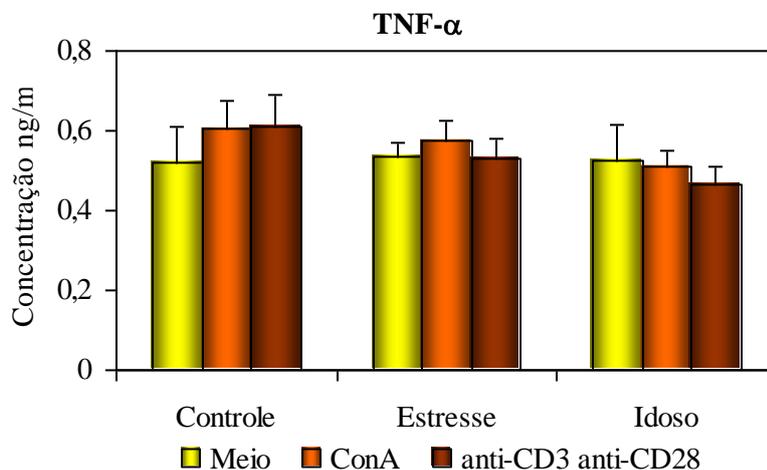


**Figura 12: Produção de IFN- $\gamma$  por células do baço medidas no sobrenadante da cultura de esplenócitos.**

Células do baço de camundongos BALB/c de cada grupo foram cultivadas em meio RPMI completo contendo diferentes estímulos (Con A ou anti-CD3/anti-CD28) e o sobrenadante foi colhido após 72 horas e testados por ELISA para a presença de IFN- $\gamma$ . As concentrações foram calculadas com base na curva padrão construída a partir da leitura da densidade ótica obtida para IFN- $\gamma$  recombinante. As barras representam a média da somatória das concentrações obtidas em cada grupo (n=5), acompanhadas do

desvio padrão. O asterisco indica uma diferença significativa entre os grupos estresse e idosos na presença de um estímulo em relação ao mesmo tratamento realizado nos animais controles ( $p < 0,05$ ).

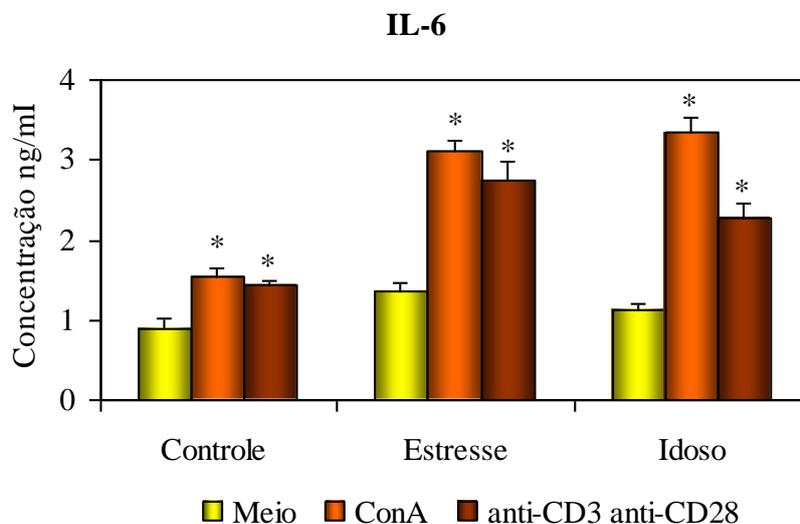
Já a produção de TNF- $\alpha$  apresenta-se inalterada, independente o tipo de estímulo, da idade ou do tipo de tratamento, como visto na figura 13.



**Figura 13: Produção de TNF- $\alpha$  por células do baço medidas no sobrenadante da cultura de esplenócitos.**

Células do baço de camundongos BALB/c de cada grupo foram cultivadas em meio RPMI completo contendo diferentes estímulos (Con A ou anti-CD3/anti-CD28) e o sobrenadante foi colhido após 24 horas e testado por ELISA para a presença de TNF- $\alpha$ . As concentrações foram calculadas com base na curva padrão construída a partir da leitura da densidade óptica obtida para TNF- $\alpha$  recombinante. As barras representam a média da somatória das concentrações obtidas em cada grupo ( $n=5$ ), acompanhadas do desvio padrão.

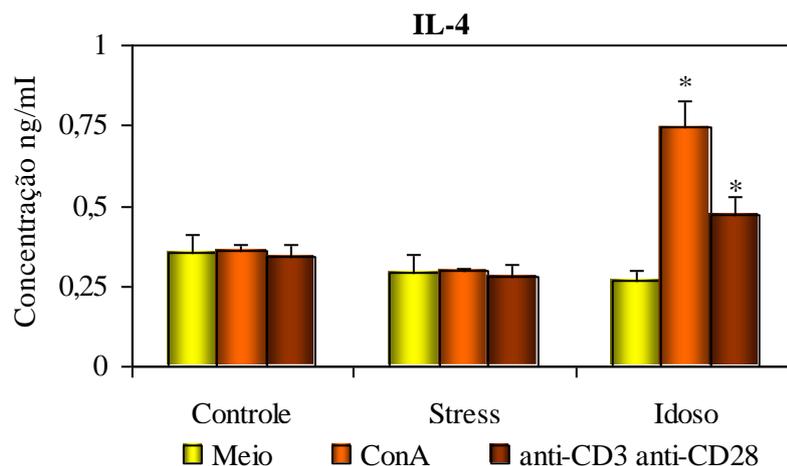
A figura 14 ilustra que os níveis de IL-6 secretados pelos esplenócitos *in vitro* são maiores quando os mesmos são estimulados com Con A ou com anti-CD3/ anti-CD28, em todos os grupos experimentais. Porém, nos animais estressados e nos idosos, a produção dessa citocina é mais elevada, quando submetidos ao mesmo tratamento.



**Figura 14: Produção de IL-6 por células do baço dosadas no sobrenadante da cultura de esplenócitos.**

Células do baço de camundongos BALB/c de cada grupo foram cultivadas em meio RPMI completo contendo diferentes estímulos (Con A ou anti-CD3/anti-CD28) e o sobrenadante foi colhido após 72 horas e testado por ELISA para a presença de IL-6. As concentrações foram calculadas com base na curva padrão construída a partir da leitura da densidade óptica obtida para IL-6 recombinante. As barras representam a média da somatória das concentrações obtidas em cada grupo (n=5), acompanhadas do desvio padrão. O asterisco indica uma diferença significativa tanto entre os grupos estresse e idosos em relação aos animais controles, quanto entre as células mantidas em meio ou com diferentes estímulos ( $p < 0,05$ ).

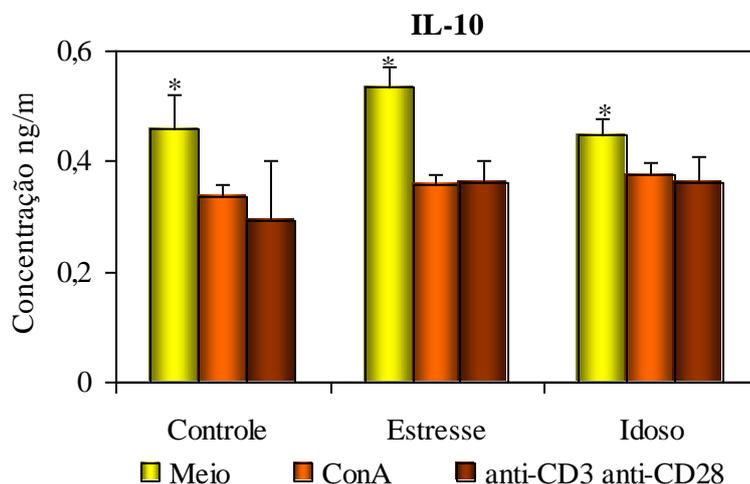
Em comparação às citocinas do perfil Th2, a produção de IL-4 é maior nos animais idosos, quando submetidos a um estímulo, do que nos demais grupos, que se mantêm inalterados (Figura 15).



**Figura 15: Produção de IL-4 por células do baço dosadas no sobrenadante da cultura de esplenócitos.**

Células do baço de camundongos BALB/c de cada grupo foram cultivadas em meio RPMI completo contendo diferentes estímulos (Con A ou anti-CD3/anti-CD28) e o sobrenadante foi colhido após 72 horas e testados por ELISA para a presença de IL-4. As concentrações foram calculadas com base na curva padrão construída a partir da leitura da densidade ótica obtida para IL-4 recombinante. As barras representam a média da somatória das concentrações obtidas em cada grupo (n=5), acompanhadas do desvio padrão. O asterisco indica uma diferença significativa entre os animais idosos frente um estímulo e os demais grupos submetidos ao mesmo tratamento ( $p < 0,05$ ).

A figura 16 mostra que a produção de IL-10 é menor após a estimulação, principalmente nos animais estressados, do que quando mantidas em meio completo, em todos os grupos experimentais.



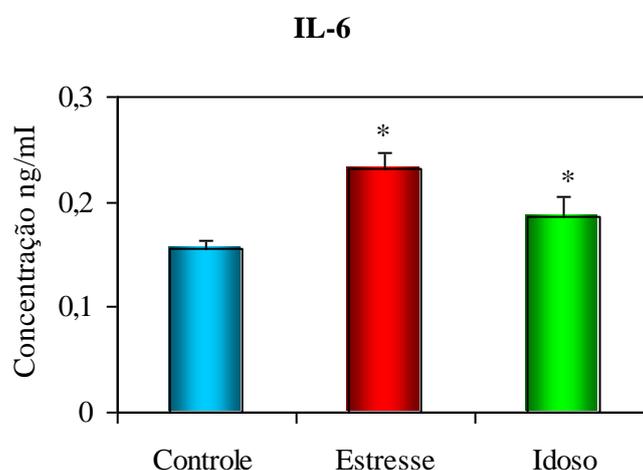
**Figura 16: Produção de IL-10 por células do baço dosadas no sobrenadante da cultura de esplenócitos.**

Células do baço de camundongos BALB/c de cada grupo foram cultivadas em meio RPMI completo contendo diferentes estímulos (Con A ou anti-CD3/anti-CD28) e o sobrenadante foi colhido após 72 horas e testados por ELISA para a presença de IL-10. As concentrações foram calculadas com base na curva padrão construída a partir da leitura da densidade ótica obtida para IL-10 recombinante. As barras representam a média da somatória das concentrações obtidas em cada grupo (n=5), acompanhadas do desvio padrão. O asterisco indica uma diferença significativa entre os esplenócitos mantidos em meio e estimulados ( $p < 0,05$ ).

#### 4.7 - Avaliação dos níveis plasmáticos de IL-6

Para a determinação da IL-6 plasmática, os animais foram sacrificados 24 horas após a última sessão de estresse e foram coletados o sangue com anticoagulante, centrifugado e retirado o plasma para quantificação dessa interleucina por ELISA.

Podemos notar na figura 17 que há um aumento dos níveis de IL-6 tanto nos animais idosos quanto nos submetidos ao estresse crônico, sendo que neste último são ainda maiores que os demais grupos.



**Figura 17: Medida de IL-6 plasmática dos animais jovens controles, submetidos ao estresse crônico e idosos.**

Camundongos BALB/c foram sacrificados, tiveram o plasma coletado e testados por ELISA para a presença de IL-6. As concentrações foram calculadas com base na curva padrão construída a partir da leitura da densidade óptica obtida para IL-6 recombinante. As barras representam a média da somatória das concentrações obtidas em cada grupo (n=5), acompanhadas do desvio padrão. O asterisco indica uma diferença significativa entre os grupos estresse e idosos comparados com os animais controles ( $p < 0,05$ ).

#### 4.8 - Característica do perfil fenotípico de linfócitos em animais jovens normais ou submetidos ao estresse crônico de contenção e idosos

Foi realizada análise dos marcadores fenotípicos de sub-populações de linfócitos em diferentes compartimentos linfóides: baço, linfonodo mesentérico (LnM) e sangue. Para isso, os animais foram sacrificados e tiveram os órgãos coletados. Estes posteriormente foram macerados e as células ressuspendidas em meio contendo PBS+

soro fetal bovino+ azida. Em seguida, as células foram incubadas com os anticorpos conjugados a um marcador fluorescente (isotiocianato de fluoresceína – FITC; ficoeritrina – PE; CyChrome – Cy) específicas para um tipo de molécula de superfície e fixadas em solução de paraformoldeído 1% e cacodilato de sódio para leitura no citômetro de fluxo.

A molécula de CD3 foi utilizada para detectar os linfócitos T. Apesar de participar do processo de transdução de sinal pelo receptor antigênico por estas células, é utilizada como um “marcador” específico, pois se encontra somente neste tipo de célula. Dentro dessa população, existem ainda as células T que expressam a molécula de CD4, para os linfócitos restritos ao MHC de classe II, e CD8, para aqueles restritos ao MHC de classe I. Já a molécula de superfície celular CD19, participa da ativação celular juntamente com o BCR, é encontrado na maioria dos linfócitos B, sendo utilizado da mesma maneira como um “marcador” para este tipo de célula (Cherukuri *et al*, 2001; Abbas & Lichtman, 2005).

Primeiramente, durante as análises, foi feita a distinção de linfócitos pelo tamanho e granulosidade em relação às demais células. Em seguida, os linfócitos foram divididos em células T (através das células CD3+) e a partir daí, fez-se a separação dos linfócitos T CD4+ dos linfócitos T CD8+. Ainda dentro da população de linfócitos, foram separados as células B através das células CD19+.

Para analisar as características dos linfócitos, foram utilizadas outras moléculas de superfície a fim de predizer seu perfil fenotípico. A molécula de CD62L é uma L-selectina que apresenta um importante papel na adesão leucócito-endotélio. Ela medeia o tráfego de células T virgens ou *naive* através das vênulas do endotélio alto (HEV) de linfonodos periféricos e serve como um sítio primário de ligação para linfócitos circulantes dentro de tecidos linfóides (Manfro, 2003).

O CD28 é uma molécula co-estimulatória que participa do processo de ativação celular via MHC, servindo como um amplificador da sinalização pelo TCR. Essa molécula possui vários níveis de expressão, sendo que, à medida que a célula for ativada, sua expressão diminui (Vallejo, 2005).

O CD45 pertence à família dos receptores da proteína tirosina fosfatase e seu nível de expressão é requerido nos diferentes estágios do desenvolvimento das células T. A molécula de CD45RB é uma isoforma desse receptor. Ela também possui diferentes níveis de expressão: CD45RB<sup>high</sup> para células virgens e CD45RB<sup>low</sup> para células mais ativadas (Holmes, 2005).

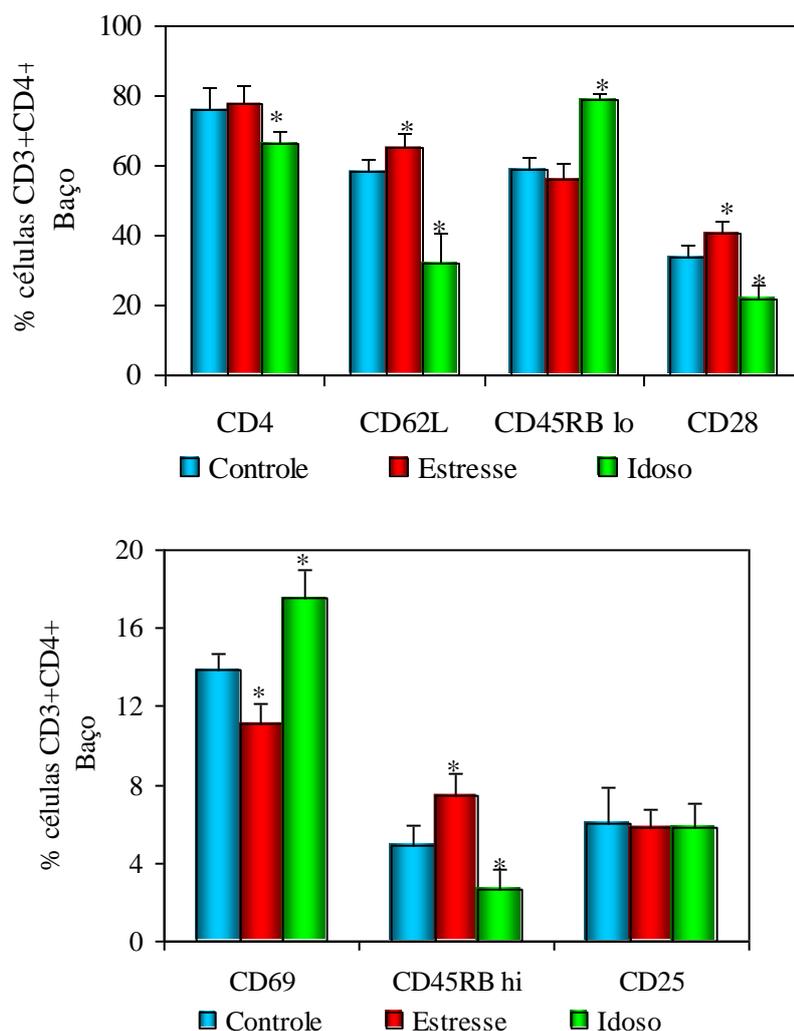
A molécula de CD69 participa do processo de sinalização em diferentes tipos celulares: linfócitos T e B, células NK, dentre outras e está presente em leucócitos ativados (Abbas & Lichtman, 2005).

A molécula CD25 é a cadeia  $\alpha$ , de alta afinidade, do receptor de IL-2 (Wan & Flavell, 2006). Sabe-se que essa molécula está presente em células ativadas diversas, mas recentemente tem adotado que, somente no caso de células T humanas, sua alta expressão (CD25<sup>high</sup>), em conjunto com as moléculas CD3 e CD4, está presente em células T reguladoras (Sakaguchi, 2006). Como sugerido por Sakaguchi (2006), foi utilizada a tripla-marcação (CD3+CD4+CD25<sup>low</sup>) a fim de identificar as possíveis células T reguladoras presentes nos animais.

Para análise das características fenotípicas dos linfócitos B, além do CD19, foram utilizados o CD21 e CD5. A primeira se refere a uma molécula receptora para o fragmento C3d da cascata de complemento, formando um complexo co-receptor com o CD19 e CD81, transmitindo sinais de ativação nos linfócitos B. Dessa maneira, ela é capaz de caracterizar células B maduras (Cherukuri *et al*, 2001; Carroll, 2004; Abbas & Lichtman, 2005).

