MARIA SÍLVIA COSTA GARAVINI

ALTERAÇÕES INDUZIDAS PELO ESTRESSE CRÔNICO DE CONTENÇÃO NA DIFERENCIAÇÃO DE LINFÓCITOS T EM CAMUNDONGOS BALB/C

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Fevereiro / 2006

MARIA SÍLVIA COSTA GARAVINI

ALTERAÇÕES INDUZIDAS PELO ESTRESSE CRÔNICO DE CONTENÇÃO NA DIFERENCIAÇÃO DE LINFÓCITOS T EM CAMUNDONGOS BALB/C

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção de título de Mestre em Biologia Celular.

Orientadora: Dra. Débora D´Ávila Reis

Colaboradora: Dra. Ana Maria Caetano

Universidade Federal de Minas Gerais

Instituto de Ciências Biológicas

Fevereiro / 2006

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

A meus pais, Sylvia de Almeida Costa Garavini e Antônio Garavini Filho:
A minha mãe que me ensinou a confiar firme e decididamente em Deus, mostrou-me como ser alegre até mesmo nos momentos de tristeza e me ensinou a suavizar as lutas oferecidas pela vida.
A meu pai que me incentivou a dedicar o maior tempo possível ao estudo e ao trabalho, aumentando, a cada dia, o saber e a capacidade de fazer, ensinou-me a ser valente, honesta e ética.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força necessária para realizar este sonho.

A minha família, pelo carinho, incentivo e compreensão nos momentos em que precisei estar ausente. Agradeço, especialmente, ao Reynaldo, que me ajudou de forma efetiva, para que eu conseguisse conciliar minhas atividades de consultório e minhas atividades acadêmicas.

Ao Paulo, pelo incentivo, carinho, colaboração, compreensão e pelo amor.

À minha orientadora professora Dra. Débora D'Ávila Reis, pela orientação deste trabalho, pelos conhecimentos transmitidos, pela amizade, pelo apoio; minha sincera admiração, carinho e respeito.

À Luciana Cota Carvalho, doutoranda do curso de Pós-graduação em Biologia Celular, colega de laboratório, amiga, meus agradecimentos pela grande e importante colaboração e disponibilidade. Tenho certeza de que você será uma orientadora brilhante!

A Iraídes, pelo apoio e pela amizade.

A Profa. Dra. Ana Maria Caetano, pela colaboração na realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Walderez Ornelas Dutra, pelo apoio e pelo incentivo.

Ao Departamento de Pós-graduação em Biologia Celular

À Profa. Dra. Anamaria Ravara Vago, Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular, ICB/UFMG.

Ao Prof. Dr.José Bento Alves, meu “padrinho”, pessoa que abriu as portas do ICB para mim, acreditou no meu projeto inicial e me incentivou a realizá-lo.

Aos colegas do curso de Pós-graduação em Biologia Celular, especialmente, Henrique, Suzana, Alexandre, Cristiane Bezerra, Carla, Soraia, André, Laser e Lisley, colegas da Disciplina Biologia Celular; pela contribuição fundamental para que eu levasse o curso adiante. Aos amigos Alan, Dani (Greg)**,** Germano, Janete, Dani e Paula.

Aos colegas de laboratório Luciana, Raquel, Claudinei e Alexandre.

À minha equipe de trabalho no consultório – Emílio, Ana Paula, Ana Cristina, Claudia, Jane, Jaqueline e Rosana.

Aos meus amigos, pelo incentivo, carinho e compreensão da minha ausência em inúmeros momentos.

“A maior descoberta de minha geração é que qualquer ser humano pode mudar de vida, mudando de atitude”.

William James

RESUMO

Estudos confirmam a hipótese de que o estresse altera a função imune e pode então influenciar o desenvolvimento de doenças auto-imunes, doenças infecciosas, câncer e AIDS. Em animais experimentais, o estresse altera o número de linfócitos na corrente sangüínea, a produção de citocinas inflamatórias, a síntese e a secreção de anticorpos e a migração de linfócitos para pele e mucosas. O objetivo deste trabalho foi estudar as alterações induzidas pelo estresse crônico de contenção na diferenciação de linfócitos T em camundongos BALB/c. Observamos elevação dos níveis de cortisol plasmático nos animais submetidos ao estresse crônico de contenção, o que confirmou a eficácia do protocolo de estresse utilizado. A análise inicial do timo dos animais submetidos a estresse revelou redução do peso e da celularidade do órgão e involução mais pronunciada da camada cortical. Através da tripla marcação de proteínas de superfície em timócitos e da análise por citometria de fluxo observamos que o estresse induziu um aumento da freqüência de células $CD3^-$ e diminuição da porcentagem de timócitos $CD3^+$. Dentre os timócitos $CD3^-$, observamos ainda aumento da freqüência das populações pró-T1 ($CD44^+CD25^-$) e pró-T2 ($CD44^+CD25^+$) e diminuição da porcentagem das células pró-T3 ($CD44^-CD25^+$) e pró-T4 ($CD44^-CD25^-$), o que sugere um comprometimento maior do processo de diferenciação de pró-T2 para pró-T3. A análise dos timócitos $CD3^+$ revelou diminuição da freqüência da população $CD3^+CD4^-CD8^-$ e aumento da freqüência da população $CD3^+CD4^+CD8^+$. A simpatectomia química realizada através do tratamento com 6-OHDA não inibiu a involução tímica, o que demonstra que a noradrenalina não atua de forma significativa nesse processo. Estudos de tripla marcação e análises por citometria de fluxo de linfócitos do baço revelaram presença significativa de linfócitos T imaturos e diminuição da população $CD3^+CD4^+CD8^-$. Esses dados demonstram que as alterações do processo de diferenciação de timócitos induzido pelo estresse crônico de contenção repercutem-se sistemicamente e podem então comprometer o sistema imune periférico levando ao desenvolvimento de doenças.