A molécula CD5 é expressa em células B1a (CD19+CD5+), encontradas principalmente no peritônio, as quais são consideradas por serem responsáveis pela produção de anticorpos independentes de célula T e outros autoanticorpos (Colonna-Romano *et al*, 2003).

Analisando as características dos linfócitos presentes no baço, podemos observar na figura 18 que, durante o envelhecimento, há um aumento da frequência de linfócitos T CD4+ que expressam um fenótipo de células de memória, com diminuição na expressão de moléculas como CD62L, CD28 e CD45RB e aumento de moléculas como CD69 e CD45RB low. Já durante o estresse crônico parece ter um efeito contrário, uma vez que os linfócitos T CD4+ apresentam um perfil de células virgens, com o aumento da expressão de moléculas como CD62L, CD28 e CD45RB.



**Figura 18: Característica fenotípica de linfócitos T CD4+ do baço.**

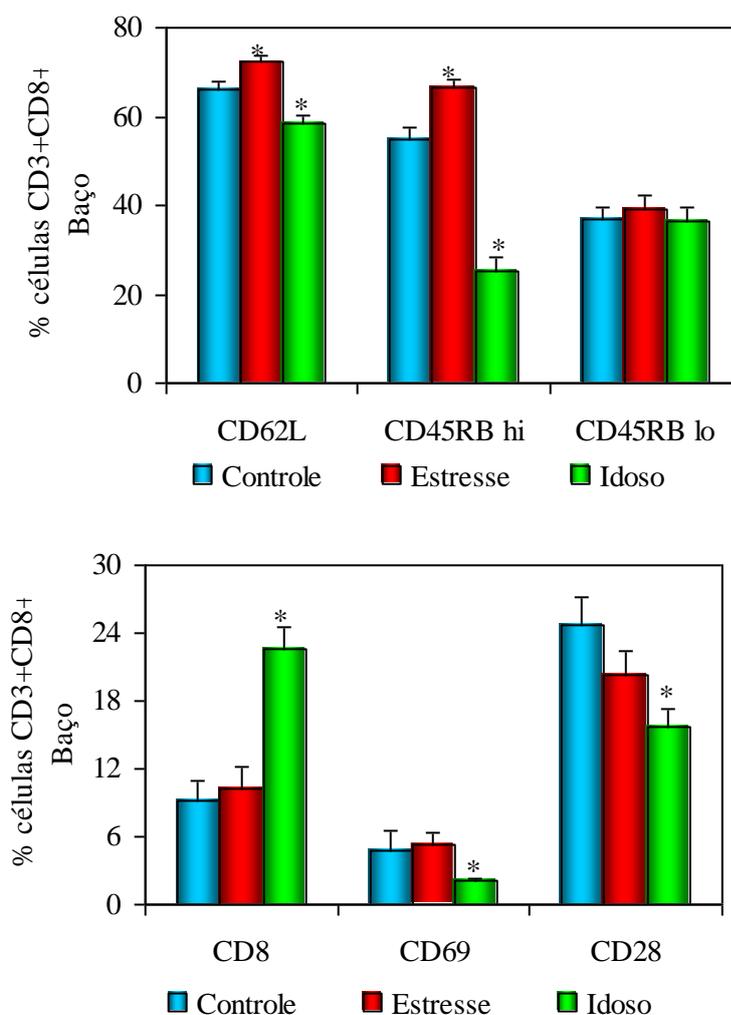
Os resultados estão representados sob a média do valor percentual de linfócitos T CD4+ positivos para cada molécula de superfície. Os asteriscos indicam uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) existente entre os grupos ( $n=5$ ).

É possível observar também que, tanto na senescência quanto no estresse crônico, não há alterações na porcentagem de células T CD4+CD25+, podendo sugerir que nenhum desses processos é capaz de afetar células possivelmente com atividade reguladora.

A figura 19 mostra as alterações no fenótipo dos linfócitos T CD8+ no mesmo órgão. Podemos perceber novamente que, no envelhecimento, há um aumento na frequência de células T CD8+ que apresentam marcadores de ativação, como diminuição da expressão de CD62L, CD28 e CD45RB. No entanto, essas células não se encontram tão ativadas como as células T CD4+, já que há uma baixa expressão de CD69. Novamente podemos observar que o estresse crônico desencadeia um efeito

oposto, com predomínio de células com um fenótipo virgem, com aumento de CD62L e CD45RB, porém sem alteração na expressão de CD28.

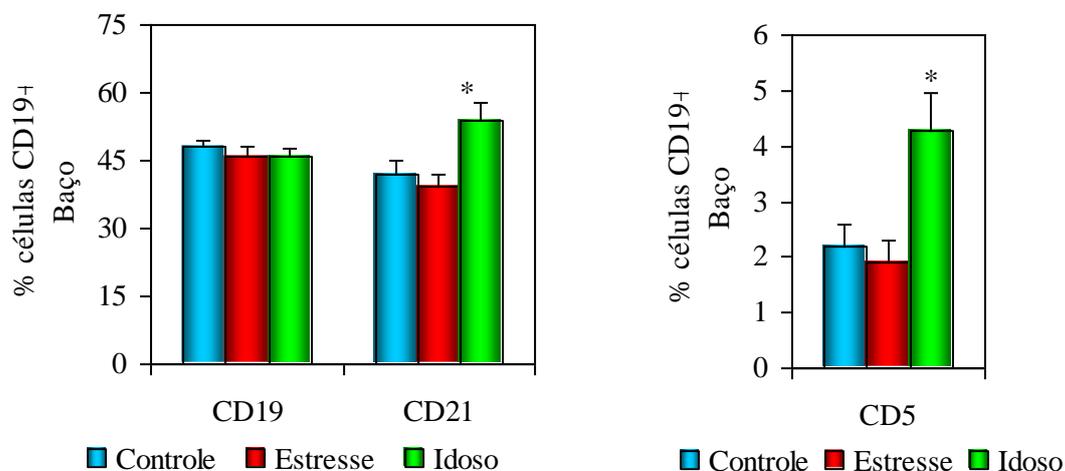
É interessante notar que, no baço dos animais idosos, a porcentagem de células CD3+CD4+ está diminuída, enquanto as células CD3+CD8+ estão aumentadas (Figuras 20 e 21).



**Figura 19: Característica fenotípica de linfócitos T CD8+ do baço.**

Os resultados estão representados sob a média do valor percentual de linfócitos T CD8+ positivos para cada molécula de superfície. Os asteriscos indicam uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) existente entre os grupos ( $n=5$ ).

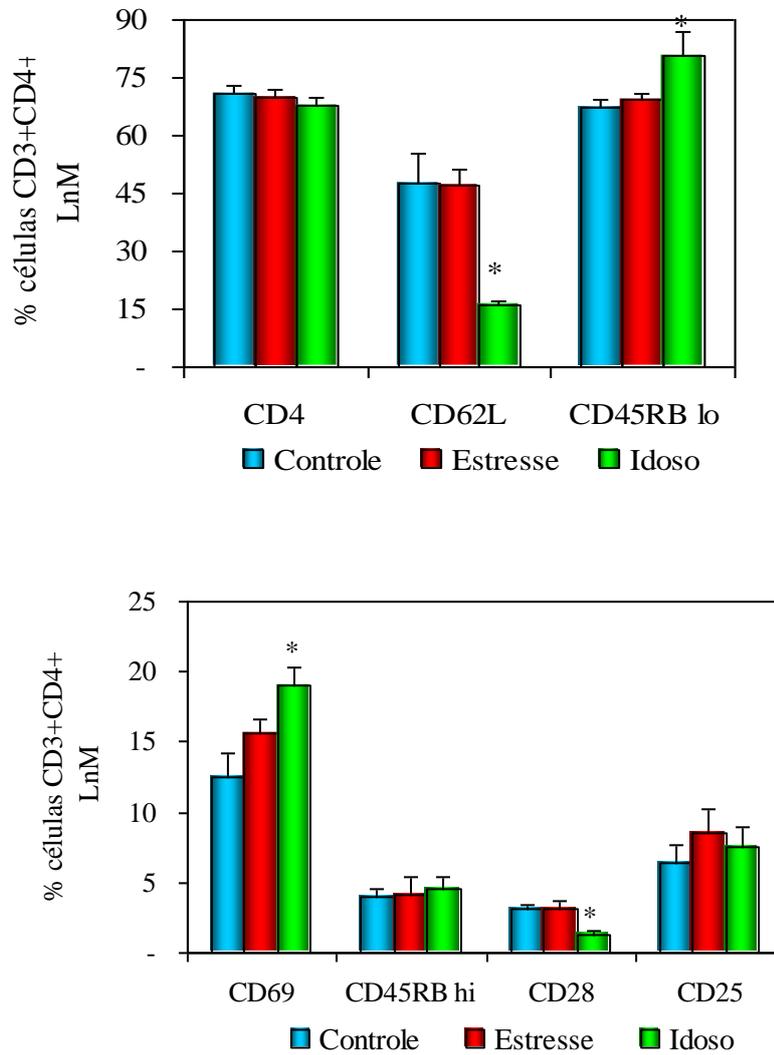
Ao analisarmos a população de linfócitos B (CD19+), é possível observar um aumento na frequência de células B ativadas (caracterizadas pelos marcadores CD19+CD21+) e da sub-população de células B1 (que expressam CD19+CD5+) nos animais idosos, em relação aos demais grupos. Não foram encontradas diferenças na porcentagem de linfócitos B total entre os grupos (Figura 20).



**Figura 20: Característica fenotípica de linfócitos B CD19+ do baço.**

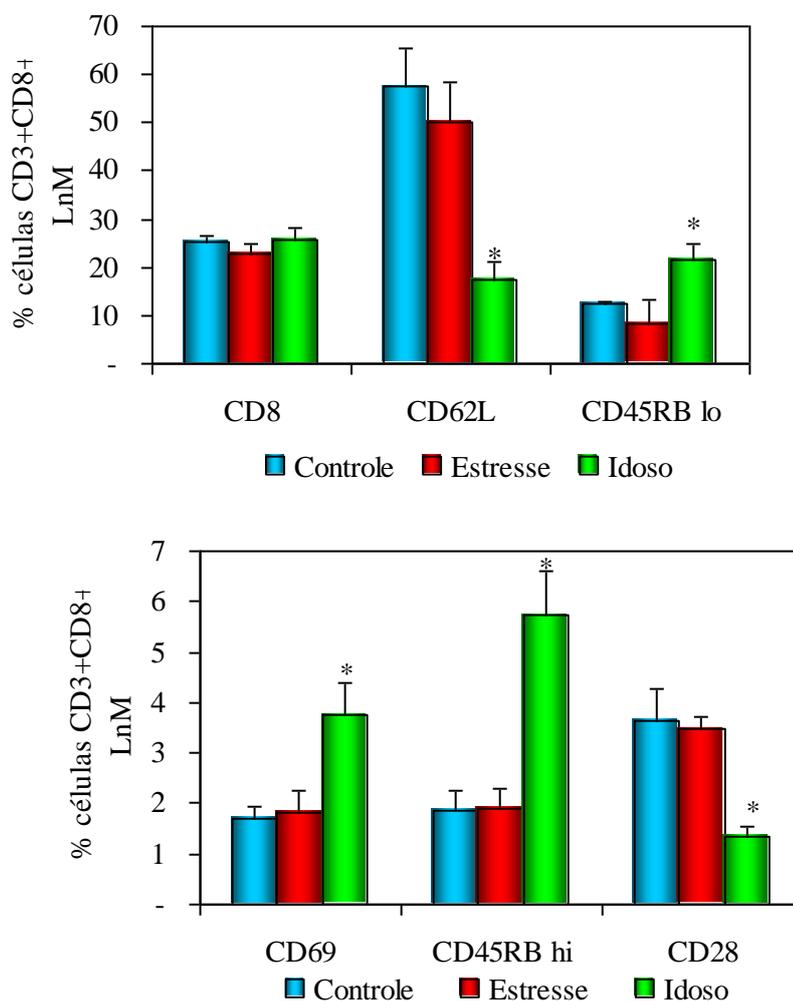
Os resultados estão representados sob a média do valor percentual de linfócitos B CD19+ positivos para cada molécula de superfície. Os asteriscos indicam uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) existente entre os grupos ( $n=5$ ).

No linfonodo mesentérico (LnM), assim como no baço, há um predomínio de linfócitos T CD4+ e linfócitos T CD8+ expressando um fenótipo de memória (diminuição de CD62L, CD28 e CD45RB, e aumento de CD69) durante o envelhecimento em relação ao grupo controle. No estresse crônico, as características das células CD3+CD4+ e CD3+CD8+ são similares ao grupo controle (Figuras 21 e 22).



**Figura 21: Característica fenotípica de linfócitos T CD4+ do LnM.**

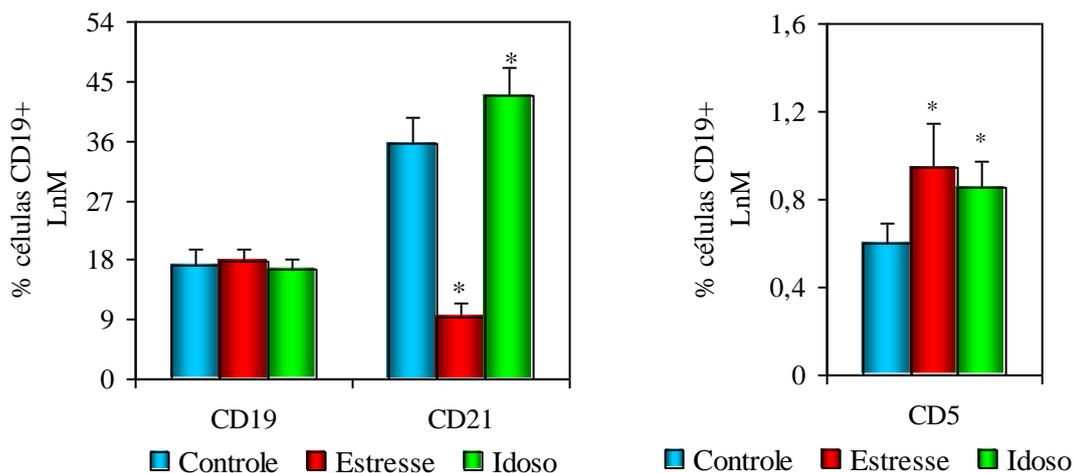
Os resultados estão representados sob a média do valor percentual de linfócitos T CD4+ positivos para cada molécula de superfície. Os asteriscos indicam uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) existente entre os grupos ( $n=5$ ).



**Figura 22: Característica fenotípica de linfócitos T CD8+ do LnM.**

Os resultados estão representados sob a média do valor percentual de linfócitos T CD8+ positivos para cada molécula de superfície. Os asteriscos indicam uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) existente entre os grupos ( $n=5$ ).

A população de linfócitos B, mostrada na figura 23, apresenta um aumento na frequência de células CD19+CD21+ e de CD19+CD5+ durante o envelhecimento, como visto no baço. No entanto, no estresse crônico, há uma grande redução da população CD19+CD21+ e um aumento da frequência de células CD19+CD5+ em relação aos demais grupos. Novamente, não foram encontradas diferenças na quantidade de linfócitos B total entre os grupos.

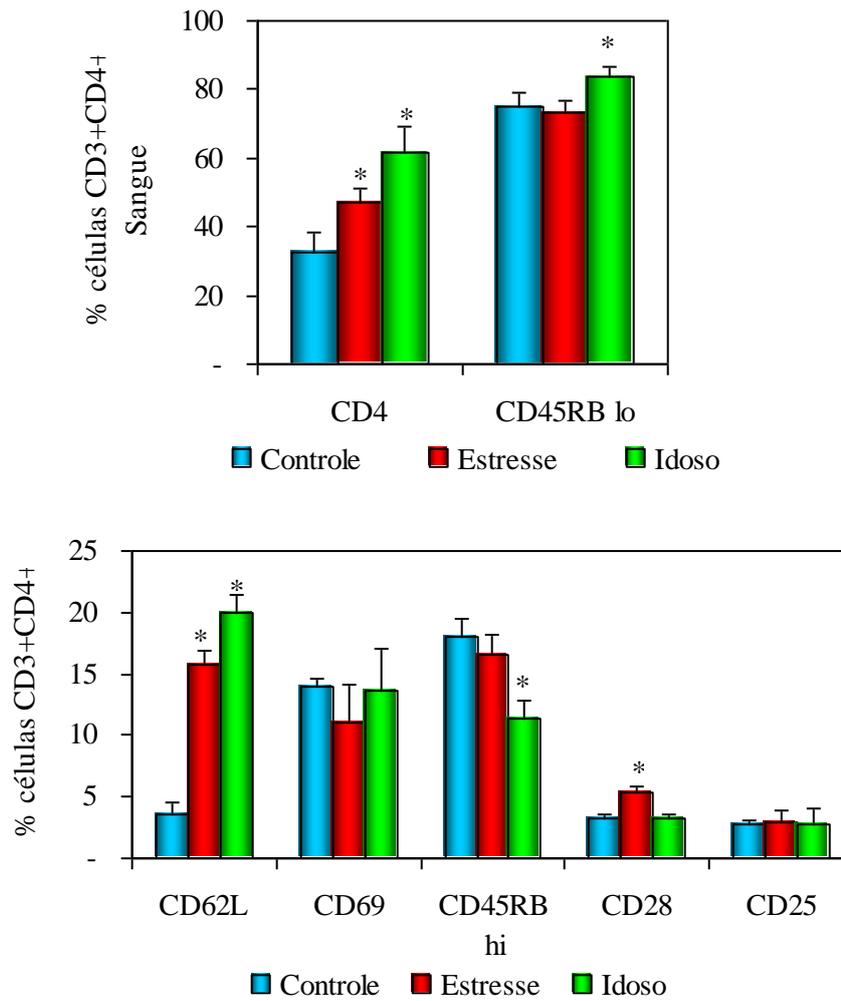


**Figura 23: Característica fenotípica de linfócitos B CD19+ do LnM.**

Os resultados estão representados sob a média do valor percentual de linfócitos B CD19+ positivos para cada molécula de superfície. Os asteriscos indicam uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) existente entre os grupos ( $n=5$ ).