ABSTRACT

Studies have confirmed the hypothesis that stress alters immune function and can influence the development of autoimmune diseases, infectious diseases, cancer and AIDS. In experimental models, stress alters the number of circulating lymphocytes, the production of inflammatory cytokines and antibodies secretion and the lymphocyte migration to skin and mucosa. The purpose of this study was to analyse the alterations induced by chronic restraint stress in BALB/c mice T-cell differentiation. As expected, chronic restraint stress carried increase of corticosterone levels, showing the efficacy of the stress protocol used. Six-week-old BALB/c mice were maintained under restraint during 5 consecutive days, 2 hours per day. At day 6 of stress, the animals were sacrificed and the thymus was collected for histological analysis and immunophenotyping of thymocytes. Chronic restraint stress induced thymus involution, mainly of cortical region, thymus weight decrease and cellularity reduction of this organ. By using triple staining of surface proteins in thymocytes and flow cytometry analysis, it was demonstrated that stress induced increase in the frequency of $CD3^-$ cells and decrease of $CD3^+$ thymocytes. The analyzis of $CD3^-$ thymocytes showed an increase in the frequency of pro-T1 ($CD44^+CD25^-$) and pro-T2 ($CD44^+CD25^+$) subsets and decrease of pro-T3 ($CD44^-CD25^+$) and pro-T4 ($CD44^-CD25^-$). These data suggest that chronic restraint stress compromises thymocyte differentiation, mainly in the stage from pro-T2 to pro-T3. The analysis of $CD3^+$ thymocytes revealed decreased frequency of $CD3^+CD4^-CD8^-$ subset and increased frequency of $CD3^+CD4^+CD8^+$ subset. Chemical sympathectomy with 6-OH dopamine did not inhibited thymic involution, showing that norepinefrine does not act, significantly, in this process. Spleen triple staining of lymphocytes and flow cytometry analysis showed immature T lymphocyte and decrease of $CD3^+CD4^+CD8^-$ subset. The data presented here demonstrated that the alterations in the thymocytes differentiation induced by chronic restraint stress have a systemic involvement and can compromise peripheral immune system carrying out diseases development.

LISTA DE FIGURAS

		Página
FIGURA 1 -	Sistema porta-hipofisário.	17
FIGURA 2 -	Eixo HPA.	18
FIGURA 3 -	Camundongos nos tubos de contenção utilizados nas sessões de estresse.	28
FIGURA 4 -	Etapas do processo de diferenciação de timócitos.	32
FIGURA 5 -	Fotos da região abdominal de um animal do grupo controle (A) e de um animal submetido ao estresse crônico de contenção (B).	36
FIGURA 6 -	Secções de timos de camundongo controle (A) e de camundongo submetido ao estresse crônico de contenção (B).	39
FIGURA 7 -	Etapas do processo de diferenciação de timócitos.	40
FIGURA 8 -	Secção de timo do camundongo pré-tratado com 6-OH-dopamina e submetido ao estresse crônico de contenção.	43

LISTA DE TABELAS

		Página
TABELA 1 -	Anticorpos monoclonais utilizados.	31

.