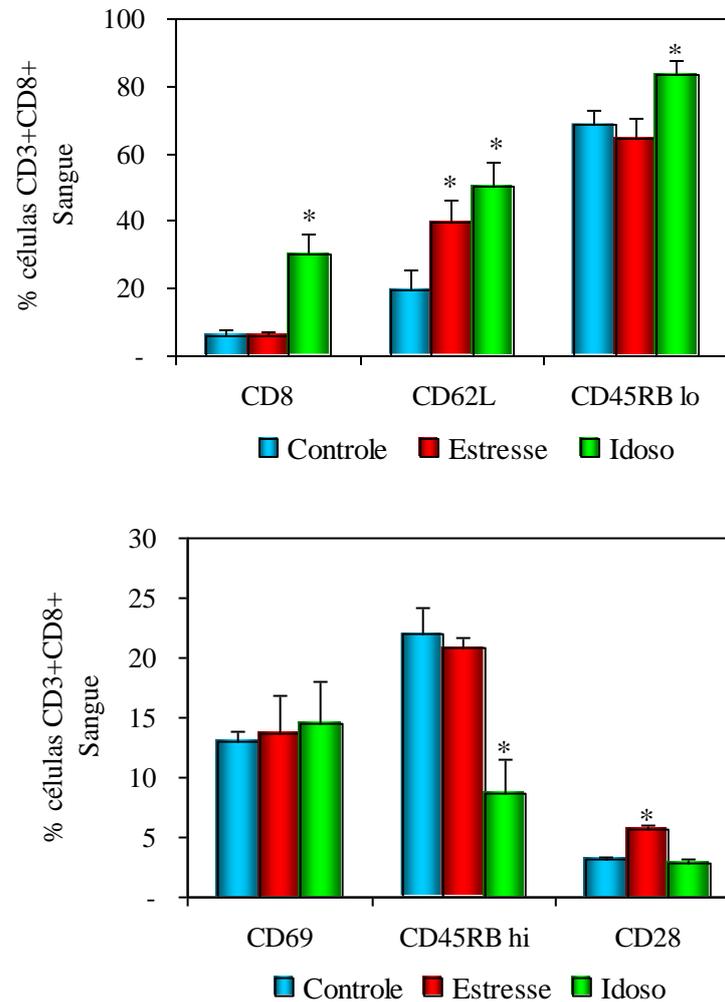
De acordo com as figuras 24 e 25, foi possível observar nos animais idosos que as células CD3+CD4+ e CD3+CD4+ se encontram num estágio intermediário de ativação, com o aumento da frequência de células expressando moléculas como CD62L, importante para o processo de migração, mas já há uma diminuição da frequência de células expressando CD45RB, em relação ao grupo controle. Há também um aumento na frequência de linfócitos T CD4+CD25+ circulantes, assim como de células T CD4+ e CD8+.

No estresse crônico as células CD3+CD4+ e CD3+CD8+ permanecem com um perfil fenotípico virgem, com aumento da frequência de células expressando CD62L e CD28 em relação ao grupo controle, apesar de não haver diferenças da frequência de células expressando CD45RB. Somente no sangue foi observado um aumento da porcentagem de linfócitos T CD4+, como nos animais idosos.



**Figura 24: Característica fenotípica de linfócitos T CD4+ do sangue.**

Os resultados estão representados sob a média do valor percentual de linfócitos T CD4+ positivos para cada molécula de superfície. Os asteriscos indicam uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) existente entre os grupos ( $n=5$ ).

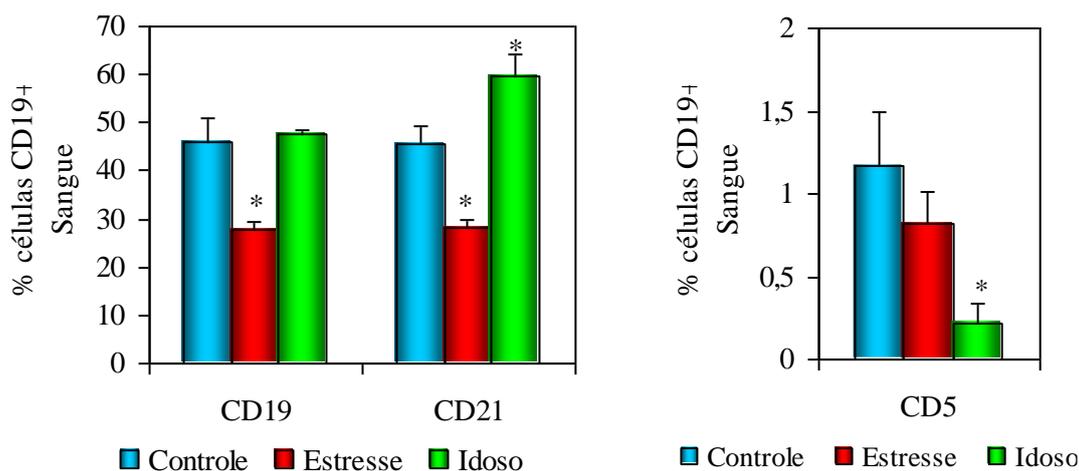


**Figura 25: Característica fenotípica de linfócitos T CD8+ do sangue.**

Os resultados estão representados sob a média do valor percentual de linfócitos T CD8+ positivos para cada molécula de superfície. Os asteriscos indicam uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) existente entre os grupos ( $n=5$ ).

A figura 26 ilustra as características fenotípicas dos linfócitos B. Podemos notar um aumento na proporção de células CD19+CD21+ e a diminuição de células CD19+CD5+ durante o envelhecimento. O número total de linfócitos B não se altera com o avançar da idade.

Já no estresse crônico, há uma redução da porcentagem de células CD19+ totais, de linfócitos B CD21+ e CD5+, em relação aos demais grupos.



**Figura 26: Característica fenotípica de linfócitos B CD19+ do sangue.**

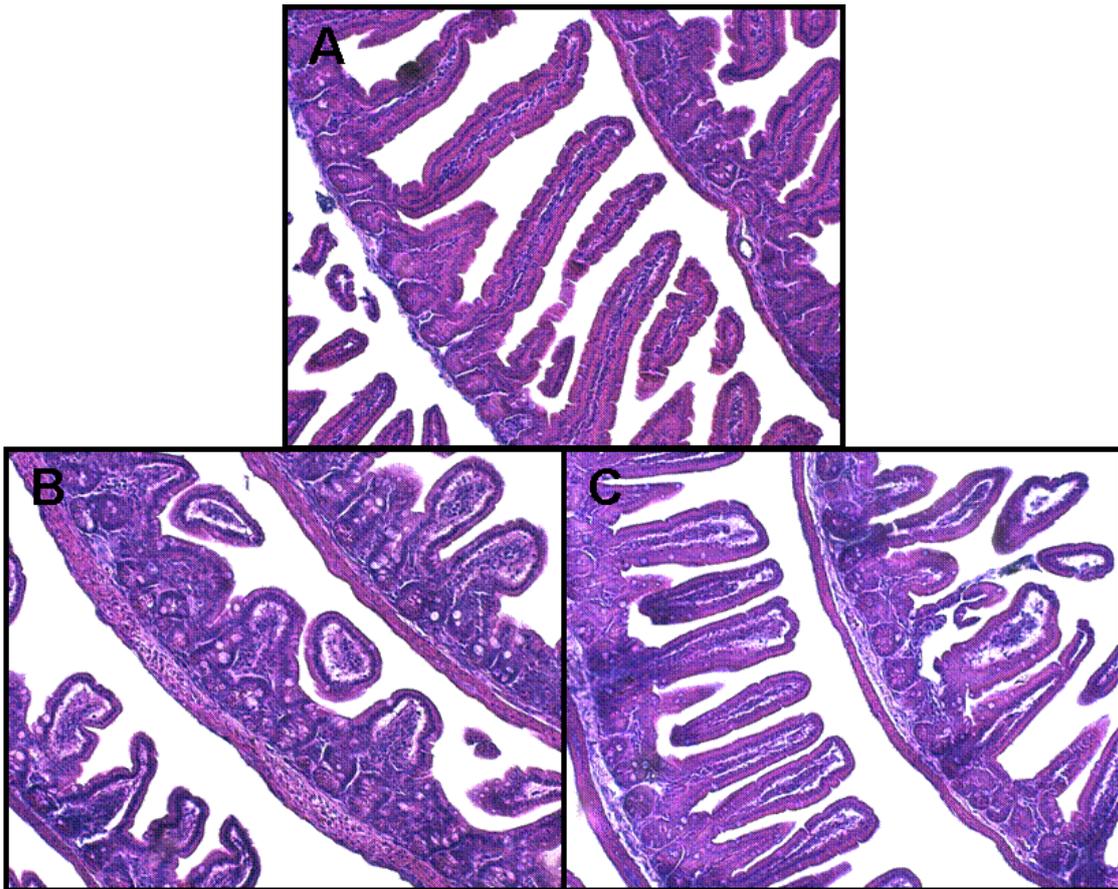
Os resultados estão representados sob a média do valor percentual de linfócitos B CD19+ positivos para cada molécula de superfície. Os asteriscos indicam uma diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) existente entre os grupos ( $n=5$ ).

#### ***4.9 - Análise histológica do intestino em animais jovens normais ou submetidos ao estresse crônico de contenção e idosos***

Os intestinos delgados dos animais foram retirados, lavados com PBS e fixados com formol tamponado 10% por 24 horas. Em seguida, os órgãos eram mantidos em álcool 70%, diafanizados em xilol, incluídos em parafina, de onde foram obtidos cortes no micrótopo para a montagem das lâminas. Estas são coradas pelo método da hematoxilina-eosina (HE) e visualizadas em microscópio ótico, com aumento de uma objetiva de 20X.

A figura 27A representa a estrutura do tecido intestinal dos animais controles, apresentando vilos longos e com a arquitetura intestinal bem preservada. A figura 27B representa um corte histológico de animais submetidos ao estresse crônico, em que é possível observar uma grande regressão das vilosidades. Já análises morfológicas desse órgão em idosos indicam que aparentemente também há uma diminuição dos vilos, porém não tão drástico quanto nos animais estressados (figura 27C).

Análises morfométricas desse órgão serão realizadas para se obter dados mais quantitativos sobre as alterações estruturais desse órgão.



**Figura 27 – Análise histológica do intestino delgado dos camundongos jovens normais ou submetidos ao estresse crônico de contenção e idosos.**

A: animais controles, B: animais submetidos ao estresse crônico e C: animais idosos. Os intestinos foram fixados com formol tamponado 10%, transferido para diferentes concentrações de álcoois e posteriormente incluídos em parafina e cortados em um micrótomo para montagem das lâminas. Foi utilizado o método de coloração hematoxilina-eosina (HE). As figuras foram analisadas no microscópio ótico, com uma objetiva de aumento de 20X.

#### 4.10 - Resumo dos Resultados

<b>Níveis de Imunoglobulinas</b>		
	<b>Estresse crônico</b>	<b>Envelhecimento</b>
IgM sérica	SD	aumenta
IgG sérica	SD	aumenta
IgA sérica	SD	aumenta
IgE sérica	aumenta	aumenta
IgA secretória	aumenta	aumenta

**Tabela 1:** Resultados comparativos dos níveis de imunoglobulinas entre animais jovens submetidos ao estresse crônico e idosos. SD = sem diferenças em relação aos animais controles.

<b>Produção de citocinas de células do baço quando estimuladas e do plasma</b>		
	<b>Estresse crônico</b>	<b>Envelhecimento</b>
IL-2	aumenta	aumenta
IFN-gama	aumenta	aumenta
IL-6	aumenta	aumenta
TNF-alfa	SD	SD
IL-4	SD	aumentada
IL-10	diminui	diminui
IL-6 plasmática	aumenta	aumenta

**Tabela 2:** Resultados comparativos da produção de citocinas de células do baço quando estimuladas e do plasma entre animais jovens submetidos ao estresse crônico e idosos. SD = sem diferenças em relação aos animais controles.

<b>Expressão dos marcadores fenotípicos em linfócitos T</b>		
	<b>Estresse crônico</b>	<b>Envelhecimento</b>
CD62L	aumenta	diminui
CD69	SD	aumenta
CD45RB hi	SD	diminui
CD45RB lo	SD	aumenta
CD28	aumenta	diminui
CD25	SD	SD

**Tabela 3:** Resultados comparativos da expressão geral de marcadores fenotípicos em linfócitos T do sangue, baço e LnM entre animais jovens submetidos ao estresse crônico e idosos. SD = sem diferenças em relação aos animais controles.

<b>Expressão dos marcadores fenotípicos em linfócitos B</b>		
	Estresse crônico	Envelhecimento
CD21	diminui	aumenta
CD5	SD	aumenta

**Tabela 4:** Resultados comparativos da expressão geral de marcadores fenotípicos em linfócitos T do sangue, baço e LnM entre animais jovens submetidos ao estresse crônico e idosos. SD = sem diferenças em relação aos animais controles.

## **5. DISCUSSÃO**

No século XXI, a sociedade tem convivido com uma grande parcela de indivíduos idosos e vem sofrendo uma constante diminuição da taxa de natalidade, ou seja, a tendência é que a população envelheça e que a quantidade de idosos ultrapasse a de jovens em um futuro breve (Butcher & Lord, 2004). Apesar de todo o avanço na expectativa de vida da população, a incidência de doenças como depressão e câncer tem aumentado cada vez mais. Um dos fatores importantes na etiopatogênese dessas doenças nas últimas décadas está relacionado com o estresse, considerado como um dos maiores problemas da sociedade moderna (Lauc *et al*, 1998; Reiche *et al*, 2004).

O envelhecimento é considerado um fenômeno complexo acompanhado por alterações quantitativas, qualitativas e estruturais no organismo. Muitos trabalhos demonstram que o envelhecimento antes de tudo é um processo celular durante o qual a própria célula envelhece, sendo que esse fenômeno conhecido como senescência celular ou senescência replicativa (Hayflick & Moorhead, 1961 e Hayflick, 1965 – revisado por Witkowski, 1987). Trabalhos na literatura demonstram que as células eucarióticas tais como fibroblastos, linfócitos T, queratinócitos, células adrenais, células do músculo liso e células  $\beta$  pancreáticas de indivíduos idosos apresentam uma capacidade limitada para se dividir (Hayflick & Moorhead, 1961; Hayflick, 1965 – revisado por Witkowski, 1987; Smith & Pereira-Smith, 1996). Embora essas células apresentem comprometimento no processo mitótico, elas não morrem em cultura, podendo ficar viáveis (metabolicamente ativas) por um longo período de tempo na fase G0/G1 do ciclo celular. Elas são maiores e achatadas e apresentam fenótipo característico com várias alterações morfológicas e moleculares, telômeros mais curtos, diminuição do gene c-fos, resistência ao estímulo apoptótico e incapacidade de sintetizar DNA (Seshadri & Campisi, 1990; Goletz *et al*, 1994).

A senescência é um processo biológico natural e está associado a modificações imunológicas marcantes. Tais alterações contribuíram para o surgimento do termo “imunosenescência” que está associado a uma diminuição fisiológica na função imune paralela ao processo de envelhecimento (Pawelec & Solana, 1997).

Uma dessas modificações pode ser observada na imunidade humoral. Há relatos na literatura que no envelhecimento foi constatada uma diminuição da capacidade de produção de anticorpos específicos para antígenos externos (Bauer, 2005; LeMaoult *et al*, 1997; Souvannavong *et al*, 1998). Apesar disto, foi constatado que nem os níveis de imunoglobulinas séricas, nem o número de linfócitos B diminuem com o avançar da

idade. Ao contrário, a concentração de anticorpos séricos assim como a quantidade de linfócitos B secretando imunoglobulinas na verdade aumenta com a idade (Weksler, 2000).

Nossos resultados demonstram que tanto os níveis de imunoglobulinas totais, quanto dos isotipos IgM, IgG, IgA, IgE séricos, e até mesmo de IgA secretória (sIgA) presente no intestino delgado, estão elevados no envelhecimento, estando de acordo com a literatura. Senda e colaboradores (1988) e Speziali (1999 – tese de mestrado) tinham relatado essas mesmas alterações (Senda *et al*, 1988; Speziali, 1999). Weksler (2000) e Weksler & Szabo (2000) descreveram que, apesar de haver uma diminuição da especificidade de anticorpos em idosos, há um aumento de anticorpos autoreativos no soro. Tais anticorpos auto-reativos não estariam necessariamente envolvidos na geração de doenças auto-imunes mas, ao contrário, eles aparentemente apresentam um alto grau de conectividade anti-idiotípica entre si e, portanto, são capazes de controlar a produção uns dos outros (Weksler, 2000; Weksler & Szabo, 2000). Talvez essa elevação observada em nossos resultados nos níveis de imunoglobulinas durante o envelhecimento se refira ao aumento da produção de auto-anticorpos, como descrito acima.

Segundo Speziali (1999), nos animais idosos, há um aumento das células produtoras de imunoglobulinas totais tanto no baço quanto na medula óssea, principalmente de células produtoras de imunoglobulinas das classes IgM, IgG e IgA (Speziali, 1999).

Em relação à população de linfócitos B, não foi encontrado diferenças na frequência destas células no baço, no linfonodo mesentérico (LnM) e no sangue nos animais idosos. Mas foi detectado um aumento significativo de linfócitos B ativados, possivelmente estes poderiam ser responsáveis pela elevada produção de imunoglobulinas durante o envelhecimento.

Segundo Johnson e Cambier (2004), o número de linfócitos B periféricos em camundongos idosos aparenta ser igual ao do jovem. Como consequência do decréscimo na geração de células B progenitoras na senescência, diminui a quantidade de células B virgens e se expandem os linfócitos B ativados. Isto leva a uma redução no repertório de células B, podendo resultar em deficiência na qualidade da resposta humoral (revisado por Weng, 2006).

Sobre as células B1, a literatura descreve um aumento dessa população com a idade (Weksler, 2000) e o mesmo só foi observado no baço, sendo que no LnM e no

sangue elas estão diminuídos. Provavelmente, ocorre uma migração dessas células de alguns compartimentos (como do LnM e sangue) para outros (como no baço). Ainda não se sabe qual o fenômeno responsável pelo aumento das células B1 no envelhecimento (Spencer & Daynes, 1997).

Em camundongos neonatos, as células B1 se originam do fígado fetal e do omento (peritônio) diferentemente das células B2 produzidas somente na medula óssea. Nos adultos, elas são encontrados em grande quantidade no peritônio onde são geradas a partir de precursores locais. As células B1 são as primeiras células B a serem formadas sendo responsáveis pela produção da grande maioria dos anticorpos séricos em neonatos e nos recém-nascidos. Essas células estão em geral em um estado de ativação mais adiantado que as células B2 originárias da medula óssea e seu repertório de reatividade é muito típico. Os anticorpos produzidos pelas células B1 reagem com auto-antígenos sendo que a fosforilcolina (presente nas membranas celulares em geral) é um antígeno importante para os anticorpos produzidos por tais células (Tung *et al*, 2006; Hayakawa *et al*, 1984) As células B1a são CD5+, diferentes das células B1b, CD5-. Nenhuma diferença funcional entre os dois tipos de células B1 foi encontrada, mas acredita-se que a presença desse marcador está relacionada com a produção de anticorpos auto-reativos (Spencer *et al*, 1996).

Somente 5-10% das células B do sangue e dos tecidos linfóides pertencem a subpopulação B1. Além disso, essas células secretam anticorpos IgM espontaneamente. No entanto, não se sabe ao certo se as células B1 têm uma função especial na resposta imune. Uma possibilidade é que elas forneçam uma fonte de produção de anticorpos contra microrganismos presentes em determinados sítios, como no próprio peritônio (Hayakawa & Hardy, 2000; Hardy & Hayakawa, 2001; Abbas & Lichtman, 2005).

O aumento do número e da atividade de células B1 está intimamente relacionado com o aumento dos níveis de anticorpos IgG, IgM e IgA autoreativos (Spencer & Daynes, 1997). Esse dado fortalece nossa hipótese de que os elevados níveis de imunoglobulinas séricas vistos nos animais idosos pode se relacionar ao aumento de anticorpos autoreativos, não somente com relação aos linfócitos B ativados mas também aos linfócitos B1 no envelhecimento.

Tem sido descrito que células NK estão envolvidas na maturação dos linfócitos B, secreção de imunoglobulinas e mudança de isotipo, independente de linfócito T. Além disso, tem sido sugerido que células CD5+ e linfócitos B ativados podem ser relevantes para a produção de anticorpos induzidos pelas células NK. Segundo Colonna-

Romano e colaboradores (2003), há um aumento de células NK durante a senescência, sugerindo a participação dessas células na regulação da produção de anticorpos em idosos (Colonna-Romano, 2003).

Um dos fatores que sofrem influências no envelhecimento é a imunidade mediada por células. Para isso, foi realizada uma análise do perfil fenotípico dos linfócitos ocorridas durante o envelhecimento, bem como a produção de citocinas *in vitro*. Foram avaliadas, neste estudo, as células contidas no baço, LnM e sangue.

O baço é um dos mais importantes órgãos linfóides secundários, sendo dividido em duas regiões distintas: a polpa vermelha, que contém eritrócitos, macrófagos, células dendríticas, linfócitos esparsos e plasmócitos; e a polpa branca, constituído por centros germinativos ligados às zonas de linfócitos B e T. Ele é suprido por uma única artéria esplênica, e funciona como um importante filtro sanguíneo (Abbas & Lichtman, 2005). Assim, podemos considerá-lo um órgão capaz de refletir os acontecimentos sistêmicos.

Os linfonodos mesentéricos (LnM), pertencem ao tecido linfóide associado ao intestino (GALT), são considerados um local no qual ocorre uma maturação linfocitária posterior à ativação dessas células nas placas de Peyer. Ao deixarem os LnM, tais células ativadas caem no ducto torácico e alcançam a corrente sanguínea (Brandtzaeg, 1989). Os LnM aparecem, portanto, como importantes sítios de desenvolvimento de fenômenos imunológicos iniciados na mucosa intestinal. Uma vez que as células presentes nos linfonodos mesentéricos alcançam a corrente sanguínea, elas podem migrar para regiões distantes, como o baço, e influenciar a resposta imune de uma maneira sistêmica. A maior parte das células ativadas nas placas de Peyer e nos linfonodos mesentéricos tende a voltar, via circulação sanguínea, para a mucosa intestinal, principalmente para a *lamina propria*, onde se diferenciam em células efectoras (Brandtzaeg, 1989). Antes disto, no entanto, elas passam pelo baço e migram para sítios inflamatórios, também podendo influenciar eventos imunológicos sistêmicos (Rothkötter *et al*, 1995).

O sangue é um compartimento onde há o tráfego de células pelo corpo. O número e a proporção de leucócitos no sangue é uma representação do estado de ativação do sistema imune e o padrão de distribuição de células imunes pelo corpo (Dhabhar, 1996).

Foi demonstrado que o envelhecimento está associado a alterações significativas nas células T periféricas. Nossos resultados demonstram que há diminuição da proporção de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, mas não de células T CD8<sup>+</sup>, no baço, quando

comparados com animais controle. Essa mesma alteração foi descrita por Collaziol e colaboradores, em 2004 (Collaziol *et al*, 2004). Nos LnM, não há diferenças na proporção de células CD4+ e CD8+, enquanto que no sangue, ambas estão aumentadas.

Nossos dados mostram que, assim como os linfócitos B, os linfócitos T, tanto CD4+ quanto CD8+, também se caracterizaram por apresentarem, na senescência, o predomínio de células ativadas com fenótipo de ativação crônica (normalmente chamado de fenótipo de memória). Esse resultado está em concordância com a literatura, uma vez que foi descrito que em idosos há um aumento da expressão de marcadores de células ativadas e de memória (Solana & Pawelec, 1998).

Apenas no sangue os linfócitos T ainda possuem alta expressão de CD62L, apesar das células expressarem marcadores de ativação. O sangue é um local de transporte de muitas células para todo o corpo e seria necessária a participação de moléculas de adesão para migração de células para sítios específicos. Talvez as células T CD4+ e CD8+ se encontrem em um estágio intermediário, em que foram ativadas mas, como precisam ser encaminhadas para outras regiões do organismo, permaneceram ainda com a molécula CD62L (ou L selectina), um receptor importante de migração que se liga a resíduos de carboidrato presentes em moléculas de adesão localizadas no endotélio de órgãos linfóides.

A redução da reatividade imunológica observada durante o processo de envelhecimento está associada predominantemente a mudanças nas células T. Essas alterações funcionais incluem um declínio da capacidade de estimulação dessas células e produção alterada de citocinas (Haynes, Linton & Swain, 1997). Ao mesmo tempo, ocorre uma diminuição na proporção de células T que expressam um fenótipo virgem (CD44<sup>lo</sup>, CD45RB<sup>hi</sup>, CD62L<sup>hi</sup>, CD28<sup>hi</sup>) e um aumento naquelas que expressam um fenótipo de memória (CD44<sup>hi</sup>, CD45RB<sup>lo</sup>, CD62L<sup>lo</sup> e CD28<sup>lo</sup>), estando de acordo com os nossos resultados. Essas alterações podem ser responsáveis pelo aumento da susceptibilidade a infecções e redução na eficácia da vacinação observada nos indivíduos idosos.

Uma das alterações marcantes que ocorre no sistema imune de idosos é o acúmulo de linfócitos T CD8+CD28-. Essas células estão ausentes em recém-nascidos e se tornam a maioria das células T CD8+ circulantes (cerca de 80-90%) no envelhecimento. Acredita-se que as mesmas são derivadas das células T CD8+CD28+ depois de repetidas estimulações antigênicas. Funcionalmente, os linfócitos T CD8+CD28- possuem baixa resposta proliferativa quando seu TCR é ligado, mas

exibem atividade citotóxica normal ou até alta e são capazes de resistir a apoptose (Weng, 2006).

O acúmulo de células T com fenótipo de memória em animais idosos poderia explicar algumas, mas não todas, alterações associadas ao envelhecimento. Ele pode explicar, por exemplo, as alterações observadas no potencial para produção de citocinas secretadas pelos linfócitos T de animais idosos, uma vez que as células T virgens secretam um perfil de citocinas diferentes das células ativadas. Um conjunto de experimentos mostrou que a síntese de IL-2 por células T CD4<sup>+</sup> está diminuída no envelhecimento. Em contrapartida, a produção de IL-3, IL-4, IL-5, IL-10 e IFN- $\gamma$  por esses linfócitos T apresentou-se aumentada com o avançar da idade, consistente com a maior concentração de linfócitos T ativados nos animais idosos (Hobbs *et al*, 1993 e 1994; Engwerda, Fox & Handwerger, 1996). Além disso, observou-se que as alterações no perfil de citocinas relacionadas ao envelhecimento ocorrem gradualmente ao longo da vida do animal (Hobbs *et al*, 1993).

As células T CD8<sup>+</sup> também sofrem mudanças com relação à produção de citocinas durante o processo de envelhecimento. Mu e Thoman (1999) relataram que a síntese de citocinas por essas células é diferente em animais idosos e jovens. Ocorre um aumento na produção de IL-4 e IFN- $\gamma$  nos animais idosos quando comparados com animais jovens e, por outro lado, a síntese de IL-2 está reduzida nos mesmos animais (Mu & Thoman, 1999).

O sistema imune é conhecido por depender da produção das citocinas que controlam a sobrevivência, proliferação e diferenciação de linfócitos e outras células linfóides e não-linfóides. À medida que um indivíduo envelhece, o mecanismo que controla essa “rede” de citocinas se altera podendo levar a uma redução da imunocompetência (Spencer & Daynes, 1997).

Sobre o padrão de citocinas produzidas *in vitro* pelos esplenócitos mantidos em cultura, estimulados ou não com Concanavalina A (Con A) ou com anticorpos anti-CD3 e anti-CD28, podemos notar que a produção da citocina IL-2, nos animais idosos, está alta quando as células são estimuladas. A IL-2 é produzida pelos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e, em menores quantidades, por células T CD8<sup>+</sup>. Ela age principalmente nas mesmas células que a produzem (ação autócrina), e a ativação das células T por antígenos e co-estimuladores estimula a transcrição do seu gene e a síntese e a secreção da proteína. A IL-2, produzida pelas células T no reconhecimento antigênico, é responsável pela proliferação de células antígeno-específicas (Abbas & Lichtman, 2005). A produção de

IL-2 parece sofrer influências do timo sendo já demonstrado por Wiedmeier e colaboradores (1991) que camundongos timectomizados reduzem a capacidade das células T de produzirem essa citocina, enquanto há um aumento de IL-4. O tratamento desses animais timectomizados com DHEA foi capaz de restabelecer a produção de IL-2 para níveis normais (Wiedmeier *et al*, 1991).

Nossos resultados contradizem vários trabalhos na literatura, em que está muito bem documentada a diminuição da produção de IL-2 durante o envelhecimento (Bauer, 2005). Como no envelhecimento há uma drástica diminuição do timo e da secreção de DHEA, estes poderiam ser fatores que contribuiriam para a diminuição da síntese de IL-2 nos estágios avançados da vida. Entretanto, segundo Adolfsson (2001), a redução na produção de IL-2 no envelhecimento ocorre principalmente em células virgens, enquanto que nas células de memória permanece inalterada. Provavelmente, esse elevado nível de IL-2 observado em nossos experimentos se refere à secreção dessa interleucina pelas células de memória, que prevalecem na senescência. Como as células de memória se encontram cronicamente ativadas, essas células são capazes de responder mais rapidamente, produzindo e secretando citocinas, frente a um estímulo.

Uma maneira de comprovar essa hipótese, seria detectar a produção de citocinas, ainda intra-citoplasmáticas, com anticorpos conjugados a uma fluorescência específica para a IL-2, por exemplo, nas células de memória e virgens em cada um dos grupos experimentais.

Da mesma forma, as citocinas IL-4, IL-6 e IFN- $\gamma$  apresentam-se elevadas nas culturas de células de animais idosos, quando estimuladas, quando comparadas com as células de animais jovens. A interleucina-4 é o principal estímulo para a produção de anticorpos IgE e IgG1 e para o desenvolvimento de células Th2 a partir de células T CD4+ *naive* (Abbas & Lichtman, 2005). A alta produção dessa citocina no envelhecimento já foi descrita na literatura (Forsey *et al*, 2003; Born *et al*, 1995; Thoman, 1997) e possivelmente esse é um dos principais fatores responsáveis pelo aumento de IgG e IgE sérica, constatada em nossos resultados previamente.

A interleucina-6 é considerada uma citocina pró-inflamatória que exerce várias funções. Provavelmente, a mais importante delas é o papel mediador durante a fase aguda das respostas inflamatórias, incluindo ativação de linfócitos e células inflamatórias, como os neutrófilos, para o sítio da inflamação. A expressão dessa citocina é normalmente baixa e seus níveis séricos são praticamente indetectáveis na ausência da inflamação. Entretanto, com o avançar da idade, a mesma se torna

detectável e isso reflete a perda da regulação da expressão seu gene associada ao envelhecimento (Ershler, 1993; Ershler, Sun & Binkley, 1994). Segundo Daynes e colaboradores (1993), a produção de IL-6 está elevada em camundongos idosos. Neste mesmo trabalho, foi descrito não só um aumento dessa interleucina no plasma, como também foi detectada uma produção espontânea da mesma no sobrenadante de células linfóides do baço e do linfonodo mesentérico mantidas em cultura, nessa mesma fase da vida (Daynes *et al*, 1993). Nossos resultados confirmam que há um aumento da síntese de IL-6 durante o envelhecimento. Quando os esplenócitos de animais idosos são estimulados, essa produção se torna ainda mais elevada. Da mesma maneira, observamos que a concentração plasmática dessa citocina também é maior no envelhecimento.

Ainda de acordo com os mesmos autores, os altos níveis de IL-6 observados durante a senescência podem ser revertidos através da suplementação de DHEA-S, hormônio que declina com o avançar da idade. Em animais idosos tratados com esse hormônio contém baixos níveis de imunoglobulinas séricas (todos os isotipos) e de autoanticorpos (Daynes *et al*, 1993).

Embora a IL-6 ter sido originalmente identificada como imunomoduladora, regulando a diferenciação de linfócitos B e T, vários trabalhos descrevem que a mesma é capaz de desempenhar outras funções não-imunes, como estimulação do eixo HPA (Nukina, 2001), regeneração hepática e osteoclastogênese (Daynes, 1993). Funcionalmente similar às citocinas IL-1 e TNF, a desregulação na produção de IL-6 está envolvida numa variedade de doenças inflamatórias, processos infecciosos, osteoporose e certos tipos de doenças autoimunes. Por isso, foi descrito que uma alteração na produção dessa interleucina contribui para um dos fatores responsáveis pelo desenvolvimento das patologias que acompanham o processo de envelhecimento (Daynes, 1993).

O interferon- $\gamma$  é a principal citocina ativadora de fagócitos e APCs, estimulando a expressão de moléculas como o MHC de classe I e II e de moléculas co-estimuladoras por essas células. Ela também age nos linfócitos B promovendo a troca de isotipos para subclasses de IgG, especialmente IgG2a, em camundongos. É relevante lembrar que a IL-4 e o IFN- $\gamma$  agem de maneira oposta nas células T CD4+, induzindo diferentes perfis de secreção de citocinas (Th2 e Th1, respectivamente). Na verdade, eles são capazes de inibir os efeitos um do outro (Abbas & Lichtman, 2005). Provavelmente, o aumento dos níveis de IgG observados na também pode ser devido a

alta produção de IFN- $\gamma$  no envelhecimento. Seria interessante detectar quais subclasses de IgG permanecem elevadas, IgG1 ou IgG2a, e esclarecer qual delas seria responsável pelo aumento de IgG total no soro e qual citocina poderia estar influenciando com maior intensidade esse processo.

De acordo com Spencer & Daynes (1997), uma das principais células produtoras de INF- $\gamma$  nos animais idosos são as células NK, através da estimulação de IL-12 secretada pelos macrófagos, que também se encontra elevada no envelhecimento. A IL-12 também é a responsável pela produção de IL-6 e IL-10 pelos esplenócitos e pelos linfócitos B (Spencer & Daynes, 1997).

Não foram encontradas diferenças significativas na produção de TNF- $\alpha$  tanto nos animais jovens quanto dos idosos, independentemente se as células foram estimulados ou não. O fator de necrose tumoral- $\alpha$  é um dos principais mediadores das respostas inflamatórias, principalmente durante infecções microbianas. Ele é capaz de estimular o recrutamento de neutrófilos e monócitos para o local da infecção e ativá-los. É produzido por fagócitos mononucleares ativados. Segundo os trabalhos de Peterson e colaboradores (1994), não há alteração na produção dessa citocina no envelhecimento (Peterson *et al*, 1994).

A interleucina-10 é uma citocina capaz de modular a atividade de macrófagos e células dendríticas, podendo inibir a produção de IL-12, a expressão de moléculas co-estimulatórias e MHC de classe II nessas células principalmente quando elas estão ativadas (Abbas & Lichtman, 2005). Segundo Spencer e colaboradores (1996), as células B1 são as maiores produtoras desta citocina (Spencer *et al*, 1996). De acordo com esse mesmo autor, há um aumento na produção de IL-10 durante a senescência e quando os animais idosos são tratados com DHEA, os níveis desta citocina se mantêm igual ao encontrado nos animais adultos (Spencer *et al*, 1996).

Como no envelhecimento foi constatada uma maior frequência das células B1 (figura 22) e a literatura descreve que há uma diminuição de DHEA nessa fase da vida (Bauer, 2005), poderia se esperar um aumento da produção de IL-10, conseqüentemente. No entanto, em nossos resultados, observamos que, no baço, a produção dessa citocina não se altera ao longo da idade. É interessante notar que a produção basal (não estimulada) de IL-10 pelos esplenócitos foi maior do que quando estimulados, mas não foram detectada diferenças entre os grupos. Existem trabalhos contrastantes na literatura, sugerindo que, no envelhecimento, não há uma alteração nos

níveis dessa citocina (Peterson *et al*, 1994). Segundo Araneo, Woods II e Daynes (1993) e Engwerda, Fox e Handwerger (1996) há uma semelhança no perfil de produção de determinadas citocinas em animais jovens e idosos que poderia ser explicado por diferenças no tempo de cultura das células, pela presença de sinais co-estimulatórios via moléculas acessórias, pela purificação ou não das subpopulações das células T, bem como por diferenças nas raças de camundongos (Araneo, Woods II & Daynes, 1993; Engwerda, Fox e Handwerger, 1996). Poderíamos acrescentar também que o padrão de citocinas pode variar de acordo com o órgão que está sendo analisado.