LISTA DE GRÁFICOS

		Página
GRÁFICO 1 -	Seqüência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais dos subgrupos de timócitos triplo-negativos: pró-T1($CD44^+CD25^-$), pró-T2 ($CD44^+CD25^+$), pró-T3 ($CD44^-CD25^+$) e pró-T4 ($CD44^-CD25^-$).	33
GRÁFICO 2 -	Média dos níveis de cortisol plasmático em camundongos submetidos ao estresse crônico de contenção e em animais controles.	37
GRÁFICO 3 -	Peso do timo de camundongos submetidos ao estresse de contenção e de animais do grupo controle.	38
GRÁFICO 4 -	Celularidade do timo de camundongos submetidos ao estresse crônico de contenção e do grupo controle.	38
GRÁFICO 5 -	Percentual de timócitos $CD3^-$ de camundongos submetidos ao estresse crônico de contenção e do grupo controle.	41
GRÁFICO 6 -	Análise das freqüências de timócitos $CD3^-$ (pró-T1, pró-T2, pró-T3 e pró-T4) em camundongos submetidos ao estresse crônico de contenção e do grupo controle.	41
GRÁFICO 7 -	Percentual de timócitos $CD3^+$ em camundongos submetidos ao estresse crônico de contenção e em animais do grupo controle.	42
GRÁFICO 8 -	Análise das freqüências de timócitos $CD3^+$ ($CD4^-CD8^-$, $CD4^+CD8^+$, $CD4^+CD8^-$ e $CD4^-CD8^+$) em camundongos submetidos ao estresse crônico de contenção e em animais do grupo controle.	43
GRÁFICO 9 -	Peso do baço de camundongos submetidos ao estresse crônico de contenção e do grupo controle.	44
GRÁFICO 10 -	Celularidade do baço de camundongos submetidos ao estresse crônico de contenção e do grupo controle.	44
GRÁFICO 11 -	Percentual de esplenócitos $CD3^+$ em animais submetidos ao estresse crônico de contenção e em camundongos do grupo controle.	45
GRÁFICO 12 -	Análise das frequencias de esplenócitos $CD3^+$ ($CD4^-CD8^-$, $CD4^+CD8^+$, $CD4^+CD8^-$ e $CD4^-CD8^+$) em camundongos submetidos ao estresse de contenção crônico e em animais do grupo controle.	45

LISTA DE ABREVIATURAS

ACTH	- *Adrenocorticotropic hormone*
CD	- *Cluster of differentiation*
CEBIO	- Centro de Bioterismo (UFMG)
CRF	- *Corticotropin realising hormone*
Cy	- *Cy-chrome*
DTH	- *Delayed-type hypersensitivity*
EDTA	- *Ethylenediaminetetraacetic acid*
FITC	- *Fluorescein isothiocyanate*
FL	- Fluorescência
FSC	- *Forward scatter*
GABA	- *Gama-aminobutyric acid*
CGRP	- *Calcitonin gene related peptide*
GH	- *Growth hormone*
GM-CSF	- *Granulocyte and monocyte colony stimulating factor*
HPA	- Hipotálamo, pituitária, adrenal
IL	- Interleucina
INF-γ	- Interferon gama
M-CSF	- *Monocyte colony stimulating factor*
NK	- *Natural killer cells*
PBS	- *Phosphate-buffered saline*
PE	- Ficoeritrina
SNA	- Sistema Nervoso Autônomo
SNC	- Sistema Nervoso Central
SSC	- *Side Scatter*
TCR	- *T cell receptor*
TNF-α	- *Tumor necrose factor*
TSH	- *Thyroide stimulating hormone*
VIP	- *Vasoactive intestinal peptide*
6-OHDA	- 6-hidroxidopamina

SUMÁRIO

Página

1 - INTRODUÇÃO
1.1 - Estresse: uma visão retrospectiva do termo 13
1.2 - Comunicação entre os sistemas nervoso, endócrino e imune 16
1.3 - Diferenciação de linfócitos T no timo 23
2 - OBJETIVOS 26
3 - METODOLOGIA
3.1 - Protocolo do estresse crônico de contenção 27
3.2 - Dosagem do cortisol 28
3.3 - Caracterização da involução tímica 29
3.3.1 Avaliação do peso 29
3.3.2 Avaliação da celularidade 29
3.3.3 Análise histológica 29
3.3.4 Análise da expressão de marcadores de diferenciação em timócitos 30
3.3.5 Simpatectomia química com 6-hidroxi-dopamina 34
3.4 - Análise da resposta do baço ao estresse crônico de contenção 34
3.4.1 Avaliação do peso e da celularidade 34
3.4.2 Análise da expressão de marcadores de ativação em esplenócitos 35
3.5 - Documentação fotográfica 35
3.6 - Análise estatística 35
4 - RESULTADOS
4.1 - Observações gerais relativas ao modelo experimental 36
4.2 - Caracterização da involução tímica 37
4.2.1 Avaliação do peso e da celularidade do timo 37
4.2.2 Análise histológica do timo 39
4.2.3 Análise da expressão de marcadores de diferenciação em timócitos 40

4.2.4 Freqüência de CD4 e CD8 em timócitos $CD3^+$ 42
4.2.5 Efeitos do pré-tratamento com 6-hidroxi-dopamina 43
4.3 - Resposta do baço ao estresse crônico de contenção 44
4.3.1 Avaliação do peso e da celularidade..... 45
4.3.2 Freqüência de expressão de CD4 e CD8 em esplenócitos $CD3^+$ 45
5 - DISCUSSÃO 46
6 - CONCLUSÕES 54
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 55