O principal efeito do envelhecimento no sistema imune pode ser observado no timo, porém esse fenômeno não é exclusivo dessa fase da vida. Uma consequência marcante do estresse é a involução tímica, diagnosticada por Hans Selye em seus primeiros trabalhos (revisado por Berczi, 1998). Esse órgão, local primário para o desenvolvimento de células T, é composto pelas regiões cortical e medular que durante ambos os processos sofre uma atrofia caracterizada pela perda da região cortical, mas não da região medular acarretando, então, a perda de timócitos imaturos o que ocasionaria a diminuição na população de células presentes nesse local (Takeoka *et al*, 1996).

Nossos resultados estão coerentes com os descritos na literatura. Observamos tanto nos animais idosos quanto naqueles submetidos ao estresse crônico uma drástica diminuição do tamanho e da celularidade desse órgão. Ao analisarmos a histologia do órgão, podemos observar que, apesar da regressão cortical ser detectada em ambos os processos, as alterações morfológicas são bastante distintas. Em idosos, foi possível notar que está ocorrendo uma substituição do tecido tímico, com depósito de tecido adiposo na região cortical, e de conjuntivo, na medular. No estresse crônico, além da redução da celularidade, a região medular apresenta um predomínio de fibrose.

Segundo Garavini (2006), no processo de diferenciação de timócitos, durante o estresse, as etapas mais comprometidas são aquelas correspondentes à diferenciação de pró-T2 para pró-T3 e no desenvolvimento final de linfócitos T CD3+CD4+. Interessantemente, Aspinall e colaboradores (1997) tinham descrito as mesmas alterações durante o processo de diferenciação de timócitos pró-T2 para pró-T3 em camundongos idosos (Aspinall *et al*, 1997). Alterações semelhantes são observadas no baço, sugerindo serem estas uma repercussão do processo de involução tímica (Garavini, 2006).

A diminuição da diferenciação de novas células T resulta num menor número de células T virgens circulantes, prejudicando a imunidade mediada por células. Assim, um menor número de linfócitos T é ativado, reduzindo conseqüentemente a ativação de linfócitos B e a produção de anticorpos (Aspinall, 2003). Provavelmente, essa possível diminuição de anticorpos, decorrente da redução de células T, deve se referir à produção de imunoglobulinas frente a antígenos externos, já que a quantidade de imunoglobulinas plasmáticas (provavelmente composta por auto-anticorpos) se eleva no envelhecimento.

Um dos responsáveis pela rápida diminuição do timo no estresse crônico pode ser devido à liberação de altas concentrações de cortisol na corrente sanguínea, decorrente à ativação do eixo HPA. Foi demonstrado que animais adrenalectomizados são capazes de reverter a involução tímica, evidenciando a importância desse hormônio nesse processo (Berczi, 1998). Foi visto também que não há participação da noradrenalina nesse processo de atrofia tímica, uma vez que a simpatectomia com 6-hidroxi-dopamina não foi capaz de inibir esse processo (Garavini, 2006).

Uma outra explicação para a involução tímica induzida pelo estresse seria uma diminuição na taxa de linfócitos imaturos (pré-timócitos) provenientes da medula óssea para o timo (Dhabhar *et al.*, 1995; Bauer, 2001). Mas não existem trabalhos na literatura que tenham avaliado esse processo de migração.

Existem outros fatores determinantes deste processo. No caso do envelhecimento, foi relatado que alterações no microambiente tímico e um decréscimo na produção de IL-7 são as principais causas da redução tímica (Solana & Pawelec, 1998; Andrew & Aspinall, 2002).

Tanto na senescência quanto no estresse crônico, a atrofia tímica pode ser causada pela liberação de cortisol, que no primeiro pode estar ocorrendo de forma mais lenta e gradual ao longo da vida, enquanto que no último acontece de maneira brusca, o que pode acarretar mudanças no microambiente tímico, comprometendo o processo de maturação de timócitos.

Relatos na literatura também informam que o estresse crônico e o envelhecimento são caracterizados por uma supressão do sistema imune, daí a maior susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças infecciosas, câncer e doenças autoimunes observadas em ambos os processos (Solana & Pawelec, 1998; Chrousos, 2000).

Interessados em saber se os demais efeitos do estresse crônico se assemelhariam com os do envelhecimento, ou vice-versa, o objetivo desse trabalho foi estudar vários parâmetros imunológicos e morfológicos a fim de responder essa questão.

Desde a década de 1930, vários trabalhos têm relatado a forte relação entre fatores psicológicos e o desenvolvimento de doenças, assunto estudado pela psiconeuroimunologia (Reiche *et al*, 2004). Em 1936, o pesquisador Hans Selye introduziu definitivamente o termo “estresse” na literatura científica, definindo-o como uma alteração da homeostase causada por diversos tipos de agentes estressores, capazes de ativar simultaneamente o sistema nervoso simpático (SNS) e o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) (Berczi, 1998; Szabo, 1998).

O agente efetor da resposta ao agente estressor no SNC é o “sistema de estresse” que regula as atividades do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e do sistema nervoso autônomo (SNA). A ativação do HPA e do SNA resulta em elevação sistêmica de vários hormônios e neurotransmissores, dentre eles corticóides e catecolaminas, que agem em conjunto para manter a homeostase. Um estímulo estressor faz com que o hipotálamo secrete o hormônio de liberação de corticotrofina (CRH), capaz de induzir a liberação de adrenocorticotrofina (ACTH) pela hipófise anterior. A região cortical da glândula adrenal é o principal órgão-alvo desse hormônio hipofisário (Guyton & Hall, 1996 & Chrousos, 1998 e 2000). Tanto o esteróide cortisol como o dehidroepiandrosterona (DHEA) são produzidos e secretados pelo córtex adrenal, sinergicamente, em resposta ao ACTH e CRH (Shwartz, 2002; Shwartz *et al*, 2004; Kroboth *et al*, 1999).

Paralelamente, há a ativação do SNS, com liberação de catecolaminas, que opera como um mecanismo de emergência ou um sistema de alarme (Mello *et al*, 2003).

O efeito do estresse no organismo pode variar dependendo da duração, intensidade, resistência do indivíduo ao estresse, época de ocorrência, idade, duração do tempo entre a avaliação imunológica e aplicação do estresse. O estresse agudo é o que permanece por um período de minutos ou horas e estresse crônico é o que se repete por dias ou meses (Chrousos, 2000; Dhabhar, 1998).

Para estudar o efeito do estresse crônico no sistema imune e sua correlação com o envelhecimento, foi utilizado um modelo experimental, padronizado pelo laboratório Biologia do Sistema Linfóide e da Regeneração, ICB/UFMG coordenado pelo Profa. Débora d'Ávila Reis, que consiste em manter os camundongos parcialmente imobilizados dentro de tubos tipo Falcon por duas horas. Essa mesma seção de estresse

é repetida durante cinco dias consecutivos, sendo o processo todo considerado como um estresse crônico de contenção. Uma das principais conseqüências desse processo, vista logo nas primeiras sessões de estresse, é o quadro de alopecia e de diarreia moderados. A alopecia tem sido bem descrita em situações de estresse, por causar alterações na pele e no folículo capilar (Picardi & Abeni, 2001; Ruiz-Doblado, 2003; Spencer & Callen, 1987). Estudos desenvolvidos no laboratório Biologia do Sistema Linfóide e da Regeneração, ICB/UFMG, por Diniz (2005), observaram que a epiderme de camundongos BALB/c pré-púberes (5-6 semanas de idade) apresentava uma drástica redução das células epiteliais, afetando também os folículos pilosos, uma vez que estes são formados a partir de uma invaginação da epiderme. Houve também um intenso infiltrado de leucócitos na derme, caracterizado principalmente pela presença de neutrófilos. A simpatectomia induzida por um pré-tratamento com 6-hidroxi-dopamina foi capaz de inibir completamente a queda de pêlo. Pode-se, então, sugerir que o sistema nervoso simpático pode estar envolvido nas alterações observadas na pele induzidas pelo estresse (Diniz *et al*, 2005).

Existem várias evidências que comprovam a existência de um eixo entre o cérebro, o intestino e o sistema imune, o que pode explicar a associação entre o estresse e a inflamação intestinal. Já foi descrito na literatura que situações de estresse psicológico podem causar a “síndrome do colo irritável”. Esta patologia é caracterizada, em humanos, por dores abdominais, diarreia, desconforto e alteração da atividade intestinal (Santos *et al*, 2001; Hart & Kann, 2002; Moser, 2006; Spinelli, 2007). Além disso, o cérebro também pode controlar a motilidade intestinal, a função sensorial e secretória, via SNA. Este, quando estimulado, influencia o trato gastrointestinal, promovendo o peristaltismo e o relaxamento dos esfíncteres, permitindo assim a propulsão rápida dos conteúdos intestinais (Guyton & Hall, 1996; Hart & Kamm, 2002). Do mesmo modo, foi descrito que as fibras colinérgicas também induzem o desenvolvimento de úlceras gástricas durante o estresse (Hart & Kamm, 2002).

Segundo Santos e colaboradores (2001) e Söderholm e colaboradores (2002), o estresse crônico causa distúrbios intestinais, acompanhados de aumento da permeabilidade às macromoléculas e depleção da produção de muco no íleo e no cólon, mudanças nas células epiteliais (aumento das mitocôndrias e de autofagossomos) associado com o aumento de adesão e penetração de bactérias nos enterócitos, hiperplasia e ativação de mastócitos, aumento do infiltrado de neutrófilos e mononucleares. Em camundongos geneticamente deficientes para mastócitos, não foi

detectada nenhuma dessas alterações intestinais. Esses dados sugerem que o estresse crônico pode iniciar um processo inflamatório no intestino, evidenciando a importância dos mastócitos nesse evento (Santos *et al*, 2001; Söderholm *et al*, 2002; Hart & Kamm, 2002).

O estresse crônico altera a barreira intestinal, permitindo a penetração de bactérias oportunistas para dentro do epitélio e iniciando um infiltrado de células inflamatórias na *lamina propria*. Há também uma maior permeabilidade intestinal, com invasão de antígenos protéicos, diminuição da absorção de água e aumento da secreção de íons (Hart & Kamm, 2002).

A mucosa gastrointestinal é revestida por uma única camada de células epiteliais com propriedades absorptivas que está constantemente exposta às proteínas da dieta e outros materiais antigênicos (Brandtzaeg, 1998). A característica mais marcante, no entanto, da mucosa intestinal é a abundância do tecido linfóide associado a ela, denominada GALT (*gut association lymphoid tissue*), que representa o maior órgão linfóide do corpo. Já foi demonstrado que 80% das células formadoras de anticorpos, em camundongos, secretam IgA e estão localizados na *lamina propria* do intestino (Van der Heidjen *et al*, 1987).

O GALT é composto pelas placas de Peyer, um aglomerado de nódulos linfóides distribuídos ao longo do epitélio intestinal, pelos linfonodos mesentéricos, conjunto de linfonodos situados entre as alças intestinais, e pelos vários linfócitos espalhados ao longo da *lamina propria* e pelo epitélio do intestino. Na *lamina propria* são encontrados também fibroblastos, macrófagos, mastócitos e células NK.

Para analisarmos o efeito do estresse crônico no intestino delgado, foi utilizado tanto a morfologia deste órgão quanto a quantificação de IgA secretória (sIgA) presente no muco intestinal.

Assim como no timo, é possível observar também alterações morfológicas no intestino delgado de animais submetidos ao estresse crônico e dos idosos. No primeiro, as vilosidades estão mais retraídas, com aumento da *lamina propria* abaixo da epiderme. Já no segundo, ocorre também uma aparente diminuição dos vilos, porém a arquitetura intestinal está mais preservada.

Vários estudos indicam que há uma correlação entre os mastócitos e o sistema nervoso entérico (SNE). Os mastócitos gastrointestinais respondem a uma ampla variedade de estímulos incluindo alérgenos, bactéria, parasitas, neuropeptídeos e estresse. Quando ativadas, essas células liberam substâncias como a histamina e

triptase. Por sua proximidade com as fibras nervosas do trato gastrointestinal, os produtos de secreção dos mastócitos podem influenciar o SNE. Assim, fica evidente a relação recíproca entre estimulação nervosa e atividade mastocitária sendo a primeira capaz de modular a função e a ativação dos mastócitos (Bárbara, 2006). Segundo Santos e colaboradores (2001), durante o estresse crônico há um aumento do número de mastócitos e na proporção dessas células ativadas na mucosa intestinal (Santos *et al*, 2001).

Os mastócitos são considerados as principais células efetoras em reações de hipersensibilidade imediata e distúrbios alérgicos. A ligação de IgE alérgeno-específica no receptor de Fcε expresso na superfície desta célula resulta em degranulação de mediadores como a histamina, triptase e proteoglicanas, bem como de leucotrienos e prostaglandina. Os mastócitos também são capazes de produzir citocinas pró-inflamatórias e imunoreguladoras como a IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IL-16, TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ , e quimiocinas. Por outro lado, foi demonstrado que as mesmas podem ser ativadas independente de IgE, através de toxinas bacterianas, neuropeptídeos e o estresse (Theoharides & Cochrane, 2004; Bárbara, 2006).

Os mecanismos envolvendo a ativação de mastócitos durante o estresse não estão completamente esclarecidos. Há evidências que o hormônio liberador de corticotrofina (CRF) e seus receptores CRF-1 e CRF-2 presentes nessas células induzem a ativação e degranulação de histamina (Bárbara, 2006). De maneira oposta, foi descrito que a eminência média do hipotálamo é rica em mastócitos e estes são responsáveis pela histamina no cérebro. Na verdade, a ativação dos mastócitos hipotalâmicos leva a uma estimulação do eixo HPA (Theoharides & Cochrane, 2004; Cao *et al*, 2005).

O estresse ativa o eixo HPA através da secreção de CRF que normalmente suprime as respostas imunes. Entretanto, existem evidências mostrando que o mesmo pode promover inflamação devido à ativação dos mastócitos, como visto no estresse (Cao *et al*, 2005). Segundo Karalis e colaboradores (1991) e Stephanou e colaboradores (1990), macrófagos peritoniais de ratos e linfócitos de humanos também podem secretar CRH (revisado por Hart & Kamm, 2002). O papel do CRH como mediador dos efeitos do estresse nas funções gastrointestinais pode ser comprovado em experimentos envolvendo uma raça de ratos (*Lewis strain*) com uma resposta de CRH ao estresse deficiente. Nesses animais, foi observado o desenvolvimento de um forma muito severa de colite (Hart & Kamm, 2002).

Em ratos submetidos ao estresse crônico e sensibilizados com o antígeno HRP (*horseradish peroxidase*) foi observado um aumento de IgE HRP-específica, da secreção intestinal e de células inflamatórias, como também elevada expressão de IL-4 e decréscimo de IFN- $\gamma$  na mucosa do intestino, perfil de citocinas típico de eventos alérgicos. O tratamento com antagonista de CRH eliminou as manifestações de hipersensibilidade intestinal. Nesse caso, o estresse alterou a resposta imune a um antígeno induzindo sensibilização imune ao invés de tolerância oral (Yang *et al*, 2006).

Em condições normais, o muco, o peristaltismo e a IgA secretória previnem a aderência de bactérias no epitélio intestinal. O estresse altera não só mecanismos fisiológicos (peristaltismo e produção de muco), como também fatores imunológicos, como a quantidade de sIgA, podendo resultar em alterações na aderência de bactérias intestinais (Hart & Kamm, 2002).

A sIgA é um dímero, formada por duas moléculas de IgA, unidas pela cadeia J e contendo a proteína “peça de secreção”, que parece ser uma unidade importante na proteção dessa imunoglobulina contra a ação proteolítica do lúmen no intestino. Ela é produzida por plasmócitos que estão na *lamina propria* do intestino, mas é secretada para a luz intestinal, sendo encontrada no muco intestinal (Vaz & Faria, 1993). Em geral, a sIgA está presente em grandes concentrações em todas as secreções principalmente no leite, na saliva, no muco e na bile.

Durante o estresse crônico, detectamos um elevado nível dessa imunoglobulina no muco intestinal. O estresse crônico induz um estado inflamatório no intestino, apresentando um aumento da penetração bacteriana em seu epitélio, como descrito por Santos e colaboradores (2001), Hart e Kamm (2002) e Söderholm e colaboradores (2002). Esse fenômeno pode estar estimulando as células do sistema imune presentes nesse local e induzindo o aumento ou do número de plasmócitos secretores de sIgA ou da produção dessa imunoglobulina.

As placas de Peyer são o principal sítio de estimulação de linfócitos B para a produção de IgA no intestino (Jones & Cebra, 1974; Cebra *et al*, 1984). Estudos de transferência adotiva de células demonstraram que a maioria dos plasmócitos secretando IgA na *lamina propria* é derivada das placas de Peyer (Craig & Cebra, 1971). É provável que o aumento da estimulação antigênica de produtos bacterianos nas placas de Peyer comprometa a estimulação de linfócitos B levando a um conseqüente aumento na produção de IgA no intestino. Uma das maneiras de testar essa hipótese seria detectar a produção de IgA por célula utilizando anticorpos conjugados a um

marcador fluorescente específicos para moléculas presentes na superfície de plasmócitos na *lamina propria* do intestino delgado e para sIgA por técnicas de imunohistoquímica.

A regulação da síntese e secreção de sIgA não depende somente de estimulação antigênica, mas também sofre ação neuroendócrina. Assim, alterações na função neuroendócrina, como aquelas induzidas pelo estresse, podem afetar os níveis dessa imunoglobulina (Teeuw *et al*, 2004). Em humanos, foi detectado um aumento na produção de sIgA na saliva decorrente dos elevados níveis de cortisol salivar, em estudos envolvendo influências do estresse psicológico em estudantes (Evans *et al*, 1994), em adultos submetidos ao estresse mental (Ring *et al*, 2005) e até mesmo em treinadores de futebol durante uma competição (Kugler *et al*, 1996). No entanto, existem trabalhos contrastantes mostrando uma diminuição da produção de sIgA na saliva de adultos que relataram ter uma “vida estressante”. Entretanto, os autores afirmam que fatores como volume salivar coletado, o sexo, o grupo de indivíduos estudados e o estado ocupacional podem interferir nessas medições (Phillips *et al*, 2006).

Outra hipótese para explicar os altos níveis de sIgA no muco intestinal seria a ação dos mastócitos intestinais. Como dito anteriormente, essas células apresentam receptores de CRF em suas superfícies, hormônio secretado durante o estresse. Assim, o CRF poderia estimular a liberação de histamina pelos mastócitos, gerando um processo inflamatório intestinal e ativando linfócitos B a secretarem essa imunoglobulina.

Um dos principais parâmetros utilizados para avaliar a indução de estresse é o aumento sistêmico dos níveis de cortisol e DHEA. Foi realizada, então, uma medição dos níveis plasmáticos desses hormônios no sangue coletado momentos antes do sacrifício dos camundongos. Foi observado um aumento significativo, de aproximadamente 60%, nos níveis de cortisol e de 30 vezes nos níveis de DHEA plasmáticos quando comparados com os animais jovens e idosos. Essas substâncias têm sua ação comprovada sobre o sistema imune estimulando-o ou suprimindo-o. Assim, a ação de um estressor sobre o sistema imune é o resultado de várias interações com efeito regulador (Chrousos, 2000).

Apesar de existirem alguns trabalhos que afirmam que durante o envelhecimento, em humanos, também há um aumento dos níveis de cortisol, decorrente ao aumento de ACTH (Bauer, 2005), o mesmo não foi detectado em nossos resultados. A quantidade desse hormônio se assemelha aos encontrados no grupo

---

controle jovem. Isto talvez tenha ocorrido devido a diferenças na produção desses hormônios entre humanos e camundongos. Além do mais, em humanos, fatores psicológicos devem interferir na produção desses hormônios. Esse assunto é ainda controverso, uma vez que outros autores afirmam que, em idosos, há uma diminuição dos níveis dos hormônios adrenais (Straub, 2000).

Esses resultados demonstram que atividades neurais e endócrinas modificam funções imunológicas e também o contrário, respostas imunes alteram funções endócrinas e nervosas (Reichlin, 1993).

Durante o estresse, podemos ressaltar várias dessas outras modificações. Foi possível observar que a quantidade de leucócitos sanguíneos não se altera com o estresse crônico, mas ocorre uma alteração na proporção dos tipos celulares, com aumento de neutrófilos e diminuição de células mononucleares e eosinófilos em relação aos demais grupos experimentais. Esse fenômeno já foi descrito por Dhabhar e colaboradores, em 1996. As mudanças observadas na distribuição de leucócitos são mediadas pela secreção de hormônios, tanto cortisol quanto adrenalina, da glândula adrenal, uma vez que a adrenalectomia é capaz de reverter esses efeitos (Dhabhar, 1996).

Segundo Bauer e colaboradores (2001), a distribuição de linfócitos periféricos não é aleatória, sua circulação envolve expressão de moléculas de adesão, que possuem um papel central na transmigração celular. A  $\beta$ -2 integrina é expressa em todos os linfócitos e permite que a célula se ligue com maior avidéz às células endoteliais. Foi demonstrado que, durante o estresse, há um aumento da expressão de  $\beta$ -2 integrina pelos linfócitos, concomitantemente ao aumento de cortisol, o que poderia estar influenciando sua distribuição para outros compartimentos (Bauer, *et al*, 2001).

É importante lembrar que embora os leucócitos sanguíneos representem uma pequena proporção do número total de leucócitos do corpo, o sangue é um compartimento relevante que serve como um condutor pelo quais as células imunes trafegam entre os diferentes tecidos. Na verdade, a diminuição dos leucócitos sanguíneos era utilizada como uma detecção indireta de secreção de corticosterona antes da invenção de métodos mais diretos para a medição deste hormônio (Dhabhar, 1996).

Para se obter um dado mais concreto sobre a distribuição de leucócitos pelos diversos tecidos do corpo, poderíamos analisar, por meio da citometria de fluxo, a frequência das sub-populações de leucócitos (linfócitos, monócitos e granulócitos)

analisando os perfis celulares pelo seu tamanho por granulocidade. Uma de nossas perspectivas será realizar esse tipo de experimento.

Vários estudos têm demonstrado que, em camundongos, a exposição ao estresse pode induzir mudanças tanto na imunidade humoral quanto na celular. Durante o estresse agudo, há um aumento da capacidade de proliferação de células T e da produção de anticorpos. Por outro lado, o estresse crônico leva a uma perturbação da imunidade celular, baixa proliferação dos linfócitos T, desequilíbrio na secreção de citocinas e diminuição da produção de anticorpos. O mecanismo responsável por essas alterações não está muito bem documentado (Silberman, Wald & Genaro, 2003).

São raros os estudos envolvendo a produção de imunoglobulinas em camundongos durante o estresse. Silberman, Wald e Genaro (2003) relataram que há diferenças no perfil de imunoglobulinas secretadas durante o estresse agudo e crônico, evidenciando que a duração do estresse pode interferir de maneiras diferentes no sistema imune. De acordo com estes autores, no estresse agudo, foi observado um aumento de IgG sérica, mas o mesmo isotipo permanece inalterado no estresse crônico (Silberman, Wald & Genaro, 2003). Outros trabalhos mostram que a administração de glicocorticóides, em humano, pode tanto elevar quanto não possuir efeitos na produção de anticorpos plasmáticos (Fleshner *et al.*, 1996).

Com relação aos efeitos do estresse crônico na imunidade humoral, nossos resultados mostram que há somente um aumento nos níveis de IgE sérico, como visto nos animais idosos, enquanto que os demais isotipos e a quantidade de imunoglobulinas totais permanecem inalterados.

Foi descrito que os glicocorticóides podem elevar a síntese de IgE policlonal tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Adkis e colaboradores (1997) demonstraram que os corticóides sintéticos dexametasona e prednisolona aumentam a formação de IgE total por células mononucleares periféricas do sangue (PBMC) (Adkis *et al.*, 1997). Da mesma maneira, Nusslein, Weber e Kalden (1994) viram que todos os glicocorticóides sintéticos são capazes de potencializar a secreção de IgE em PBMC. Já os hormônios ACTH, somatotropina (STH), hormônio estimulador da tireóide (TSH), triiodotironina, tiroxina, epinefrina, noradrenalina, insulina e glucagon não possuem efeito na formação de IgE (Nusslein, Weber e Kalden, 1994).

O efeito supressivo dos glicocorticóides afeta a proliferação e a síntese de citocinas (dentre elas a IL-4) pelas células T, enquanto a produção de IgE pelas células B via estimulação CD40L/IL-4 não foi afetada (Adkis *et al.*, 1997). Yamashita e

colaboradores (1993) observaram que a síntese de IgE pelas células B, em humanos, é independente de monócitos e linfócitos T, e citocinas como a IL-6 pode induzir a síntese dessa imunoglobulina (Yamashita *et al*, 1993).

Foi demonstrado por Silberman e colaboradores (2004) que, no estresse crônico, a produção de imunoglobulinas dependentes de células T está reduzida, mas a resposta humoral independente desse mesmo tipo de célula permanece inalterada (Silberman *et al*, 2004).

Segundo Colonna-Romano (2003), as células NK também estimulam a síntese de imunoglobulinas em linfócitos B, independentemente de células T (Colonna-Romano, 2003). No nosso modelo, os altos níveis de IgE podem ter sido estimulados pelo aumento da secreção de IL-4 (citocina responsável pela mudança de classe para IgE) por células NK presente em algum centro germinativo fora o baço (uma vez que não foi detectado altos níveis dessa citocina nesse órgão).

Foi descrito que neuropeptídeos podem modular a produção de IgE por células B (Kimata *et al*, 1993). Como os mastócitos podem sofrer influências dessas substâncias, possivelmente essas células também participem da indução da síntese de IgE no estresse.

Embora as propriedades anti-inflamatórias dos glicocorticóides sejam bem documentadas, sua influência nos processos alérgicos ainda é controversa. Existem evidências que o estresse psicológico pode apresentar influências na asma. Foi descrito por Chida e colaboradores (2006) que camundongos BALB/c submetidos ao estresse físico ou psicológico, sensibilizados e desafiados com ovalbumina, apresentam uma aceleração do infiltrado de células mononucleares e eosinófilos nas vias aéreas, e esses efeitos parecem estar relacionados com a ativação do eixo HPA (Chida *et al*, 2006). Segundo Silverman e colaboradores (2005), níveis anormais de CRH e glicocorticóides têm sido implicados na patogenia da asma (Silverman *et al*, 2005). Mesmo com o aumento da susceptibilidade à asma durante o estresse, esses autores não observaram um aumento dos níveis IgE alérgico-específicos que poderiam induzir a ativação de mastócitos.

Segundo Loureiro e Wada (1993), o estresse agudo é capaz de interferir em fenômenos mais complexos como a síntese de anticorpos específicos para determinados antígenos. Esses autores mostram uma diminuição da produção de IgE sérica anti-ovalbumina após a imunização com esse mesmo antígeno durante o estresse (Loureiro & Wada, 1993).

Com o objetivo de aprofundar o estudo sobre outras possíveis alterações causadas pelo estresse crônico, foi avaliado o perfil fenotípico de linfócitos em outros órgãos linfóides como o baço, linfonodo mesentérico (LnM) e no sangue.

Sobre a população de linfócitos T, foi possível observar que, no baço e no sangue, há um predomínio de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> que apresentam um fenótipo de células mais imaturas (CD62L<sup>hi</sup>, CD45RB<sup>hi</sup>, CD28<sup>hi</sup>), quando comparados com os demais grupos experimentais. Por outro lado, no LnM, não foram encontradas as mesmas alterações, uma vez que as características das células se assemelham aos animais controles.

Manfro e colaboradores (2003) demonstraram que, durante o estresse, há um aumento de células T *naive* (CD45RB<sup>hi</sup>) e da expressão de CD62L (Manfro et al, 2003). Garavini (2006) relatou que, no estresse crônico, o baço apresenta alterações semelhantes observadas no timo. Há uma redução da população CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> e aumento da frequência de linfócitos CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> e de células imaturas CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>.

A frequência de células T reguladoras não se altera durante o estresse crônico nem com o envelhecimento. Essa sub-população de linfócitos T possui um papel importante na supressão das células T CD4<sup>+</sup> efetoras (Almeida *et al*, 2002 e 2006). Correspondendo a 5-10% do *pool* de células T CD4<sup>+</sup> periféricas em humanos e em camundongos, como visto em nossos resultados, essa sub-população se origina no timo e representa uma linhagem específica cujo desenvolvimento é dependente da expressão do fator de transcrição codificado pelo gene Foxp3 (Sakaguchi, 2004; Hori *et al*, 2003).

Com relação aos linfócitos B, uma das mudanças mais marcantes é a diminuição da frequência de células B ativadas no LnM e no sangue. É interessante notar que, no sangue, há uma redução dos linfócitos B totais, mas, ao mesmo tempo, a frequência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> se eleva. Bauer e colaboradores (2005) relataram uma diminuição do número de linfócitos B no sangue e acúmulo de auto-anticorpos, em humanos (Bauer *et al*, 2005). Provavelmente, deve estar ocorrendo um mecanismo compensatório para manter o *pool* de linfócitos totais constante.

De maneira geral, durante o estresse crônico, o perfil fenotípico dos linfócitos se mostrou semelhante àquele apresentados pelas células virgens. Em contrapartida, no envelhecimento, as células se apresentam num estágio mais avançado de ativação e de memória.

Ao levarmos em consideração que, no estresse, há uma acentuada atrofia do córtex tímico, a capacidade de geração de novas células T está comprometida. No entanto, foi detectado um aumento de células imaturas durante esse processo. Este fato nos leva a crer que provavelmente outros sítios de geração de linfócitos, como a medula óssea, podem estar sofrendo influências do cortisol.

Com relação ao padrão de citocinas sintetizadas pelos esplenócitos *in vitro*, foi observado um aumento da secreção de IL-2 pelas células quando estimuladas por Con A ou com anticorpos anti-CD3 e anti-CD28. No entanto, não foram detectadas diferenças em comparação ao grupo controle jovem. Da mesma forma, a produção de IFN- $\gamma$  e de IL-6 nos animais estressados também se mostrou mais elevada quando as células eram submetidas a algum tipo de estímulo, com relação aos animais controle. Até mesmo os níveis de IL-6 plasmáticas também estão aumentados durante o estresse crônico. Já os níveis de TNF- $\alpha$  se mantiveram comparáveis aos do grupo controle. Em camundongos idosos, foi encontrado esse mesmo resultado.

Muitos autores relataram que, quando os indivíduos eram submetidos ao estresse, havia uma redução da capacidade de síntese dessas citocinas decorrente da brusca liberação de cortisol durante o estresse. Nesse caso, foi descrito que esse hormônio apresenta um efeito imunossupressor principalmente na produção de citocinas inflamatórias. No entanto, nossos dados contradizem esses trabalhos da literatura.

Segundo Besedovsky & Del Rey (1996) e Kusuhara (2006), células em estágios avançados de ativação podem ser afetadas diferentemente em relação a células imaturas na presença de cortisol. Como os eventos de ativação, proliferação e diferenciação de células estimuladas pelas APCs precedem o aumento dos níveis de cortisol durante a ativação do eixo HPA, algumas funções do sistema imune não são afetadas (Besedovsky & Del Rey, 1996; Kusuhara, 2006). Provavelmente, os elevados níveis de IL-2 e IFN- $\gamma$  encontrados foram produzidos pelas células mais ativadas, que não foram afetadas pela ação supressora do cortisol. Esses tipos de células respondem mais prontamente a um estímulo do que as células imaturas, secretando quantidades de algumas citocinas que podem predominar sobre outras.

Vários estudos têm mostrado que os estresses físico e psicológico aumentam os níveis plasmáticos de IL-6 pela liberação de cortisol. Esta interleucina, além de possuir um perfil pró-inflamatório, também apresenta atividade anti-inflamatórias. Neste último caso, ela é capaz de regular negativamente a produção de TNF- $\alpha$ , uma citocina do tipo

pró-inflamatória, durante o estresse. Segundo Nukina e colaboradores (1998), animais tratados com anticorpos anti-IL-6 durante ou após as sessões de estresse de contenção apresentam altos níveis de TNF- $\alpha$  (principalmente imediatamente a cessação do estresse, permanecendo até 2 horas após o mesmo) (Nukina *et al*, 1998). Esses mesmos autores, em 2001, descreveram que a liberação de IL-6 se eleva 1 hora após a sessão de estresse e decai gradualmente. Nesse mesmo período, foi detectado o aumento da expressão do RNA mensageiro (mRNA) de IL-6 no fígado, mas não no baço e nos rins, inferindo que esse órgão é a principal fonte responsável pelo aumento plasmático dessa citocina induzida pelo estresse (Nukina *et al*, 2001).

Dados na literatura afirmam que, durante o estresse, há um predomínio da produção de citocinas tipo Th2, como IL-4 e IL-10. A IL-4 é a principal citocina responsável pela mudança de isotipo para IgE nos linfócitos B ativados. Como em nossos resultados foi detectado um aumento dos níveis dessa classe de imunoglobulina no soro dos animais estressados, tal fenômeno poderia ser explicado pelo aumento da produção de IL-4 pelos esplenócitos. No entanto, a secreção de IL-4 no baço, assim como a de IL-10, permanece inalterada quando comparada com aquela dos animais controles. Provavelmente, a produção de IL-4 pode estar elevada em outros sítios de ativação de linfócitos B acarretando aumento sérico de IgE.

A produção de IgE não foi inibida pelos elevados níveis de IFN- $\gamma$ , evidenciando que, de alguma forma, outras substâncias podem estar induzindo sua síntese.

È importante ressaltar ainda que a síntese de IL-10 diminui quando as células são estimuladas, em relação à sua produção em níveis basais (mantidas somente com meio). O mesmo fenômeno é visto nos demais grupos. Provavelmente, os tipos de estímulos utilizados acarretam na ativação de células capazes de modular a secreção de citocinas privilegiando um padrão de interleucinas (predomínio de Th1) comparados com outros (Th2). Vários trabalhos relataram que a produção de IL-4 e de IL-10 tanto pode aumentar quanto permanecer inalteradas durante o estresse (Elenkov & Chrousos, 1999; Besedovsky & Del Rey, 2001).

Apesar de a técnica ter sido recentemente padronizada, não foi possível realizar os experimentos envolvendo a remoção cirúrgica das glândulas adrenais até o momento. No entanto, de acordo com a literatura, é possível prever que a adrenalectomia em camundongos jovens submetidos ao estresse crônico pode reverter grande parte das alterações decorrentes deste processo, principalmente a inibição da involução tímica (Berczi, 1998).

Neste estudo, podemos perceber que o envelhecimento e o estresse crônico são caracterizados por alterações marcantes no organismo, principalmente no sistema imune. Cada um desses processos está associado a mudanças imunológicas exclusivas, mas também podemos encontrar semelhanças entre eles.

A senescência é caracterizada por apresentar diferenças tanto na imunidade humoral quanto na celular. Podemos citar, resumidamente, que os níveis de imunoglobulinas séricas estão elevados, correspondendo provavelmente aos anticorpos autoreativos, que se encontram elevados nessa época da vida. Há uma preponderância de linfócitos T e B ativados e células B1a nos principais órgãos linfóides e aumento, já esperado, da produção de citocinas como IFN- $\gamma$  e IL-4 no baço.

Da mesma forma, o estresse crônico também é capaz de influenciar o sistema imune. Uma modificação interessante, observada durante o estresse crônico, é o predomínio de linfócitos T e B expressando fenótipo de células imaturas. Além disso, o estresse crônico por contenção induziu aumento de neutrófilos e redução de linfócitos no sangue, bem como aumento dos níveis dos hormônios cortisol e DHEA, conhecidos como os principais adrenocorticóides secretados durante a ativação do eixo HPA.

Se, por um lado, no estresse crônico, determinadas alterações do sistema imune são opostas aos observados durante o envelhecimento, por outro, alguns aspectos são bastante similares. Podemos citar os elevados níveis de IgE sérica e sIgA no muco intestinal, aumento na produção de IFN- $\gamma$  no baço, além da drástica atrofia da região cortical do timo. A literatura descreve ainda que ambos os processos estão acompanhados de um aumento da susceptibilidade ao desenvolvimento de doenças como infecções, doenças autoimunes e câncer, diminuição da produção de anticorpos antígeno-específicos, baixa capacidade proliferativa de linfócitos T, dentre outros.

Todas essas alterações se dão de maneira contínua e gradual ao longo da vida na senescência, enquanto que no estresse crônico, elas são causadas por modificações bruscas e repentinas.

Muitos autores acreditam que o estresse crônico seja considerado uma forma de envelhecimento prematuro. Já foi descrito que, durante o estresse, as células apresentem biomarcadores moleculares como aumento do estresse oxidativo, baixa atividade da telomerase e encurtamento dos telômeros, fenômenos utilizados para se determinar a longevidade e a senescência celular (Epel *et al*, 2004; Toussaint *et al*, 2002<sup>a</sup> e 2002<sup>b</sup>).

É relevante ressaltar que o nosso modelo de estresse crônico corresponde a apenas 5 dias de indução. Se levarmos em conta que, ao longo da vida, o homem está

constantemente exposto a diversos agentes estressores, o tempo de estresse empregado foi insuficiente para que as mesmas mudanças no sistema imune tanto no estresse quanto no envelhecimento sejam perceptíveis principalmente na periferia. Por exemplo, em humanos, Bauer (2005) observou que, em ambos os processos, haveria uma diminuição de células T virgens, ao contrário encontrado em nossos resultados.

Podemos concluir que não somente o tipo e a intensidade, como também o tempo de duração do estresse aplicado são extremamente relevantes para o estudo de seus efeitos no organismo. Com isso, se aumentarmos o tempo de exposição ao estresse poderíamos observar outras modificações imunológicas que se assemelhem ainda mais com o envelhecimento.

## **6. CONCLUSÕES**

Os animais jovens de 9 semanas de idade submetidos ao estresse de contenção apresentaram as seguintes alterações: diarreia, alopecia moderadas na região torácica, aumento da porcentagem de neutrófilos com diminuição da porcentagem de linfócitos e aumento dos níveis plasmáticos de cortisol e DHEA.

Tanto nos animais estressados quanto nos idosos ocorre involução tímica, com diminuição do peso e da celularidade do órgão e redução da região cortical. Além disso, foi possível observar também um aumento dos níveis séricos de IgE, de sIgA no intestino e o predomínio da produção de citocinas pró-inflamatórias *in vitro* e no plasma.

No entanto, na periferia, algumas características entre ambos os processos se mostraram bastantes distintas, prevalecendo um perfil fenotípico de linfócitos T virgens nos animais estressados e de memória/ativação nos idosos.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Abbas, AK & Lichtman, AH. (2005). *Imunologia celular e molecular*, 5ª edição, Elsevier, São Paulo/SP.

Akdis CA, Blesken T, Akdis M, Alkan SS, Heusser CH, Blaser K. (1997). Glucocorticoids inhibit human antigen-specific and enhance total IgE and IgG4 production due to differential effects on T and B cells in vitro. *European Journal of Immunology*; 27 (9): 2351-7

Adolfsson, O; Huber, BT & Meydani, SN. (2001). Vitamin E- Enhanced IL-2 Production in old mice: Naïve but not Memory T cells Show Increased cell Division Cycling and IL-2-Producing Capacity. *The Journal of Immunology*, 167:3809-3817.

Almeida, ARM; Legrand, M; Papiernick, N & Freitas, AA. (2002). Homeostasis of peripheral CD4+ T cells: IL-2Ra and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4+ T cells numbers. *Journal of Immunology*, 169: 4850-60

Almeida, ARM; Zaragoza, B & Freitas, AA (2006). Indexation as a novel mechanism of lymphocyte homeostasis: the number of CD4+CD25+ regulatory T cells is indexed to the number of IL-2-producing cells. *Journal of Immunology*, 177: 192-200

Andrade, MC. (2003). *Tolerância e inflamação: um estudo da imuno-regulação em modelos experimentais de gastrite e colite induzidos por álcool*. Tese de doutorado, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG

Andrew, D & Aspinall, R.(2002). Age-Associated Thymic Atrophy is Linked to a Decline in IL-7 Production. *Experimental Gerontology*, 37: 455-463

Aspinall, R (1997). Age-associated thymic atrophy in the mouse is due to deficiency affecting rearrangement of the TCR during intrathymic T cell development. *Journal of Immunology*, 158: 3037-3045

Aspinall, R (2003). Age-related changes in the function of T cells. *Microscopy Research and Technique*, 62 (6): 508-13

Aspinall, R & Andrew, D. (2001). Age-Associated Thymic Atrophy is not Associated with a Deficiency in the CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>CD3<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> Thymocyte Population. *Cellular Immunology* 212:150-157

Barbara, G; Stanghellini, V; De Giorgio, R & Corinaldesi, R. (2006). Functional gastrointestinal disorders and mast cells: implications for therapy. *Neurogastroenterology Motility*, 18: 6-17

Bauer, ME. (2005). Stress, glucocorticoids and ageing of the immune system. *Stress*. 8(1): 69-83.

Bauer, ME; Perks, P ; Lightman, SL ; Shanks, N. (2001). Are adhesion molecules involved in stress-induced changes in lymphocyte distribution? *Life Sciences*. 69: 1167-79.

Bauer, ME ; Perks, P ; Lightman, SL ; Shanks, N. (2001). Restraint stress is associated with changes in glucocorticoid immunoregulation. *Physiology & Behavior*. 73: 525-32.

Berczi I (1998) The Stress Concept and Neuroimmunoregulation in Modern Biology. *Annals New York Academy of Sciences*.

Besedovsky, HO ; del Rey, A. (1996). The immune-neuroendocrine network. *Psychoneuroimmunology: an interdisciplinary introduction*. Kluwer. Academic/Plenum Publishers New York, NY: 223-34.

Brandtzaeg P, Bjerke K. (1989) Human Peyer's patches: lympho-epithelial relationships and characteristics of immunoglobulin-producing cells. *Immunological Investigations*, 18 (1-4): 29-45

Bodey, B; Bodey, B Jr; Siegel, SE & Kaiser, HE. (1997). Dendritic Type, Accessory cell within the Mammalian Thymic Microenvironment. Antigen Presentation in the Dendritic Neuro-Endocrine-Immune Cellular Network. . *In vivo*, Jul-Agu;11(4):351-70

Bodey, B ; Bodey, B Jr; Siegel, SE & Kaiser, HE. (1997). Involution of the Mammalian Thymus, one of the Leading Regulators of Aging. *In vivo*, Sep-Oct;11(5):421-40

Brown-Borg, HM ; Borg, KE ; Meliska, CJ & Bartke, A. (1996). Dwarf mice and the ageing process. *Nature*. 384: 33

Butcher, SK & Lord, JM. (2004) Stress Response and Innate Immunity: Ageing as a Contributory Factor. *Ageing Cell*, 3(4): 151-160

Calcagni, E & Elenkov, J (2006). Stress System Activity, Innate and T helper Cytokines, and Susceptibility to Immune related Disorders. *Annals of the New York Academy of Science*, 1069: 62-76

Cao, J; Papadopoulou N; Kempuraj, D; Boucher, WS; Sugimoto,K; Cetrulo, CL &. Theoharides, TC. (2005). Human Mast Cells Express Corticotropin-Releasing Hormone (CRH) Receptors and CRH Leads to Selective Secretion of Vascular Endothelial Growth Factor1. *The Journal of Immunology*, 174: 7665–7675.

Carroll, MC. (2004).The complement system in B cell regulation. *Molecular Immunology*, 41: 141–146

Cebra, JJ; Komisar, JL. (1984). CH isotype switching during normal B lymphocytes to epithelial cells. *Annual Review of Immunology*, 2: 493-548

Cherukuri, A; Cheng,PC & Pierce1, SK. (2001).The Role of the CD19/CD21 Complex in B Cell Processing and Presentation of Complement-Tagged Antigens. *The Journal of Immunology*, 167: 163–172.

Chida Y, Sudo N, Sonoda J, Hiramoto T, Kubo C. Childhood Psychological Stress Exacerbates Adult Mouse Asthma by Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006 Nov 16;

Chrousos, GP. (1998). Stressors, stress, and neuroendocrine integration of the adaptive response: The 1997 Hans Selye memorial lecture. *Annals New York Academy of Science.* 311-35.

Chrousos, GP. (2000) The stress response and immune function: clinical implications: The 1999 Novera H. Spector lecture. *Annals New York Academy of Science.* 38-67.

Coe, CL (1996) Concepts and Models of Immunological Change During Prolonged Stress. *Psychoneuroimmunology: an interdisciplinary introduction.* Kluwer Academic/Plenumpublishers ;

Coe, CL ;Lubach, GR ; Karaszewski JW & Ershler WB (1996) Prenatal Endocrine Activation Alters Postnatal Cellular Immunity in Infant Monkes. *Brain, Behavior, and Immunity*, 10:221-234

Collaziol, D ; Luz, C ; Dornelles, F ; da Cruz, IM ; Bauer, ME. (2004). Psychoneuroendocrine correlates of lymphocyte subsets during healthy ageing. *Mechanisms of Ageing and Development.* 125: 219-27.

Colonna-Romano, G; Bulati, M; Aquino, A; Scialabba, G; Candore, G; Lio, D; Motta, M; Malaguarnera, M & Caruso, C. (2003).B cells in the aged: CD27, CD5, and CD40 expression. *Mechanisms of Ageing and Development*, 124: 389-393

Comin, F; Martins-Filho, O; Speziali, E; Gazzinelli, A; Bethony, J; Correa-Oliveira, R & Faria, AMC. (2007). Aging and Toll-like receptor expression by NK and Dendritic cells in Chronic human Schistosomiasis. (submetido).

Craig, SW & Cebra, JJ. (1971). Peyer's patches: an enriched source of precursors for IgA-producing immunocytes in the rabbit. *Journal of Experimental Medicine*, 134(1): 188-200

Daynes RA, Araneo BA, Ershler WB, Maloney C, Li GZ, Ryu SY. (1993). Altered regulation of IL-6 production with normal aging. Possible linkage to the age-associated decline in dehydroepiandrosterone and its sulfated derivative. *Journal of Immunology*; 150 (12): 5219-30

Demetrikopoulos, MK ; Keller, SE & Schleifer, SJ. (1996). Stress effects on immune function in rodents. *Psychoneuroimmunology: an interdisciplinary introduction*. Kluwer. Academic/Plenum Publishers New York, NY: 259-75.

Dhabhar, FS. (2000). Acute stress enhances while chronic stress suppresses skin immunity: The role of stress hormones and leukocyte trafficking. *Annals New York Academy of Science*. 876-93.

Dhabhar, FS. (1996). Stress-induced enhancement of cell-mediated immunity. *Annals New York Academy of Science*. 359-72.

Dhabhar, FS ; Miller, AH ; McEwen, BS & Spencer, RL. (1996). Stress-induced changes in blood leukocyte distribution. *The Journal Immunology*. 157: 1638-44.

Diniz, ER; Foschetti, DA; Carvalho; LSC; Faria, AMC; Guerra, LB & Reis, DDA. (2005). Stress-induced leucocyte migration to skin and hair-loss are observed in immature, but not mature mice. *1º Congresso Iberoamericano de Neuroimunomodulação*: 108

Dominguez-Gerpe, L ; Rey-Mendez, M. (1998). Age-related changes in primary and secondary immune organs of the mouse. *Immunol Invest*. 27(3): 153-65.

Dunn, AJ (1993). Infection as a Stressor: a Cytokine-Mediated Activation of the Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis. *Ciba Foundation Symposium*, 172: 239-42

Dunn, AJ (2000). Cytokine Activation in HPA Axis. *Annals of the New York Academy of Science*, 917: 608-17

Elenkov, IJ & Chrousos, GP. (1999). Stress hormones, Th1/Th2 patterns, Pro/Anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease. *TEM*. 10(9): 359-68

Engelmann, M; Landgraf, R & Wotjak, CT. (2004). The Hypothalamic-Neurohypophysial System Regulates the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis under Stress: an old Concept Revisited. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 25 (3-4): 132-149

Epel, ES; Blackburn, EH; Lin, J; Dhabhar, FS; Adler, NE; Morrow, JD & Cawthon, RM. (2004). Accelerated Telomere Shortening in Response to Life Stress. *PNAS*, 101(49): 17312-15

Ershler WB. (1993). Interleukin-6: a cytokine for gerontologists. *Journal of the American Geriatrics Society*; 41(2): 176-81

Ershler WB, Sun WH, Binkley N. (1994). The role of interleukin-6 in certain age-related diseases. *Drugs and Aging*; 5(5): 358-65

Evans P, Bristow M, Hucklebridge F, Clow A, Pang FY. (1994). Stress, arousal, cortisol and secretory immunoglobulin A in students undergoing assessment. *The British Journal of Clinical Psychology*; 33: 575-6

Faria, AMC ; Ficker, SM ; Speziali, E ; Menezes, JS ; Stransky, B ; Rodrigues, VS ; Vaz, NM. (1998). Aging affects oral tolerance induction but not its maintenance in mice. *Mechanisms of Ageing and Development*. 102: 67-80.

Faria, AMC & Weiner, HL. (2005). Oral tolerance. *Immunological Reviews*, 206: 232–259

Feindel, W. (2003). Osler and the “Medico-Chirurgical Neurologists”: Horsley, Cushing and Penfield. *Journal of Neurosurgery*, 99(1): 188-99.

Ferrari, E ; Cravello, L ; Muzzoni, B ; Casarotti, D ; Paltro, M ; Solerte, SB ; Fioravanti, M; Cuzzoni, G ; Pontiggia, B & Magri, F. (2001). Age-related changes of the

hypothalamic-pituitary-adrenal axis: pathophysiological correlates. *European Journal of Endocrinology*. 144: 319-29.

Fleshner, M., Brennan, F.X., Nguyen, K., Watkins, L.R., Maier, S.F. (1996). RU-486 blocks differentially suppressive effect of stress on in vivo anti-KLH immunoglobulin response. *American Journal of Physiology*, 271: 1344–1352.

Forsey, RJ ; Thompson, JM ; Ernerudt, J ; Hurst, TL ; Strindhall, J ; Johansson, B ; Nilsson, BO & Wikby, A. (2003). Plasma cytokine profiles in elderly humans. *Mechanisms of Ageing and Development*. 124: 487-93.

Franceschi, C ; Bonafè, M ; Valensin,S ; Olivieri,F ; Luca,M ; Ottaviani,E & Benedictis,G (2000) Inflamm-aging. An Evolutionary Perspective on Immunosenescence. *Annals of the New York Academy of Science*; 908:244-54

Fukui, Y ; Sudo, N ; Yu, XN ; Nukina, H ; Sogawa, H & Kubo, C. (1997). The restraint stress-induced reduction in lymphocyte cell number in lymphoid organs correlates with the suppression of in vivo antibody production. *Journal of Neuroimmunology*. 79: 211-17.

Gaillard, RC ; Daneva, T ; Hadid, R ; Muller, K & Spinedi, E. (1998).The hypothalamo-pituitary-adrenal axis of athymic Swiss nude mice. The implications of T lymphocytes in the ACTH release from immune cells. *Annals New York Academy of Science*, 840: 480-97.

Gaillard, RC ; Spinedi, E ; Chautard, T & Pralong, FP. (2000). Cytokines, leptin, and the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *Annals New York Academy of Science*. :917, 647-57.

Geenen, V ; Martens, H ; Brilot, F ; Renard, C ; Franchimont, D & Kecha, O. (2000) Thymic neuroendocrine self-antigens: Role in T-cell development and central T-cell self-tolerance. *Annals New York Academy of Sciences*. 917: 710-23.

Garavini, MSC. (2006). Alterações induzidas pelo estresse crônico de contenção na diferenciação de linfócitos T em camundongos BALB/c. Dissertação de mestrado, Departamento de Morfologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG

Goletz TJ, Smith JR, Pereira-Smith OM. (1994). Molecular genetic approaches to the study of cellular senescence. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*; 59: 59-66

Greer, S. (2000) What's in a name? Neuroimmunomodulation or Psychoneuroimmunology. *Annals New York Academy of Sciences*.917: 569-74.

Groux, H; O'Garra, A; Bigler,M; Rouleau, M; Antonenko, S; Vries, JE & Roncarolo, MG. (1997). A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*, 389: 737-42

Hadden, JW. (1998)Thymic endocrinology. *Annals New York Academy of Sciences*.840: 353-57

Hardy, RR & Hayakawa, K. (2001). B cell development pathways. *Annual Review of Immunology*, 19: 595–621

Harris, NR & Rumbaut, RE. (2001) Age-related responses of the microcirculation to ischemia-reperfusion and inflammation. *Pathophysiology*. 8:1-10.

Hart, A. & Kamm, MA. (2002). Review article: mechanisms of initiation and perpetuation of gut inflammation by stress. *Aliment Pharmacol Ther* ; 16: 2017–2028.

Hayakawa, K & Hardy, RR. (2000). Development and function of B-1 cells. *Current Opinion in Immunology*, 12: 346–353

Hayakawa K, Hardy RR, Honda M, Herzenberg LA, Steinberg AD, Herzenberg LA. (1984) Ly-1 B cells: functionally distinct lymphocytes that secrete IgM autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 81(8):2494-8.

- Haynes, L ; Linton, PJ & Swain, SL. (1997). Age-related changes in CD4 T cells od T cell receptor transgenic mice. *Mechanisms od Ageing an Development*. 93: 95-105
- Herrero, C ; Sebastián, C ; Marqués, L ; Comalada, M ; Xaus, J ; Valledor, AF ; Lloberas, J & Celada, A. (2002). Immunosenescence of macrophages: reduced MHC class II gene expression. *Experimental Gerontology*. 37: 389-94.
- Holmes, N. (2005). CD45: all is not yet crystal clear. *Immunology*. 117: 145-55
- Hori, S; Nomura, T & Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cells development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 299: 1057-61
- Iwakabe, K ; Shimada, M ; Ohta, A ; Yahata, T ; Ohmi, Y ; Habu, S & Nishimura, T. (1998). The restraint stress drives a shift in Th1/Th2 balance toward Th2-dominant immunity in mice. *Immunology Letters*. 62: 39-43.
- Jones, PP & Cebra, JJ. (1974). Restriction of gene expression in B lymphocytes and their progeny. Endogenous IgA and IgM on the membranes of different plasma cells precursors. *Journal of Experimental Medicine*, 140: 966-76
- Kimata H, Yoshida A, Ishioka C, Mikawa H (1993). Differential effect of vasoactive intestinal peptide, somatostatin, and substance P on human IgE and IgG subclass production. *Cellular Immunology*; 149(2):450
- Kugler J, Reintjes F, Tewes V, Schedlowski M. (1996). Competition stress in soccer coaches increases salivary Immunoglobulin A and salivary cortisol concentrations. *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*; 36 (2): 117-20
- Kusuhara, M; Isoda, K & Ohsuru, F (2006). Interleukin-1 and Occlusive arterial Disease. *Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry*, 4(3): 229-35
- Kvetnanský, R & Sabban, EL. (1998). Stress and molecular biology of neurotransmitter-related enzymes. *Annals New York Academy of Science*. 840: 342-56.

Lauc, G ; Dabelic, S ; Supraha, S & Floegel, M. (1998). Glycobiology of stress. *Annals New York Academy of Science*. 851: 397-403.

LeMaout J; Delassus, S; Dynall, R; Nikolic, Z; Kourilsky, P & Weksler ME. (1997a). Clonal expansions of B lymphocytes in old mice. *Journal of immunology*, 159: 3866-74

LeMaout J, Szabo P, Weksler ME. (1997b). Effect of age on humoral immunity, selection of the B-cell repertoire and B-cell development. *Immunology Reviews*, 160: 115-26

LeMaout J; Manavalan, JS; Dynall, R; Szabo P; Nikolic, Z & Weksler ME. (1999). Cellular basis o B cells clonal populations in old mice. *Journal of immunology*, 162: 6384-91

Mackall, CL;& Gress, RE (1997) Thymic Aging and T-cell Regeneration. *Immunological Reviews*, 160:91-102

Madden, KS ; Bellinger, DL ; Felten, SY ; Snyder, E ; Maida, ME & Felten, DL. (1997). Alterations in sympathetic innervation of thymus and spleen in aged mice. *Mechanisms of Ageing and Development*. 94: 165-75.

Madden, KS ; Thyagarajan, S & Felten, DL. (1998). Alterations in sympathetic noradrenergic innervation in lymphoid organs with age. *Annals New York Academy of Sciences*. 840: 262-68

Manfro, GG ; Netto, CA ; Pollack, M ; Mezzomo, KM ; Preffer, F & Kradin, R. (2003). Stress regulates the lymphocyte homing receptor CD62L (L-Selectin). *Arq Neuropsiquiatr*. 61(1): 20-24.

Maroder, M ; Bellavia, D ; Vacca, A ; Felli, MP & Screpanti, I. (2000). The thymus at the crossroad of neuroimmune interactions. *Annals New York Academy of Science*. 917: 741-47.

Mello, AAF ; de Mello, MF ; Carpenter, LL & Price, LH. (2003). Update on stress and depression: the role of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 25(4): 231-38.

Menezes, JS. (2001). O papel imunobiológico das proteínas da dieta. Tese de doutorado, Departamento de Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo/SP

Moser, G. (2006). Functional gastrointestinal disorders. *Wiener Medizinischer Wochenschrift.* 156 (15-16): 435-40

Moynihan, JA & Stevens, SY. (2001). Mechanisms of stress-induced modulation of immunity in animals. *Psychoneuroimmunology.* 3(2): 227-49.

Nukina, H; Sudo, N; Komaki, G; Yu, X; Mine, K & Kubo, C. (1998). The restraint stress-induced elevation in plasma interleukin-6 negatively regulates the plasma TNF-alpha levels. *Neuroimmunomodulation,* 5: 323-7

Nusslein HG, Weber G, Kalden JR. (1994). Synthetic glucocorticoids potentiate IgE synthesis. Influence of steroid and nonsteroid hormones on human in vitro IgE secretion. *Allergy;* 49 (5): 365-70.

Ordemann, R ; Hutchinson, R ; Friedman, J ; Burakoff, SJ ; Reddy, P ; Duffner, U ; Braun, TM ; Liu, C ; Teshima, T & Ferrara, JLM. (2002). Enhanced allostimulatory activity of host antigen-presenting cells in old mice intensifies acute graft-versus-host disease. *J. Clin. Invest.* 109: 1249-56.

Padgett, DA; Marucha, PT & Sheridan, JF. (1998). Restraint Stress Slows Wound Healing in Mice. *Brain Behavior and Immunity,* 12(1): 64-73

Pawelec, G; Mariani, E; Bradley, B & Solana, R. (2000). Longevity in vitro of Human CD4+ T helper cells Clones Derived from Young Donors and Elderly Donors, or from Progenitor cells: age-Associated Differences in cell Surface Molecule Expression and Cytokine Secretion. *Biogerontology,* 1: 247-54

Perssons, JH; Berkenbosch, K; Schornagel T; Thepen, F & Kraal, G. (1995). Increase Specific IgE Production in lungs after the Induction of Acute Stress in rRats. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 95: 765-70

Peterson, PK; Chao, CC; Carson, P; Hu, S; Nichol, K & Janoff, EN. (1994). Levels of tumour-necrosis-factor-alpha, interleukin-6, interleukin-10 and transforming growth factor-beta are normal in serum of the health elderly. *Clinical Infectious Disease*, 19: 1158-59

Phillips AC, Carroll D, Evans P, Bosch JA, Clow A, Hucklebridge F, Der G.(2006). Stressful life events are associated with low secretion rates of immunoglobulin A in saliva in the middle aged and elderly. *Brain Behavior and Immunity*; 20(2):191-7

Picardi A, Abeni D. (2001). Stressful life events and skin diseases: disentangling evidence from myth. *Psychotherapy and Psychosomatics*, 70 (3): 118-36

Pierpaoli, W. (1998) Neuroimmunomodulation of aging: A program in the pineal gland. *Annals New York Academy of Sciences*. 840: 491-97.

Plum, J ; de Smedt, M ; Verhasselt, B ; Kerre, T ; Vanhecke, D ; Vandekerckhove, B & Leclercq, G. (2000). Human T lymphopoiesis: *In vitro* and *in vivo* study models. *Annals New York Academy of Sciences*. 917: 725-31.

Pollack M, Phaneuf S, Dirks A, Leeuwenburgh C. (2002). Brain cell death in stress and in aging: role of oxidative stress and energy metabolism. *Annals New York Academy of Science*. 430

Pulsatelli, L ; Meliconi, R ; Mazzetti, I ; Dolzani, P ; Meneghetti, A ; Neri, S ; Silvestri, T ; ravaglia, G ; Forti, P ; Facchini, A & Mariani, E. (2000). Chemokine production by peripheral blood mononuclear cells in elderly subjects. *Mechanisms of Ageing and Development*. 121: 89-100.

Raison, CL & Miller, AH. (2003). When not Enough is too Much: the Role of Insufficient Glucocorticoid Signaling in the Pathophysiology of Stress-Related Disorders. *American Journal of Psychiatry*, 160: 1554-65

Reichlin, MDS. (1993). Neuroendocrine-immune interactions. *The New England Journal of Medicine*. 21: 1246-53.

Reichlin, S. (1998). Alternative pathways of neural control of the immune process. *Annals New York Academy of Science*. 840: 301-16.

Ring C, Carroll D, Hoving J, Ormerod J, Harrison LK, Drayson M. (2005). Effects of competition, exercise, and mental stress on secretory immunity. *Journal of Sports Science*; 23 (5): 501-8

Rothkotter HJ, Hriesik C, Pabst R. (1995). More newly formed T than B lymphocytes leave the intestinal mucosa via lymphatics. *European Journal of Immunology* ;25 (3): 866-9

Ruiz-Doblado S, Carrizosa A, Garcia-Hernandez MJ. (2003). Alopecia areata: psychiatric comorbidity and adjustment to illness. *International Journal of Dermatology*, 42 (6): 434-7

Sacedón, R ; Vicente, A ; Varas, A ; Jiménez, E ; Muñoz, JJ & Zapata, AG. (2000). Role of glucocorticoids in early T-cell differentiation. *Annals New York Academy of Science*. 917: 732-39.

Santos J, Yang PC, Soderholm JD, Benjamin M, Perdue MH. (2001). Role of mast cells in chronic stress induced colonic epithelial barrier dysfunction in the rat. *Gut*; 48(5):630-6

Sakaguchi, S. (2004). Naturally Arising CD4<sup>+</sup> regulatory T cells for Immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annual Review of Immunology*, 22: 531-62.

Sapolsky, RM; Romero, LM & Munck, AU. (2000). How do Glucocorticoids Influence Stress Response? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory and Preparative Actions. *Endocrinology Reviews*, 21: 55-89

Savino, W ; Smaniotto, S ; de Mello-Coelho, V & Dardenne, M. (2000). Is there a role for growth hormone upon intrathymic T-cell migration? *Annals New York Academy of Science*. 917: 749-54.

Savino, W ; Villa-Verde, DMS ; Alves, LA & Dardenne, M. (1998). Neuroendocrine control of the thymus. *Annals New York Academy of Science*. 840: 470-79.

Schurmeier, TH & Wickings, EJ. (1996). Principles of endocrinology. *Psychoneuroimmunology: an interdisciplinary introduction*. Kluwer. Academic/Plenum Publishers New York, NY: 63-91.

Schwartz, KE. (2002). Autoimmunity, Dehydroepiandrosterone (DHEA) and Stress. *Journal of Adolescent Health*, 30: 37-43

Senda, S.,(1988). Aging-Associated Changes in urine intestinal immunoglobulin A and M secretions. *Scandinavian Journal of Immunology*. 27: 157-164.

Seshadri T, Campisi J. (1990). Repression of c-fos transcription and an altered genetic program in senescent human fibroblasts. *Science*; 247 (4939): 205-9

Shanks, N ; Harbuz, MS ; Jessop, DS ; Perks, P ; Moore, PM & Lightman, SL. (1998). Inflammatory disease as chronic stress. *Annals New York Academy of Science*. 840: 599-607.

Silberman DM, Wald MR, Genaro AM. (2003) Acute and chronic stress exert opposing effects on antibody responses associated with changes in stress hormone regulation of T-lymphocyte reactivity. *J Neuroimmunol.*;144(1-2):53-60

Silberman DM, Ayelli-Edgar V, Zorrilla-Zubilete M, Zieher LM, Genaro AM. (2004). Impaired T-cell dependent humoral response and its relationship with T lymphocyte

sensitivity to stress hormones in a chronic mild stress model of depression. *Brain Behavior and Immunity*;18 (1): 81-90

Silverman ES, Breault DT, Vallone J, Subramanian S, Yilmaz AD, Mathew S, Subramaniam V, Tantisira K, Pacak K, Weiss ST, Majzoub JA. (2005). Corticotropin-releasing hormone deficiency increases allergen-induced airway inflammation in a mouse model of asthma. *J Allergy Clin Immunol.*;115(2):232

Shwartz, AG & Pashko, LL. (2004). Dehydroepiandrosterone, glucose-6-phosphate dehydrogenase and Longevity. *Ageing Research Review*, 3: 171-187

Smagin, GN; Heinrichs, SC & Dunn, AJ. (2001). The Role of CRH in Behavioral Responses to Stress. *Peptides*, 22(5): 713-24

Smith JR, Pereira-Smith OM. (1996). Replicative senescence: implications for in vivo aging and tumor suppression. *Science*; 273 (5271): 63-7

Söderholm, JD; Yang, PC; Ceponis, C; Vohra, A; Riddell, R; Sherman, PM & Perdue, MH. (2002). Chronic Stress Induces Mast Cell-Dependent Bacterial Adherence and Initiates Mucosal Inflammation in Rat Intestine. *Gastroenterology*;123: 1099–1108

Solana, R & Pawelec. G. (1998). Molecular and cellular basis of immunosenescence. *Mechanisms of Ageing and Development*. 102: 115-29.

Souvannavong V, Lemaire C, Andreau K, Brown S, Adam A. (1998). Age-associated modulation of apoptosis and activation in murine B lymphocytes. *Mechanism of Ageing and Development*, 103 (3): 285-99

Spencer LV, Callen JP. (1987). Hair loss in systemic disease. *Dermatologic Clinics*, 5 (3): 565-70

Spencer, NFL & Daynes RA. (1997). IL-12 directly stimulates expression of IL-10 by CD5<sup>+</sup> B cells: possible involvement in age-associated cytokine dysregulation. *International Immunology*, 9(5): 745-54

Spencer, NFL ; Norton, SD ; Harrison, LL ; Li, GZ & Daynes RA. (1996). Dysregulation of IL-10 production with aging: possible linkage to the age-associated decline in DHEA and its sulfated derivative. *Experimental Gerontology*, 31(3): 393-408

Speziali, E. (1999). Manutenção dos padrões de reatividade imunológica durante o processo de senescência. Dissertação de mestrado, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte/MG

Spinelli, A. (2007). Irritable bowel syndrome. *Clinical Drug Investigation*, 27(1):15-33

Straub, RH; Miller, LE; Scholmerich,J; & Zietz,B (2000) Cytokines and Hormones as Possible links Between Endocrinosenescence and Immunosenescence. *Journal of Neuroimmunology* 109:10-15

Sudo, K ; Ema, H ; Morita, Y & Nakauchi, H. (2000). Age-associated characteristics of Murine Hematopoietic stem cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 192(9): 1273-80.

Sudo, N ; Yu, XN ; Sogowa, H & Kubo, C. (1997). Restraint Stress Causes Tissue-Specific changes in the Immune cells distribution. *Neuroimmunomodulation*, 4(3): 113-9

Szabo, S. (1998). Hans selye and the development of the stress concept: Special reference to gastroduodenal ulcerogenesis. *Annals New York Academy of Science*. 840: 19-27

Takeoka, Y ; Chen, SY ; Yago, H ; Boyd, RL ; Suehiro, S ; Shultz, LD ; Ansari, AA & Gershwin, ME. (1996). The murine thymic microenvironment: changes with age. *Int Arch Allergy Immunol*. 111: 5-12.

Tarcic, N ; Ovadia, H ; Weiss, DW & Weidenfeld, J. (1998). Restraint stress-induced thymic involution and cell apoptosis are dependent on endogenous glucocorticoids. *Journal of Neuroimmunology*. 82: 40-46.

Teeuw W, Bosch JA, Veerman EC, Amerongen AV. (2004). Neuroendocrine regulation of salivary IgA synthesis and secretion: implications for oral health. *Biological Chemistry*; 385(12):1137-46

Tewes, Uwe. Concepts in psychology. *Psychoneuroimmunology: an interdisciplinary introduction*. Kluwer. Academic/Plenum Publishers New York, NY: 93-111

Theoharides, TC & Cochrane, DE. (2004). Critical role of mast cell in inflammatory diseases and the effect of acute stress. *Journal of Neuroimmunology*, 146: 1-12

Thoman, ML. (1997). Early steps in T cell development are affected by aging. *Cellular Immunology*. 178: 117-23.

Toussaint, O. (2000). Brain cell death in stress and in aging: role of oxidative stress and energy metabolism. *Annals New York Academy of Science*. 908: 430

Toussaint, O ; Remacle, J ; Dierick, JF ; Pascal, T ; Fripiat, C ; Royer, V ; Magalhães, JP ; Zdanov, S & Chainiaux, F. (2002). Stress-induced premature senescence: from biomarkers to likelihood of *in vivo* occurrence. *Biogerontology*. 3: 13-17.

Toussaint, O ; Royer, V ; Salmon, M & Remacle, J. (2002). Stress-induced premature senescence and tissue ageing. *Biochemical Pharmacology*. 64:1007-9.

Tung JW, Mrazek MD, Yang Y, Herzenberg LA, Herzenberg LA. (2006) Phenotypically distinct B cell development pathways map to the three B cell lineages in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 103(16):6293-8.

Van der Heijden PJ, Stok W, Bianchi AT. (1987) Contribution of immunoglobulin-secreting cells in the murine small intestine to the total 'background' immunoglobulin production. *Immunology*. 62 (4): 551-5

Vacchio, MS ; Ashwell, JD & King, LB. (1998). A positive role for thymus-derived steroids in formation of the T-cell repertoire. *Annals New York Academy of Science*.317-27.

Vaz, NM & Faria, AMC (1993). Guia incompleto de imunbiologia: imunologia como se o organismo importasse. Coopmed Editora, Belo Horizonte/MG

Vrezas, J; Willenberg, HS; Mansmann, G; Hiroi, N; Fritzen, R & Bornstein, SR. (2003). Ectopic adrenocorticotropin (ACTH) and Corticotrophin-Releasing-Hormone (CRH) Production in the Adrenal Gland: Basic and Clinic Aspects. *Microscopy Research Technique*, 61(3): 308-14

Yang, PC.; Jury, J.; Soöderholm, JD.; Sherman, PM.; McKay, DM & Perdue, MH. (2006). Chronic Psychological Stress in Rats Induces Intestinal Sensitization to Luminal Antigens. *American Journal of Pathology*, 168: 104-14

Yamashita N, Nakajima T, Takahashi H, Kaneoka H, Mizushima Y, Sakane T. (1993). Effects of activin A on IgE synthesis and cytokine production by human peripheral mononuclear cells. *Clinical of Experimental Immunology*; 94(1):214-9.

Yin,D; Tuthill,D;Mufson,A & Shi Y.(2000). Chronic Restraint Stress Promotes Lymphocyte Apoptosis by Modulation CD95 Expression. *The Journal of Experimental Medicine*, 191(8):1423-1428

Wan, YY & Flavell RA. (2006). The role for cytokines in the generation and maintenance of regulatory T cells. *Immunological Reviews*, 212: 114-130

Watkins, A. (1997). Mind-body pathway. A clinician's guide to Psychoneuroimmunology, first ed, Pearson Professional: 1-25

Weksler ME, Szabo P. (2000) The effect of age on the B-cell repertoire. *Journal of Clinical Immunology*, 20 (4): 240-9.

Weksler ME. (2000). Changes in the B-cell repertoire with age. *Vaccine*, 18 (16): 1624-8

Weng, NP. (2006). Aging of the Immune System: How Much Can the Adaptive Immune System Adapt? *Immunity*, 24: 495–499

Westermann, J & Exton, MS. (1996). Functional Anatomy of the Immune system. *Psychoneuroimmunology: an interdisciplinary introduction*. Kluwer. Academic/Plenum Publishers New York, NY: 93-111

Wiedmeier SE, Araneo BA, Huang K, Daynes RA. (1991). Thymic modulation of IL-2 and IL-4 synthesis by peripheral T cells. *Cellular Immunology*, 135 (2): 501-18

Witkowski JA. (1987). Cell aging in vitro: a historical perspective. *Experimental Gerontology*, 22 (4): 231-48



***Anexo A – Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética***