

1. INTRODUÇÃO

1.1 Estresse: uma visão retrospectiva do termo

Até o século XVII, o termo estresse era utilizado, na literatura inglesa, esporadicamente, com o significado de aflição e adversidade (Lazarus e Lazarus, 1994). A partir daí, aparece pela primeira vez o uso da palavra estresse para denotar o complexo fenômeno composto de tensão, angústia e desconforto, característico da sociedade. No século seguinte, houve uma mudança de enfoque e o termo passou a ser utilizado para expressar a ação de força, pressão ou influência muito forte sobre uma pessoa, causando nela uma deformação; como um peso que faz com que uma viga se dobre. No século XIX, especulações começaram a ser feitas sobre uma possível relação entre eventos emocionalmente relevantes e doenças físicas e mentais.

Anos mais tarde, já no século XX, novamente, as idéias da ligação entre eventos estressantes e doenças foram retomadas. O médico inglês Osler igualou o termo estresse a “trabalho excessivo”, e o termo “tensão” a “preocupação” (revisado por Berczi e Nagy, 1991). Osler, em 1910, sugeriu que o excesso de trabalho e de preocupação estava ligado a doenças coronarianas. Suas observações foram baseadas no estudo de um grupo de 20 médicos com angina *pectoris*, nos quais ele verificou uma relação entre o excesso de trabalho e preocupação e o desempenho pessoal.

As observações de Osler não receberam maior atenção na área médica até que Hans Selye, estudante de medicina na Universidade de Praga, se interessou pelas reações comuns que ele próprio observou em alguns pacientes sofrendo de patologias diferentes. O que lhe chamou a atenção foi a identificação de um conjunto semelhante de reações não específicas, nestes pacientes, frente a situações que lhes haviam causado angústia e tristeza. Em 1936, ele chamou este conjunto de reações de “síndrome geral de adaptação” ou “síndrome do estresse biológico”, conhecida também como “síndrome do simplesmente estar doente”. Em 1936, quando já era um endocrinologista reconhecido pela sociedade médica, Hans Selye

sugeriu o uso da palavra estresse para definir esta síndrome produzida por vários agentes aversivos. E, assim, o termo entrou definitivamente para a literatura científica, como o conhecemos hoje (Selye, 1936,1956).

Selye foi influenciado pelas descobertas de dois fisiologistas, Bernard e Cannon. Em 1879, Bernard (revisado por Berczi & Nagy, 1991) sugeriu que o ambiente interno dos organismos deveria permanecer constante, apesar das mudanças no ambiente externo. Cannon, em 1939, sugeriu o nome “homeotase” para designar os processos fisiológicos envolvidos na manutenção desse equilíbrio interno do organismo. Segundo o mesmo autor, tais processos seriam responsáveis por garantir o funcionamento orgânico regular e, com ele, a subsistência da espécie. Selye definiu o estresse como uma quebra desse equilíbrio.

Cannon foi pioneiro em documentar a função homeostática da adrenal, através da resposta secretora imediata, frente a um estímulo sofrido pelo organismo (Cannon *et al.*, 1911; Cannon *et al.*, 1914). Mais tarde, em 1939, ele sugeriu ser a adrenalina o princípio ativo da glândula adrenal e também o neurotransmissor do sistema nervoso simpático (SNS) (Cannon *et al.*, 1914, revisado por Berczi & Nagy, 1991), o que foi confirmado por Von Euler, em 1946 (Von Euler, 1946, revisado por Berczi & Nagy, 1991). Ainda de acordo com Cannon, a rápida ativação do sistema homeostático em situações de emergência, especialmente do sistema simpato-adrenal, poderia preservar o ambiente interno, através de ajustes compensatórios e antecipatórios, aumentando a probabilidade de sobrevivência.

Hans Selye introduziu o estresse como um conceito científico. O início da elaboração de sua “teoria do estresse” foi marcado pela publicação, em 1936, de um artigo na *Revista Nature*, o qual descrevia a tríade patológica, caracterizada por hipertrofia da adrenal, ulceração gastrointestinal e involução tímica, desencadeada por exposição a diversos agentes estressores (Selye, 1936). Selye definiu o estresse como a resposta não específica do organismo, enfatizando que a tríade patológica poderia ser desencadeada pela exposição a qualquer estressor, externo ou interno, que ativaria o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), atribuindo a este eixo a função chave efetora da resposta ao estresse.

Em 1956, Selye propôs que o estresse se desenvolveria em três fases: a fase de alerta, a da resistência e a fase de exaustão. Na revisão de seus conceitos, realizada por Lazarus, em 1984, ele considerou que o organismo tenta sempre se adaptar ao evento estressor e, neste processo, ele utiliza grandes quantidades de energia adaptativa. Na primeira fase, a do alerta, o organismo prepara-se para a reação de luta ou fuga, que é essencial para a preservação da vida. Os sintomas presentes nesta fase dizem respeito ao preparo do corpo e da mente para a preservação da própria vida. Se o estresse continuar presente por tempo indeterminado, a fase de resistência inicia-se, quando o organismo tenta uma adaptação em virtude de sua tendência a procurar a homeostase interna. Na fase de resistência, as reações são opostas àquelas que surgem na primeira fase, e muitos dos sintomas iniciais desaparecem, dando lugar a uma sensação de desgaste e cansaço. Se o estressor é contínuo e a pessoa não possui estratégias para lidar com o estresse, o organismo exaure sua reserva de energia adaptativa e a fase de exaustão se manifesta, por exemplo, através do desenvolvimento de determinadas doenças.

Mais recentemente o conceito de estresse tem sido revisto por vários autores, dentre eles Dhabhar e Mc Ewen (1997). Esses pesquisadores definem o estresse como uma constelação de eventos que compreende um estímulo (agente estressor), que acarreta uma reação no cérebro (percepção ao estresse), a qual, subseqüentemente, ativa sistemas fisiológicos de luta ou fuga no organismo (resposta ao estresse). Uma das funções primárias do cérebro é perceber os estressores, proteger-se do perigo e ativar o organismo para lidar com suas conseqüências. A resposta ao estresse acarreta a liberação de neurotransmissores e hormônios que servem como mensageiros do cérebro para todo o organismo.

1.2 Comunicação entre os sistemas nervoso, endócrino e imune

Tanto o sistema nervoso central (SNC) como o sistema endócrino, participam da homeostase do organismo, garantindo-lhe assim a adaptação e a sobrevivência. Para lidar com alterações físicas ou ambientais que podem ameaçar a homeostase, os organismos têm a habilidade de promover, rapidamente, respostas moleculares e comportamentais, por meio de mudanças na função e expressão gênica, que permitem um rápido restabelecimento do estado funcional. Estas respostas fisiológicas são desencadeadas por vários circuitos interligados que incluem o eixo HPA e o sistema nervoso autônomo (SNA). Através do SNA e do sistema endócrino, o hipotálamo induz respostas orgânicas a alterações no meio ambiente externo e interno, as quais permitem que o organismo se adapte e mantenha a homeostasia. Este conjunto de interações entre SNC, SNA e sistema endócrino, que trabalham para manter a homeostasia frente a um agente estressor, é denominado “sistema de estresse”.

O hipotálamo funciona como órgão central do sistema de estresse, pois recebe aferências de várias partes do SNC. Frente a um estímulo, o hipotálamo envia mensagens para a hipófise e para o SNA. A ativação do eixo HPA e do SNA resulta em elevação sistêmica do nível de vários hormônios e neurotransmissores, dentre eles glicocorticóides e catecolaminas, que agem em conjunto para manter a homeostase (Chrousos, 2000) (FIGURA 1).

Tanto o estresse físico quanto o estresse psicológico ou psico-comportamental ativam neurônios do hipotálamo, resultando na liberação do fator de liberação de corticotropina (CRF ou CRH), um dos principais hormônios envolvidos na coordenação da resposta ao estresse. O CRF é um peptídeo de quarenta e um aminoácidos. Ele se liga a receptores em células da adenohipófise, estimulando a expressão do gene da pró-opiomelanocortina (POMC). Após o processamento, o POMC dá origem ao hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). Além disso, o CRF inibe a secreção de prolactina e hormônio do crescimento, além de estimular a liberação

de noradrenalina via *locus coeruleus*, o que ativa o sistema noradrenérgico central e periférico (Dunn, 1998) (FIGURA 2).

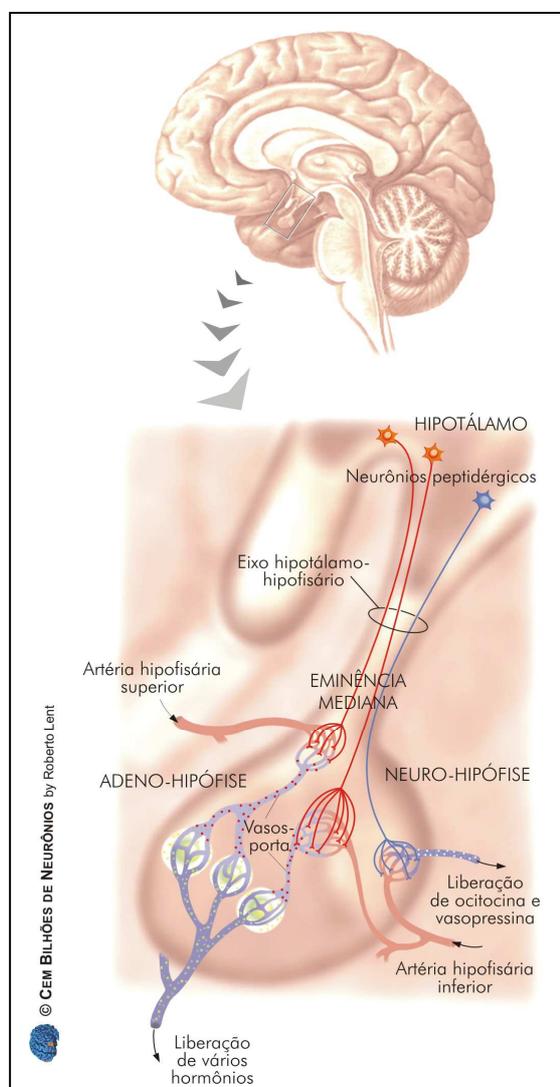


FIGURA 1 - Sistema porta-hipofisário. Os comandos químicos emitidos pelo hipotálamo são hormônios que os axônios hipotalâmicos secretam na eminência mediana e na neuro-hipófise, e que são levados à circulação, através da rede capilar formada pelas artérias hipofisárias. Na neuro-hipófise esses hormônios seguem direto para órgãos distantes, mas na adeno-hipófise eles saem de novo para o tecido, através da rede capilar formada pelos vasos-porta, e influenciam a secreção hormonal das células hipofisárias. Os hormônios dessas células entram novamente na circulação para serem levados aos órgãos-alvo. Fonte: Lent, R. *Cem bilhões de Neurônios*, 2004, p.494.

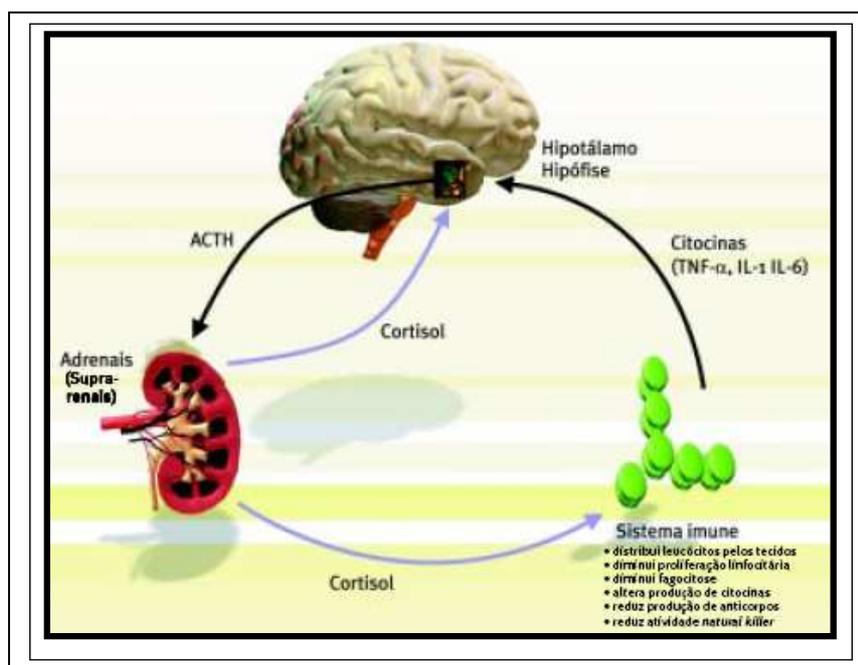


FIGURA 2 - Eixo HPA. O estresse ativa o eixo HPA: a hipófise anterior libera o hormônio ACTH, que induz a liberação de cortisol pelo córtex das glândulas adrenais
 Fonte: Bauer, M. *et al*, 2002.

O ACTH é importante no sistema de estresse por efetivar a comunicação hipófise-adrenal, ao estimular as células do córtex deste órgão a sintetizar e a secretar corticosteróides. Uma vez secretados, os corticosteróides agem por intermédio de ligação a dois tipos de receptores: os receptores para mineralocorticóides (Mr) e os receptores para glicocorticóides (Gr). Os glicocorticóides (cortisol, corticosterona e cortisona) são corticosteróides que têm uma importância primária no sistema de estresse. Eles influenciam o metabolismo celular e disponibilizam substratos energéticos para a produção de respostas fisiológicas adaptativas à presença dos agentes estressores. Os glicocorticóides estimulam a síntese de proteínas e glicogênio, a gliconeogênese, ativam a lipólise e exercem também várias funções sobre o SNC (Sapolsky *et al.*, 2000).

É através do “sistema de estresse” que os agentes estressores influenciam a resposta imune. A atividade imunológica é modulada pelo sistema nervoso autônomo simpático, através da inervação de órgãos linfóides e de catecolaminas circulantes, e também por hormônios do eixo HPA, como glicocorticóides, prolactina, hormônio do crescimento, ACTH e CRH (Adler *et al.*, 1991; Kemeny *et al.*, 1992; Heninger, 1995; Michelson *et al.*, 1995).

No processo recíproco de comunicação de sinais do sistema imune ao sistema neuroendócrino, citocinas como IL-1, IL-6 e TNF- α , liberadas de células do sistema imune, são essenciais. Elas desempenham importante papel na modulação da resposta do eixo HPA nos seus três níveis: hipotálamo, pituitária e adrenal (Dhabhar, 1995; Heninger, 1995; Berczi, 1998; Dhabhar, 1998; Dunn, 1998; Gaillard, 1998; Beschop, 1999; Chrousos, 2000; Dhabhar, 2000). Estas citocinas em geral, exercem *feedback* negativo, de forma que níveis elevados de IL-1 estimulam liberação de cortisol que, por sua vez, reduz a ativação imune e a produção de citocinas inflamatórias (Heninger, 1995).

Uma das primeiras evidências da influência do eixo HPA no sistema imune veio da demonstração de que a extirpação da hipófise produz alterações, tais como diminuição da celularidade na medula óssea, atrofia tímica e imunodeficiência generalizada (Berczi e Nagy, 1991). Nos últimos anos, as pesquisas que abordam a influência de hormônios e neuropeptídeos sobre as células do sistema imune vêm demonstrando a importância da participação do eixo neuroendócrino na regulação da resposta imune nas doenças infecto-parasitárias, nas doenças auto-imunes, nas neoplasias e nas alergias (Mc Ewen *et al.*, 1998, 2000; Sapolsky *et al.*, 1994; Webster *et al.*, 2002). Tais processos, que resultam em interações recíprocas entre os sistemas nervoso, endócrino e imune, vêm sendo abordados por pesquisas no campo da psiconeuroimunologia.

Na psiconeuroimunologia, fundem-se os conceitos da função psíquica, do sistema nervoso, da neuroendocrinologia e da imunologia. Estudar a imunologia simplesmente através das células do sistema imune, a neurociência através de neurônios e a psicologia apenas num nível comportamental, não é suficiente para abordar as interações entre tais sistemas. A compreensão da saúde e da doença

depende dessa análise. As relações entre sistema nervoso central e sistema imune são tais que anormalidades no SNC podem produzir mudanças mensuráveis no sistema imune com conseqüências clínicas significativas. Do mesmo modo, anormalidades no sistema imune podem causar doenças no SNC ou alterações no seu funcionamento (Adler, 1991; Maier, 1994, 1998; Heninger, 1995; Watkins, 1997; Berczi, 1998; Davis, 1998; Reichlin, 1998; Szabo, 1998; Baird, 1999; Chrousos, 2000; Conti, 2000).

Os efeitos hormonais sobre as células do sistema imunológico dependem da presença de receptores. Plaut (1987) relata a presença de receptores para diversos hormônios glicocorticóides e neuropeptídeos nessas células. A distribuição desses receptores difere entre as diversas subpopulações de linfócitos e a ativação destes durante a resposta imunológica pode alterar a expressão e o número de receptores ou a responsividade do linfócito ao hormônio. Os efeitos dos hormônios podem ocorrer diretamente ou através das ações destes sobre macrófagos, modulando a ativação e migração de linfócitos e suas respostas proliferativas.

Os efeitos imunorregulatórios dos glicocorticóides, do ACTH (Heijnen *et al.*, 1991; Munck & Guyre, 1991, Munck & Náráy-Fejes-Tóth, 1994), do hormônio do crescimento (GH) (Kelley, 1991), do hormônio liberador de tireotrofina (TSH), do hormônio tireotrófico (Kruger, 1996), de hormônios sexuais (McCrudden & Stimson, 1981) e da prolactina (Bernton *et al.*, 1991) têm sido revistos extensamente (Kemeny *et al.*, 1992; Murphy *et al.*, 2000; Dardenne & Savino, 1996; Dorshkind & Horseman, 2001).

A prolactina apresenta várias propriedades comuns a algumas interleucinas como IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, GM-CSF, M-CSF e eritropoietina. Essas substâncias apresentam homologia estrutural, estrutura homóloga de receptores, fatores de transdução e de transcrição comuns. Receptores para prolactina são encontrados em diversas células derivadas da medula óssea, incluindo linfócitos T, linfócitos B, monócitos, células *Natural Killer* (NK) e células-tronco. A expressão de receptores para prolactina em células do sistema hematopoiético e do sistema imune sugere atividade desta substância no desenvolvimento de células sanguíneas, dentre elas linfócitos e monócitos. Outra forma de atuação da prolactina na determinação do

tamanho do *pool* de linfócitos se dá através de sua capacidade de regular a apoptose pela supressão do programa de morte celular que é ativada por citocinas, drogas citotóxicas e por falta de fatores de crescimento (Buckley, 1998; Savino, 1998; Baird, 1999; Foster, 1999; Chrousos, 2000; Richards, 2000).

O GH, assim como a prolactina, é produzido não apenas pelo sistema endócrino, mas também por células imunocompetentes (Oya, 2000). O GH, provavelmente, não é necessário para o desenvolvimento normal de tecidos hematopoiéticos mielóides e linfóides. Contudo, em situações de estresse, ele exerce efeitos anti-apoptóticos e estimula a proliferação e diferenciação de células hematopoiéticas que determinam a expansão mielóide e linfóide (Beschop, 1998).

Ao estudarmos a resposta ao estresse, não podemos deixar de mencionar os trabalhos de Dhabhar e colaboradores que vêm pesquisando, exaustivamente, os efeitos do estresse de contenção agudo e crônico nos sistemas imune, endócrino e nervoso. A partir de experimentos utilizando ratos *Sprague-Dawley*, Dhabhar *et al.* (1994, 1995) avaliaram o efeito do estresse de contenção na determinação do *pool* de leucócitos sanguíneos e na migração dos mesmos para pele e mucosas. Esses pesquisadores observaram neutrofilia e diminuição do número de linfócitos B, monócitos, células NK e linfócitos T logo nos primeiros minutos de contenção. Através de análises histológicas, esses autores observaram que os leucócitos se redistribuem para outros locais, principalmente para a pele (Dhabhar *et al.*, 1994). Cessado o estresse, observou-se rápida reversão da alteração do número de leucócitos (Dhabhar *et al.*, 1995). Com o objetivo de analisar o papel do cortisol no estresse de contenção, foram utilizados animais adrenalectomizados e foi observada redução da magnitude das alterações leucocitárias induzidas pelo estresse (Dhabhar *et al.*, 1995, 1996). O cortisol, atuando nos receptores esteróides da adrenal tipo II, é o principal mediador da diminuição dos linfócitos e monócitos no sangue e da sua redistribuição, em função do estresse (Dhabhar *et al.*, 1994).

Não apenas o cortisol influencia no *pool* de subpopulações de leucócitos sanguíneos, mas também as catecolaminas. Diferenças na concentração e combinações desses hormônios podem explicar diferenças no número de leucócitos no sangue, durante diferentes condições de estresse. As catecolaminas aumentam o

número de algumas subpopulações de leucócitos no sangue de ratos e humanos. Após a administração de adrenalina ou noradrenalina em ratos *Wistar*, observou-se rápido aumento do *pool* de neutrófilos e células NK, com redução do número de linfócitos B e linfócitos T (Dhabhar *et al.*, 1995, 1996).

Bauer *et al.* (2000) mostraram que o estresse de contenção agudo compromete a expressão de moléculas de adesão nos linfócitos. Foi avaliada a expressão da integrina β_2 nas células CD4 e CD8. A integrina β_2 é expressa em todos os linfócitos e promove a adesão às células endoteliais, favorecendo o processo de transmigração celular. Os autores observaram aumento da expressão de moléculas de adesão nas células T periféricas, mostrando que houve uma redistribuição leucocitária em decorrência do estresse.

Silva *et al.* (2001) padronizaram o modelo de estresse crônico de contenção em camundongos BALB/c jovens. Neste protocolo foram feitas observações clínicas e realizada a contagem de leucócitos. Logo após o primeiro evento de contenção, o que caracteriza estresse agudo, foram observados resultados semelhantes àqueles relatados por Dhabhar, utilizando o rato como modelo experimental. Observou-se neutrofilia e linfopenia significativas, com intensa migração de leucócitos para a pele e mucosas. Fato interessante é que, após os primeiros eventos de estresse, os animais apresentaram diarreia e alopecia. Após 5 a 6 sessões de estresse, o que caracteriza estresse crônico, a diarreia desapareceu completamente, e praticamente 100% dos camundongos apresentaram alopecia. Além disso, a contagem de leucócitos circulantes revelou não linfopenia, mas linfocitose. Fato interessante é que, apesar da linfocitose vista, observações preliminares mostraram involução tímica nos animais submetidos a estresse crônico, o que foi revelado pela redução do peso do órgão.

1.3 Diferenciação de linfócitos T no timo

Linfócitos desenvolvem-se a partir de células progenitoras indiferenciadas que podem originar células NK, linfócitos T, linfócitos B. A diferenciação destas células depende de sua recepção e manutenção em ambientes especializados sob a ação de contatos entre células e de diversos fatores solúveis, como citocinas, hormônios e/ ou neuropeptídeos (Baird, 1999). Em trabalho de revisão realizado por Dardene e Savino (2000), foi relatado o controle neuroendócrino da fisiologia do timo. Os autores mostram que as citocinas produzidas no microambiente tímico estão sob controle neuroendócrino. Os hormônios da tireóide e pituitária modulam a secreção de timulina. A adrenalectomia e gonadectomia acarretam diminuição sérica de timulina por um mês, com pico após a cirurgia e, depois, retorno ao normal. Os hormônios do timo regulam glândulas endócrinas e circuitos neuroendócrinos, modulando a produção de hormônios e neuropeptídeos do eixo HPA. Os timócitos apresentam receptores para glicocorticóides, esteróides sexuais, progesterona, estrógeno, hormônios tireoidianos, prolactina, hormônio de crescimento, oxitocina, vasopressina, somatostatina, opióides endógenos, melatonina, CGRP, VIP, dentre outros (Savino, 2000).

O desenvolvimento de linfócitos T ocorre principalmente no córtex tímico. Na parte mais externa do córtex, os timócitos duplo-negativos proliferam-se e começam o processo de reorganização gênica, levando à expressão do pré-TCR juntamente com os co-receptores CD4 e CD8. Na parte mais interna do córtex, os timócitos em amadurecimento são duplo-positivos ($CD4^+$ e $CD8^+$) e se tornam receptivos ao complexo MHC-peptídeo. O processo de seleção positiva dos linfócitos T inicia-se na presença das células epiteliais corticais que expressam as moléculas do MHC classe I e classe II em sua superfície. As moléculas de MHC classe II são necessárias para o desenvolvimento dos linfócitos T $CD4^+$; as moléculas do MHC classe I são necessárias para o desenvolvimento dos linfócitos T $CD8^+$ (Killeen, 1998).

Estudos sobre o desenvolvimento de células T no timo definem de forma genérica três estágios de diferenciação: triplo-negativo ($CD3^-CD4^-CD8^-$), duplo-

positivo (CD4⁺CD8⁺) e positivo simples (CD4⁺CD8⁻ ou CD4⁻CD8⁺). Timócitos triplo-negativos dividem-se em quatro subgrupos: pró-T1 (CD44⁺CD25⁻), pró-T2 (CD44⁺CD25⁺), pró-T3 (CD44⁻CD25⁺) e pró-T4 (CD44⁻CD25⁻) (Baird, 1999; Godfrey, 1993). As células CD44⁻CD25⁺ submetem-se a uma segunda onda de rearranjo antes de se tornarem CD44⁻CD25⁻, o qual exhibe o rearranjo da cadeia TCR-β completo.

Um trabalho realizado por Aspinall, em 2001, mostrou que, na presença de anti-IL-7, células triplo-negativas CD44⁺CD25⁻, provenientes de culturas de timos fetais de camundongos jovens, apresentaram diminuição no desenvolvimento de timócitos, quando comparado ao grupo não tratado com anti-IL-7. Aspinall levanta três hipóteses para a redução da timopoiese: redução no número de progenitores provenientes da medula óssea; um defeito intrínseco nas células-tronco que chegam ao timo; ou um defeito nas células estromais do timo, proporcionando um microambiente inadequado, não permitindo o rearranjo da cadeia β do TCR ou inibindo o processo da timopoiese .

Existem outras vias de diferenciação de linfócitos T, as quais, no processo de envelhecimento, acontecem simultaneamente ao processo de atrofia tímica. As células T extratímicas são pouco numerosas na juventude e aumentam com a idade. O desenvolvimento dessas células ocorre principalmente no fígado e no intestino, podendo ainda ocorrer no útero e nas glândulas salivares. As células T extratímicas participam da eliminação de células próprias anormais que surgem com o decorrer da idade, sob condições de estresse, de doenças auto-imunes, de gravidez, de infecções intracelulares como a malária, doença do enxerto *versus* hospedeiro e administração prolongada de drogas antiinflamatórias (Abo, 2001). A atrofia tímica aguda acompanha a ativação das células T extratímicas, sugerindo que exista uma regulação recíproca das células T extratímicas e das células T convencionais, isto é, aquelas derivadas do timo. Sabe-se que a IL-7 é fundamental no processo de maturação das células T extratímicas e, é sabido também, que os hepatócitos produzem IL-7 (Abo, 2001). Isso poderia explicar o fato de ser o fígado o principal sítio de produção dessas células. Além disso, as células de Kupffer e as células

endoteliais produzem IL-8, IL-12 e IL-15, citocinas essas que funcionam como fatores subseqüentes na maturação das células T extratímicas.

Acredita-se que o estresse crônico altere os caminhos de diferenciação celular, permitindo e/ou ativando clones de células T autorreativas na periferia. Corroborando com essa hipótese, dados preliminares obtidos em nosso laboratório, demonstraram uma linfocitose associada a atrofia tímica em camundongos submetidos a estresse crônico de contenção (Silva, 2001). Neste trabalho nos propusemos a aprofundar as análises do processo de involução tímica induzida pelo estresse crônico. Dados da literatura mostram que o processo de diferenciação de células no timo é regulado por vários hormônios e citocinas, os quais, por sua vez, regulam a ativação de diferentes fatores de transcrição (Rothenberg *et al.*, 2005). Tais fatores de transcrição são ativados ou inibidos nos timócitos, dependendo do estágio de diferenciação. Assim, acreditamos que a determinação das populações de timócitos mais comprometidas pelo estresse crônico possa contribuir para estudos moleculares futuros e até mesmo para possíveis intervenções em doenças associadas ao estresse.

2. OBJETIVOS

Objetivo geral

Caracterizar a involução tímica induzida pelo estresse crônico de contenção em camundongos BALB/c de 6 semanas de idade.

Objetivos específicos

1- Avaliar histologicamente a ocorrência de alterações morfológicas no timo de camundongos submetidos ao estresse de contenção crônico.

2- Avaliar as freqüências de timócitos em diferentes estágios de diferenciação no timo, através da expressão diferencial de marcadores fenotípicos, em camundongos submetidos ao estresse crônico de contenção.

3- Avaliar o papel da inervação noradrenérgica no processo de involução tímica em camundongos submetidos ao estresse de contenção crônico, através da inibição da dopamina.

4- Avaliar a repercussão da involução tímica, decorrente do estresse crônico de contenção, no baço, através da análise do fenótipo das populações de esplenócitos e da celularidade desse órgão.

3. METODOLOGIA

3.1 Protocolo de estresse crônico de contenção

Foram utilizados camundongos machos da raça BALB/c de cinco a seis semanas de idade, desmamados entre 21 e 30 dias pós-natal, com peso corporal entre 18 e 25 gramas, fornecidos pelo Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os animais foram divididos em gaiolas plásticas de 50 X 30cm, em grupos de 6 e mantidos no Biotério do Departamento de Morfologia do ICB/UFMG, em câmara climatizada (temperatura entre 20°C e 23°C e ciclos de claro/escuro de 12 horas), recebendo água e ração comercial Nuvilab à vontade. O procedimento de estresse de contenção só foi iniciado 5 dias após a permanência dos camundongos na câmara para climatização. Foram utilizados 16 animais, sendo 8 pertencentes ao grupo controle e 8 pertencentes ao grupo experimental.

O estresse de contenção foi realizado de acordo com descrição de Sei (1991) e Padgett (1998). Foram utilizados tubos de centrifuga de 50 mL tipo Falcon, apresentando 20 orifícios de, aproximadamente, 10mm para passagem de ar. Os animais foram introduzidos nos tubos com extremidade anterior voltada para o fundo do tubo. A tampa rosqueada foi fechada, e o tubo foi mantido em posição horizontal dentro das gaiolas em que normalmente os animais são acondicionados (FIGURA 4). De acordo com este protocolo, os animais têm algum movimento, que é restrito, embora não ocorra imobilização. Dentro do tubo, os animais ficaram privados de alimentos e de água por período de duas horas, durante cinco dias. Os animais dos grupos de controle foram submetidos à restrição de alimentos e de água no mesmo período de tempo. Ao término da sessão de estresse, os animais experimentais foram devolvidos às gaiolas e, juntamente com os animais controles, receberam alimento e água.



FIGURA 3 - Camundongos nos tubos de contenção utilizados nas sessões de estresse.

3.2 Dosagem do cortisol

Após imobilização rápida do animal, o sangue foi coletado por punção do plexo orbitário, utilizando-se pipetas de Pasteur de vidro com pontas de 5 cm de comprimento, heparinizadas com Lique mine® (Roche). Esse procedimento durava cerca de 40-60 segundos. O sangue coletado foi centrifugado, sendo separado o plasma. O material foi colocado em tubos Eppendorff e estocado a -70°C . A dosagem de cortisol foi realizada através de radioimunoensaio, com a colaboração do Professor José Antunes Rodrigues, na Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto.

3.3 Caracterização da involução tímica

A involução tímica foi avaliada através de análises do peso relativo, da celularidade, da histologia e da expressão de marcadores de diferenciação em timócitos.

3.3.1 Avaliação do peso

Todos os camundongos foram pesados, no início do experimento e no dia do sacrifício, em balança com sensibilidade de 0,1g. Assim que os animais foram sacrificados, seus timos foram removidos e pesados em balança com sensibilidade de 0,0001g.

3.3.2 Avaliação da celularidade

Depois de pesado, o timo foi colocado em placa de Petri apoiada em lâminas de isopor com gelo, contendo meio de cultura RPMI gelado, para que o órgão fosse macerado. Posteriormente, a suspensão celular foi transferida para tubo Falcon e centrifugada a 1.200 rpm, à temperatura de 4°C, durante 5 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e as células foram ressuspensas em 4mL de PBS adicionado de 3% de soro fetal bovino e 0,01% de azida sódica. A suspensão celular foi centrifugada novamente, as células foram ressuspensas no meio acima, diluídas em solução aquosa de ácido acético a 2% e azul de metileno a 0,01% e contadas em câmara de *Neubauer*.

3.3.3 Análise histológica

Após sacrifício dos animais por deslocamento cervical, o timo foi coletado, imediatamente incluído em Bouin, por 24 horas e embebido em *paraplast*. Cortes de 6 micrômetros de espessura foram submetidos à coloração com hematoxilina-eosina, segundo protocolo de rotina estabelecido em nosso laboratório.

3.3.4 Análise da expressão de marcadores de diferenciação em timócitos

A citometria de fluxo foi utilizada para a análise dos fenótipos dos timócitos de camundongos submetidos ao estresse de contenção e de animais controle. Após sacrifício dos animais por deslocamento cervical, o timo foi extraído e colocado em placa de Petri contendo meio de cultura RPMI incompleto. O órgão foi macerado em peneira metálica utilizando êmbolo de borracha e, a seguir, colocado em tubos Falcon de 15 ml. O material foi centrifugado e o sobrenadante desprezado por inversão do tubo. Em seguida, as células foram ressuspensas em 5mL de RPMI e submetidas a nova centrifugação. O sobrenadante foi desprezado por inversão do tubo e as células foram novamente ressuspensas com 300 µL de PBS .

Para avaliação do fenótipo celular foram utilizados anticorpos monoclonais (TABELA 1) contra antígenos de superfície celular, marcados com ficoeritrina (PE), isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou cy-chrome (Cy). Esses anticorpos foram adquiridos da PharMingen (San Diego, CA, USA). Os anticorpos foram diluídos em PBS, contendo 1% de BSA. Como controle, anticorpos não relacionados IgG1 ou IgG2, ligados a PE ou FITC, foram usados para medidas de ligações inespecíficas. Cinquenta microlitros de solução de timócitos ou esplenócitos (obtidos conforme protocolo acima descrito) foram incubados com 10µL de anticorpo monoclonal diluído, por 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a marcação, a preparação foi lisada com solução de lise (formaldeído 15% e dietilenoglicol 50%) por 10 minutos e lavada com PBS. Este procedimento elimina quase todas as hemácias, otimizando a aquisição de dados. As células foram então fixadas em 200µL de PBS contendo formaldeído 4%. A leitura da imunofluorescência foi feita em um citômetro FACScan da Becton Dickinson, sendo coletados 10.000 eventos para cada tubo. A análise foi realizada em programa CELL Quest TM, empregando-se diferentes estratégias, dependendo do fenótipo celular analisado.

O citômetro de fluxo permite a avaliação de até cinco parâmetros: tamanho (FSC) e granulosidade das células (SSC), fluorescência do tipo 1 (FL1), fluorescência do tipo 2 (FL2) e fluorescência do tipo 3 (FL3). FL1, FL2 e FL3 correspondem a sinais luminosos emitidos pela excitação do isotiocianato de

fluoresceína (FITC), ficoeritrina (PE) e cy-chrome (Cy), respectivamente. Estas características são detectadas, utilizando-se um sistema óptico-eletrônico que avalia a dispersão do raio laser incidente sobre uma célula e a emissão de fluorescência, dada pelos diferentes fluorocromos, em diferentes comprimentos de onda. O emprego de anticorpos monoclonais acoplados a fluorocromos que emitem fluorescência em diferentes comprimentos de onda permite identificar, em uma mesma célula, estruturas distintas, reconhecidas pelos anticorpos específicos.

TABELA 1

Painel de anticorpos monoclonais marcados com ficoeritrina (PE), isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou cy-chrome (Cy), utilizados para o timo e o baço.

	PE	FITC	Cy
Timo	Anti-IgG	Anti-IgG	
	Anti- CD3	Anti- CD25	Anti- CD44
	Anti- CD4	Anti- CD8	Anti-CD3
Baço	Anti-IgG	Anti-IgG	
	Anti- CD4	Anti- CD8	Anti-CD3

Estratégias de análise de dados

Utilizando o programa *Cell Quest*, selecionamos a população celular a ser analisada, de acordo com sua localização no gráfico de tamanho *versus* granulosidade (GRÁFICO 1). O perfil fornecido pela emissão das fluorescências do tipo 1, 2 e 3 nas células marcadas foi delimitado em quadrantes, obtendo-se quatro divisões acompanhadas de uma análise estatística quantitativa dos dados.

Foram analisados timócitos em etapas distintas do processo de diferenciação, conforme a FIGURA 4.

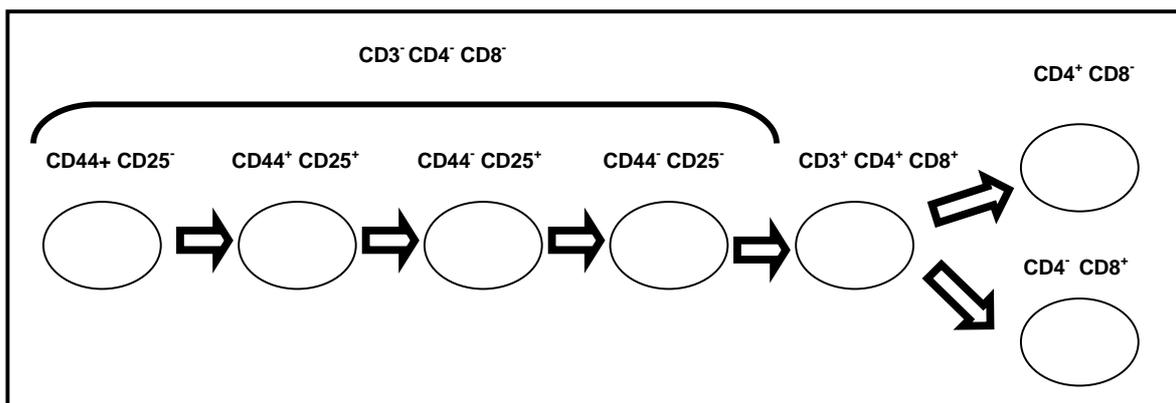


FIGURA 4: Etapas do processo de diferenciação de timócitos.

Estratégia de análise dos marcadores CD25 e CD44 em células CD3⁻

Nesse tipo de análise foi feito um gráfico de distribuição puntual (*dotplot*) de tamanho *versus* granulosidade (GRÁFICO 1A) e selecionada a população de interesse segundo os parâmetros morfométricos (R1). A seguir, foi feito novo gráfico puntual segundo as fluorescências: FL1/CD3 *versus* tamanho onde foi selecionada população CD3⁻ (R2). (GRÁFICO 1B). Posteriormente, foram feitas as combinações das regiões R2 e R1, através das fórmulas "G2 = R1 *and* R2", onde *and* significa a intersecção de eventos presentes em R1 e R2, simultaneamente. A seguir, foi realizado novo gráfico FL2/CD44 *versus* FL3/CD25 contendo as células em G2 (GRÁFICO 1C).

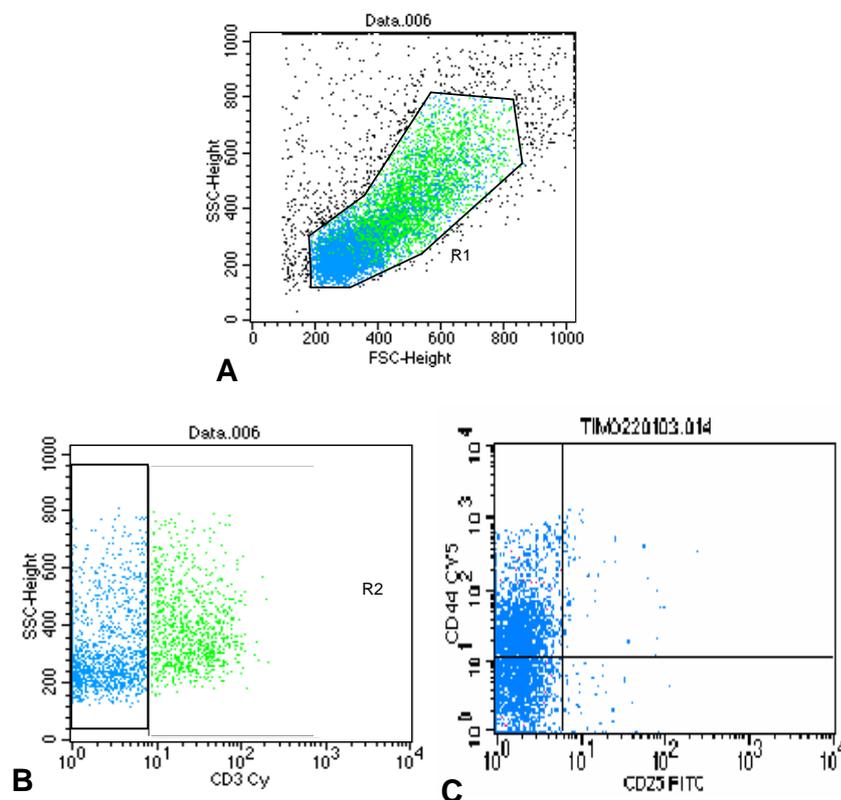


GRÁFICO 1 - Seqüência de procedimentos utilizados para as análises dos percentuais dos subgrupos de timócitos triplo-negativos: pró-T1 ($CD44^+CD25^-$), pró-T2 ($CD44^+CD25^+$), pró-T3 ($CD44^-CD25^+$) e pró-T4 ($CD44^-CD25^-$). Primeiramente, foi estabelecido gráfico de distribuição puntual tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC), utilizado para a seleção da população de interesse R1 (A); a seguir foi feito gráfico puntual segundo as fluorescências: FL2/CD3 versus tamanho (FSC), sendo selecionada população de interesse CD3- (R2) (B). Posteriormente, foram feitas as combinações das regiões R2 e R1, através das fórmulas "G3 = R1 and R2", onde *and* significa a intersecção de eventos presentes em R1 e R2, simultaneamente. A seguir, foi realizado novo gráfico FL3/CD44 versus FL1/CD25 contendo as células em G3 (C).

Expressão de CD4 e CD8 em células CD3⁺

Para a análise da expressão de CD4 e CD8 em timócitos CD3⁺, foi utilizada a mesma estratégia descrita acima, sendo possível, assim, obter as porcentagens de timócitos duplo-positivos ($CD4^+CD8^+$) e positivos simples ($CD4^+CD8^-$ e $CD4^-CD8^+$).

3.3.5 Simpatectomia química com 6-hidroxi-dopamina

A simpatectomia química foi realizada através de injeções de 6-hidroxi-dopamina, conforme descrito por Asada-Kubota, em 1995, com modificações. Os camundongos, 24 horas antes da primeira sessão de estresse de contenção, receberam 0,1mL de 6-hidroxi-dopamina diluída em solução salina isotônica (dose de 0,3mg/g de peso corpóreo). A administração foi realizada via injeção subcutânea na região torácica. Os animais controle, submetidos ao estresse de contenção e não tratados com 6-hidroxi-dopamina, receberam apenas 0,1mL de solução salina isotônica, também administrada pela mesma via. Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, após 5 sessões de estresse de contenção. O timo foi retirado, fixado em Bouin para análise histológica ou congelado a -80°C . O tecido congelado foi utilizado para controle da simpatectomia, o que foi realizado através da técnica de fluorescência induzida por ácido glioxílico. Secções de timo foram obtidas em criostato e colocadas sobre lâmina histológica mergulhada em solução aquosa de ácido glioxílico a 1,5%, sacarose a 10,2% e fosfato de sódio monobásico a 4,8% em pH 7,4, durante 30 segundos. Após secagem por 30 minutos sob corrente de ar frio, as secções foram cobertas com óleo mineral (Nujol, Johnson), e as lâminas deixadas em estufa a 60°C por 30 minutos, sendo estas montadas com lamínulas. A simpatectomia foi confirmada através da avaliação do material em fotomicroscópio de fluorescência.

3.4 Análise da resposta do baço ao estresse crônico de contenção

3.4.1 Avaliação do peso e da celularidade

Assim que os animais foram sacrificados, seus baços foram removidos e pesados em balança com sensibilidade de 0,0001g. A relação peso do baço/peso do animal foi calculada.

3.4.2 Análise da expressão de marcadores de ativação em esplenócitos

Para esta análise, foi utilizada a metodologia já descrita no item 3, subitem 3.3. As estratégias utilizadas também foram as mesmas já descritas no item 3.3.4.

3.5 Documentação fotográfica

Para ilustração fotográfica, utilizou-se câmara fotográfica Cannon Rebel G com objetiva macro e filme Kodak Ultra ASA 400. Para documentação dos dados histológicos, utilizou-se o fotomicroscópio Ultraphot III Zeiss e filme Gold Plus ASA 100, da Kodak.

3.6 Análise estatística

Para análise estatística dos dados de citometria de fluxo, foi utilizada a análise de Variância ANOVA ONEWAY, seguida de Teste t de *Student* para avaliação da diferença entre os grupos. Foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0.05$).

4. RESULTADOS

4.1 Observações gerais relativas ao modelo experimental

Os animais apresentaram resistência para entrar nos tubos de contenção nos dois primeiros dias de estresse. A partir do terceiro dia, passaram a entrar com mais facilidade. Ao final das sessões de estresse, alguns animais apresentaram início de alopecia na região abdominal, conforme demonstrado nas figuras 5A e 5B.

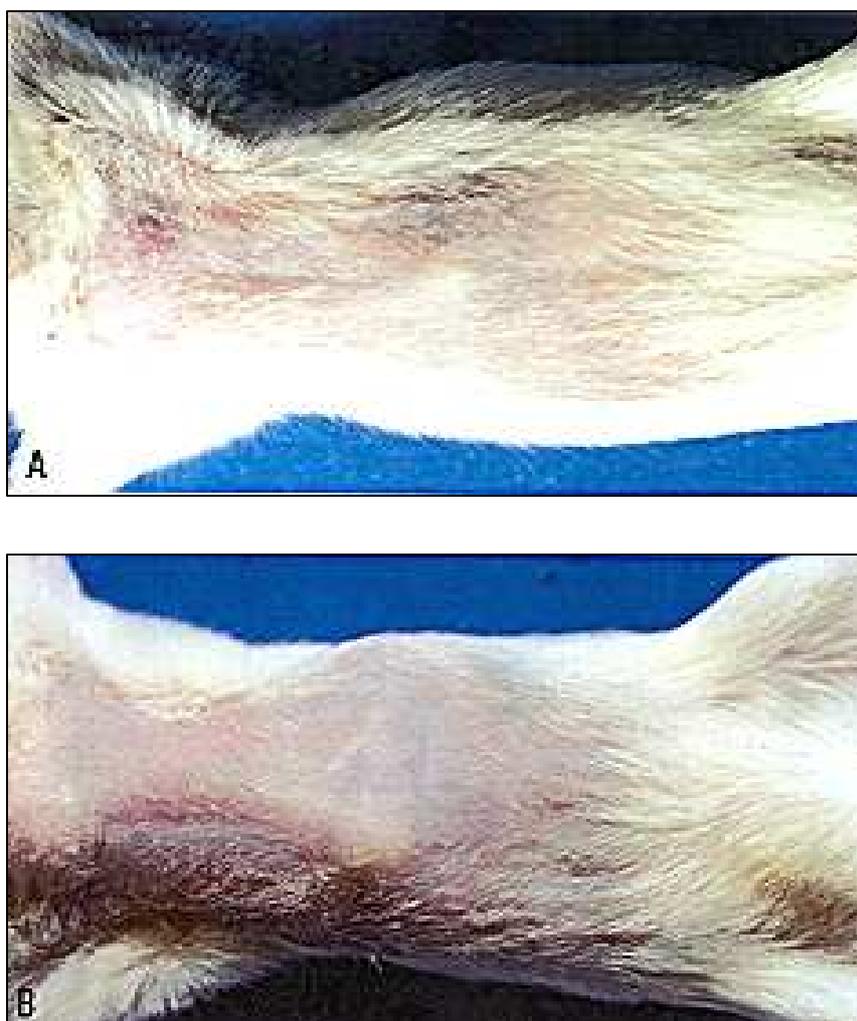


FIGURA 5 - Fotos da região abdominal de animal do grupo controle (A) e de animal do grupo submetido ao estresse crônico de contenção (B).

O nível de cortisol plasmático detectado nos camundongos submetidos às sessões de estresse foi significativamente ($p < 0,05$) superior ao do grupo controle, demonstrando a eficiência do protocolo experimental utilizado (GRÁFICO 2).

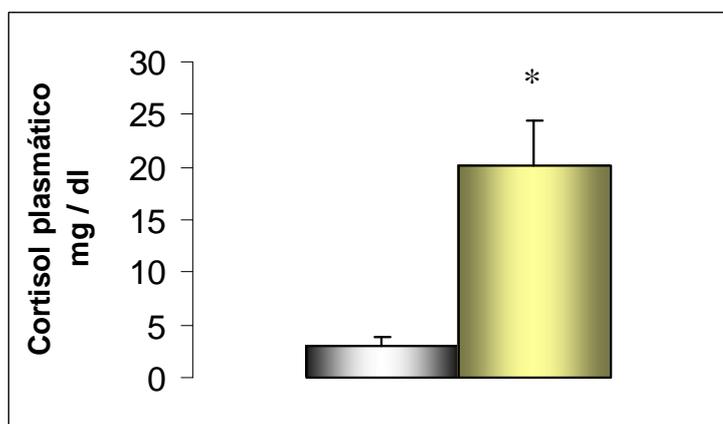


GRÁFICO 2: Média dos níveis de cortisol plasmático em camundongos submetidos a 5 dias de estresse crônico de contenção (■) e em animais controles (■). O asterisco indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos avaliados e as barras representam a média dos níveis de cortisol plasmático, acompanhadas do desvio padrão.

4.2 Caracterização da involução tímica

A caracterização da involução tímica foi realizada através da avaliação do peso e da celularidade do órgão, da análise histológica e da determinação fenotípica dos timócitos nos dois grupos estudados.

4.2.1 Avaliação do peso e da celularidade do timo

Nossos resultados mostraram redução significativa ($p < 0,05$) do peso do timo, de 46%, nos animais submetidos ao estresse crônico de contenção, quando comparados aos do grupo controle (GRÁFICO 3).

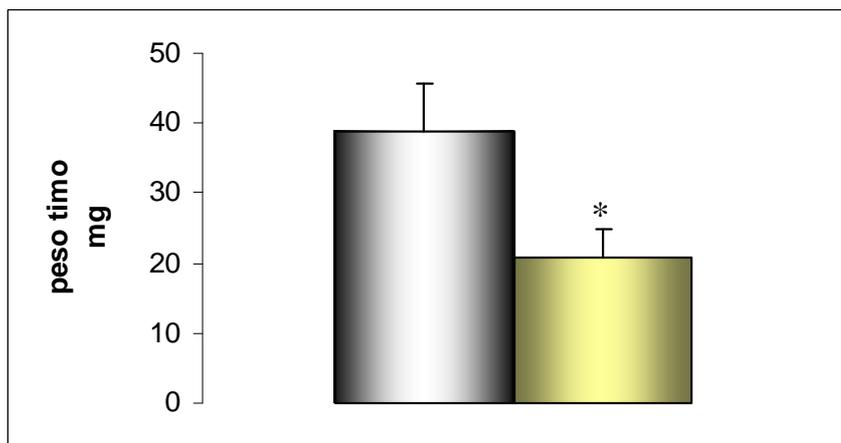


GRÁFICO 3 - Peso do timo de camundongos submetidos ao estresse de contenção (■) e de animais do grupo controle (□). O asterisco indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos analisados e as barras representam a média do peso do timo, acompanhadas do desvio padrão.

A contagem de timócitos foi realizada em câmara de *Neubauer*, demonstrando uma redução de 83% no grupo estressado, quando comparado ao grupo controle ($p < 0,05$).

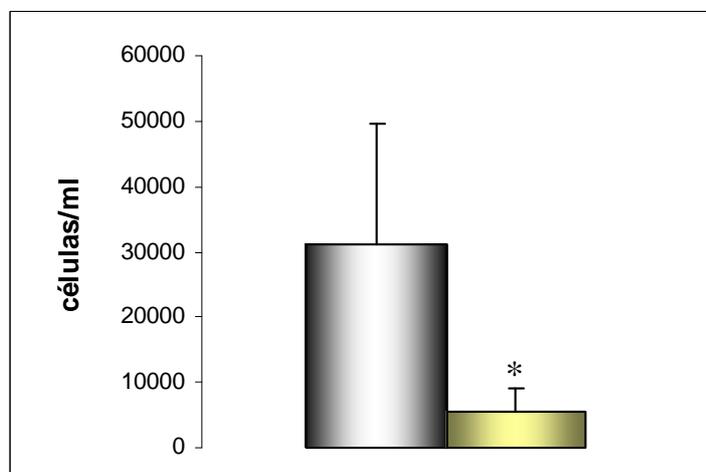


GRÁFICO 4 - Celularidade do timo de camundongos submetidos a estresse crônico de contenção (■) e de animais do grupo controle (□). O asterisco indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos analisados e as barras representam a média do número de timócitos (células/ml), acompanhadas do desvio padrão.

4.2.2 Análise histológica

Camundongos submetidos ao estresse crônico de contenção demonstraram hipoplasia tímica, com contração acentuada da região cortical (FIGURAS 6A e 6B). Os vasos sanguíneos apresentaram-se dilatados, com pontos de extravasamento de hemácias. Em alguns locais, o parênquima foi parcialmente substituído por pontos de fibrose.

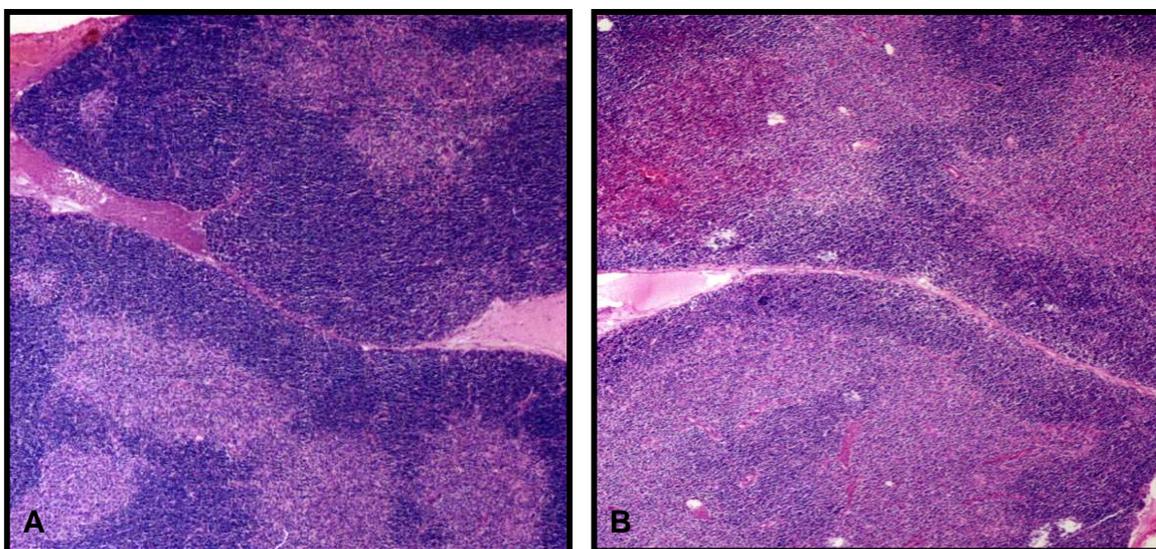


FIGURA 6 - Secções de timos de um camundongo controle (A) e de um animal submetido ao estresse crônico de contenção (B). Notam-se arquitetura normal das camadas medular e cortical em animais controles em A e redução da camada cortical em animais submetidos ao estresse crônico de contenção em B. Objetiva com aumento de 20x.

4.2.3 Análise da expressão de marcadores de diferenciação em timócitos

Foi realizada avaliação do processo de comprometimento da diferenciação de timócitos pelo estresse crônico de contenção, através de citometria de fluxo. A expressão de CD44, CD25, CD3, CD4, CD8 definem estágios distintos de diferenciação das células T intratímicas: timócitos triplo-negativos ($CD3^-CD4^-CD8^-$), duplo-positivos ($CD4^+CD8^+$) e positivos simples ($CD4^+CD8^-$ ou $CD4^-CD8^+$). Timócitos triplo-negativos dividem-se em quatro subgrupos: pró-T1 ($CD44^+CD25^-$), pró-T2 ($CD44^+CD25^+$), pró-T3 ($CD44^-CD25^+$) e pró-T4 ($CD44^-CD25^-$) (Baird, 1999) (FIGURA7).

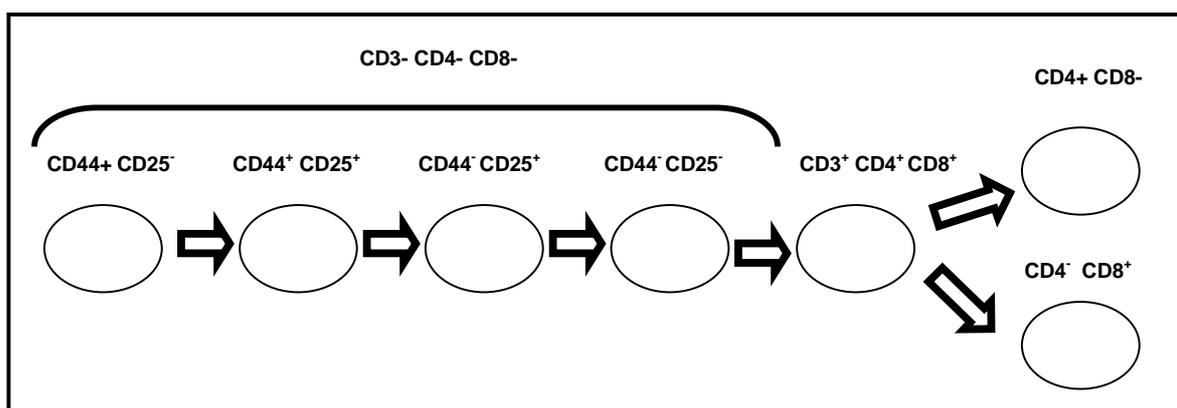


FIGURA 7 - Etapas do processo de diferenciação de timócitos.

O GRÁFICO 5 mostra que camundongos submetidos ao estresse crônico de contenção apresentaram aumento no percentual de timócitos $CD3^-$ ($p=0,02$). Ao avaliarmos a expressão de CD44 e CD25 nessas células, observamos variações significativas nas freqüências das subpopulações distintas entre os dois grupos experimentais analisados. O estresse crônico de contenção resultou em aumento de 78% e 170% das populações pró-T1 ($CD44^+CD25^-$) ($p=0,03$) e pró-T2 ($CD44^+CD25^+$) ($p=0,04$), respectivamente; e decréscimo de 61% e 34% das populações pró-T3 ($CD44^-CD25^+$) ($p=0,005$) e pró-T4 ($CD44^-CD25^-$) ($p=0,05$), respectivamente.

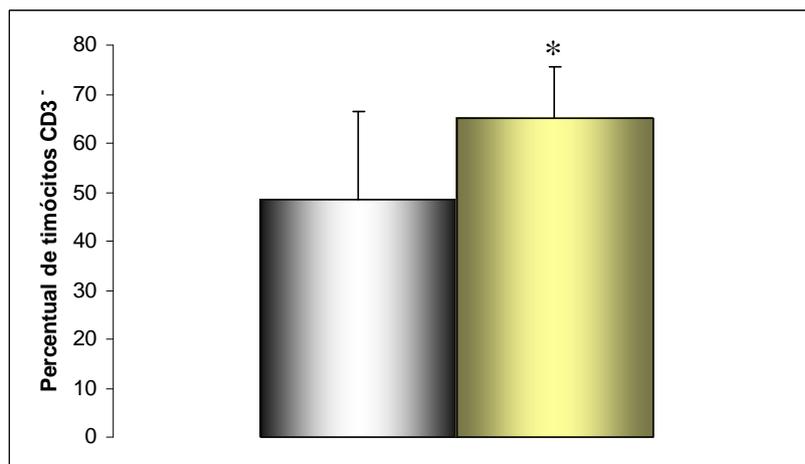


GRÁFICO 5 - Percentual de timócitos CD3⁺ de camundongos submetidos ao estresse crônico de contenção (■) e do grupo controle (■). O asterisco indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos analisados e as barras representam a média do percentual de timócitos CD3⁺ acompanhadas do desvio padrão.

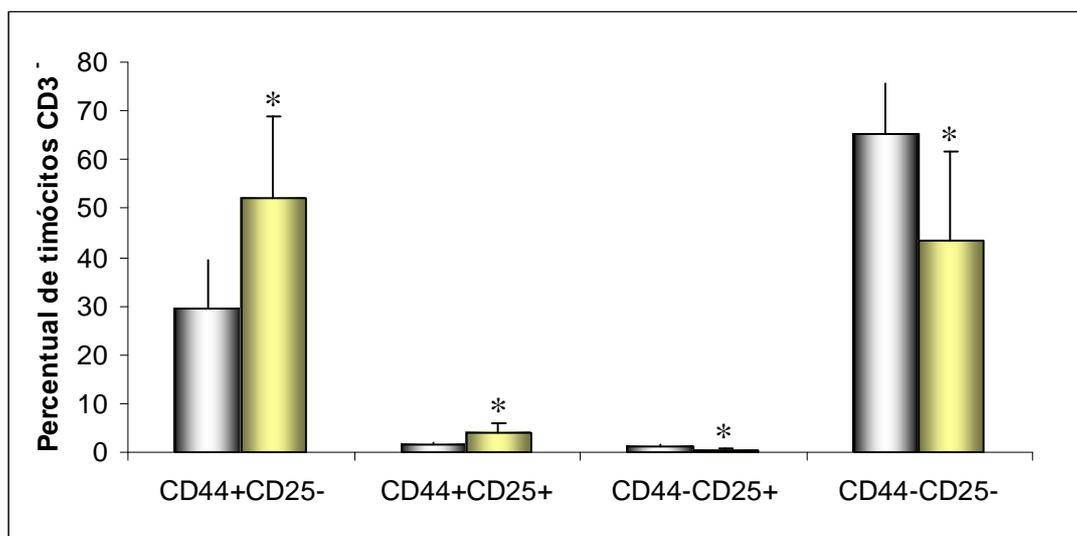


GRÁFICO 6 - Análise das freqüências de timócitos CD3⁺ (pró-T1, pró-T2, pró-T3 e pró-T4) em camundongos submetidos ao estresse crônico de contenção (■), e em animais do grupo controle (■). Os asteriscos indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos analisados e as barras representam a média das freqüências das populações de timócitos CD3⁺, acompanhadas do desvio padrão.

4.2.4 Frequência de CD4 e CD8 em timócitos CD3⁺

O gráfico 7 mostra que camundongos submetidos ao estresse crônico de contenção apresentaram redução no percentual de timócitos CD3⁺ ($p=0,01$). Conforme demonstrado no gráfico 8, observamos que animais submetidos ao estresse crônico de contenção apresentaram uma diminuição significativa das células duplo-negativas ($p=0,001$) e aumento das células duplo-positivas ($p=0,02$). Observamos, ainda, um aumento importante na população CD8⁺ ($p=0,06$), embora não estatisticamente significativo.

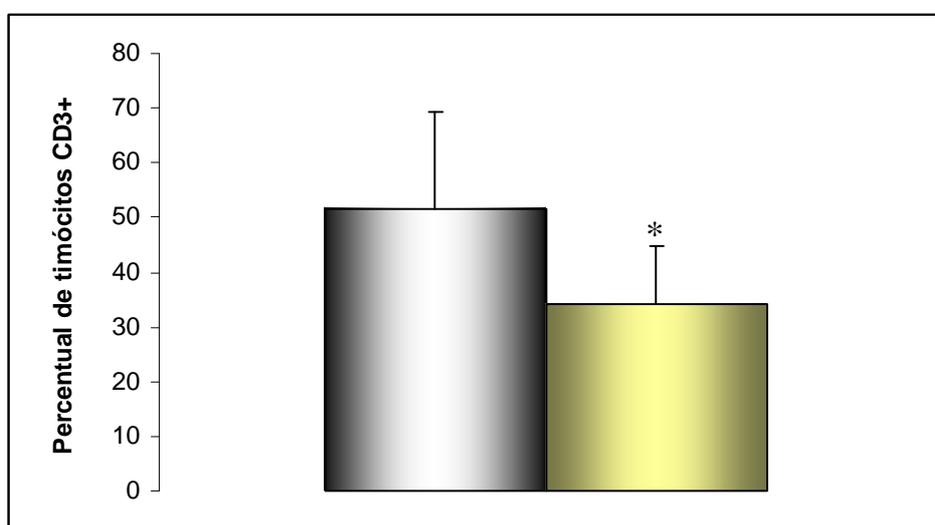


GRÁFICO 7 - Percentual de timócitos CD3⁺, em camundongos submetidos ao estresse crônico de contenção (■) e em animais do grupo controle (□). O asterisco indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos analisados e as barras representam a média do percentual de timócitos CD3⁺, acompanhadas do desvio padrão.

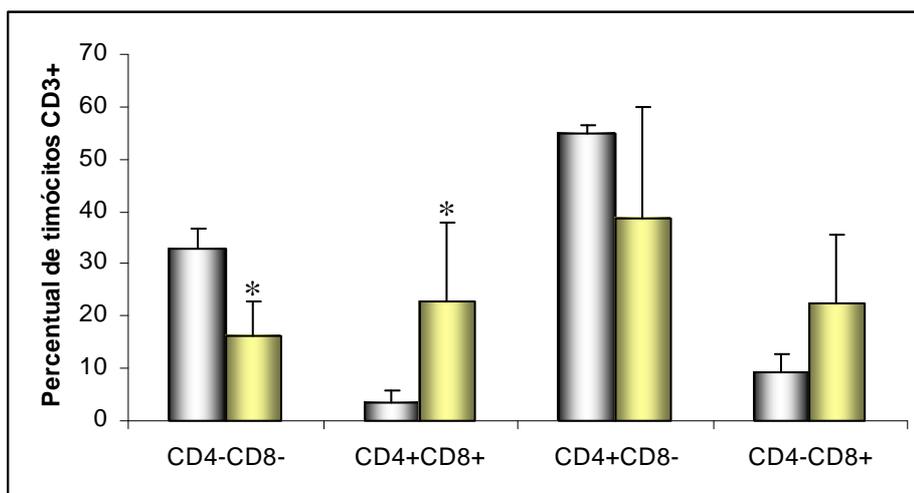


GRÁFICO 8 - Análise das freqüências de timócitos CD3⁺ (CD4⁻CD8⁻, CD4⁺CD8⁺, CD4⁺CD8⁻ e CD4⁻CD8⁺) em camundongos submetidos ao estresse crônico de contenção (■) e em animais do grupo controle (□). O asterisco indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos analisados e as barras representam a média das freqüências da expressão de CD4⁺ e CD8⁺ em timócitos CD3⁺, acompanhadas do desvio padrão.

4.2.5 Efeitos do pré-tratamento com 6-hidroxi-dopamina

O pré-tratamento com 6-hidroxi-dopamina não inibiu a involução tímica induzida pelo estresse crônico de contenção. Análises histológicas do timo retirado de animais pré-tratados e submetidos a estresse de contenção revelaram intensa fibrose, especialmente na região cortical (FIGURA 8).

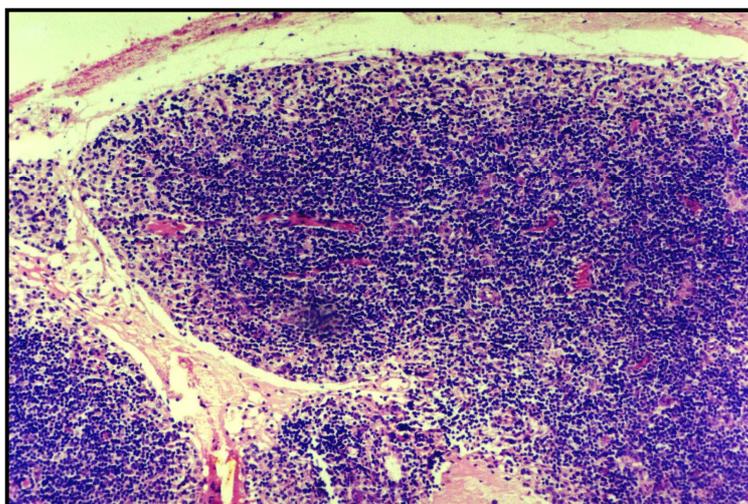


FIGURA 8 - Secção de timo do camundongo pré-tratado com 6-OH-dopamina e submetido ao estresse de contenção crônico. Notam-se o desaparecimento das camadas cortical e medular e o aparecimento de intensa fibrose, especialmente na região cortical.

4.3 Resposta do baço ao estresse crônico de contenção

4.3.1 Avaliação do peso e da celularidade do baço

O gráfico 9 apresenta os resultados do peso do baço de animais submetidos ao estresse crônico de contenção e de animais controles. Não foram observadas diferenças entre os grupos avaliados. No entanto, foi observada uma diminuição significativa na celularidade do baço dos camundongos submetidos a estresse quando comparados com o grupo controle (GRÁFICO 10)

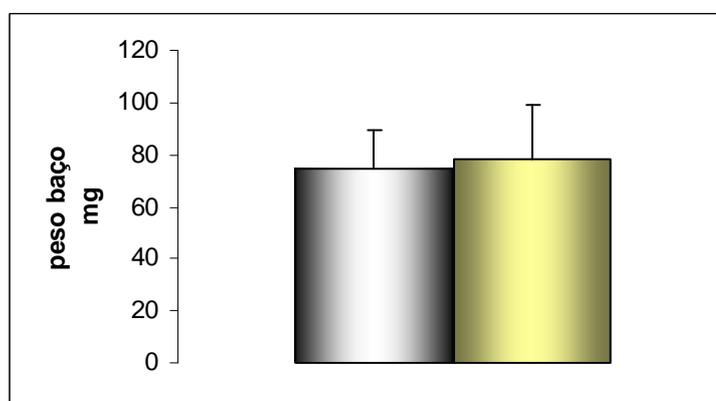


GRÁFICO 9 - Peso do baço de camundongos submetidos ao estresse crônico de contenção (■) e do grupo controle (■). As barras representam a média do peso do baço, acompanhadas do desvio padrão.

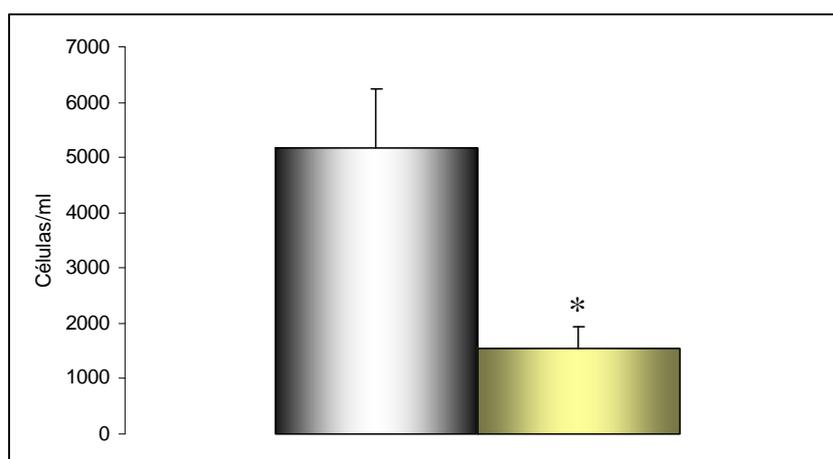


GRÁFICO 10 - Celularidade do baço de camundongos submetidos a estresse crônico de contenção (■) e do grupo controle (■). O asterisco indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos analisados e as barras representam a média do número de esplenócitos (células/ml), acompanhadas do desvio padrão.

4.3.2 Frequência de expressão de CD4 e CD8 em esplenócitos CD3⁺

O gráfico 11 apresenta os resultados do percentual de esplenócitos CD3⁺. Observamos que animais submetidos ao estresse crônico de contenção apresentaram aumento significativo de esplenócitos CD3⁺. Com relação à expressão de CD4 e CD8 nesta população, notamos o mesmo já evidenciado para timo. Observamos um aumento significativo ($p < 0,05$) das células duplo-positivas e uma redução importante na população CD4⁺CD8⁻ (GRÁFICO 12).

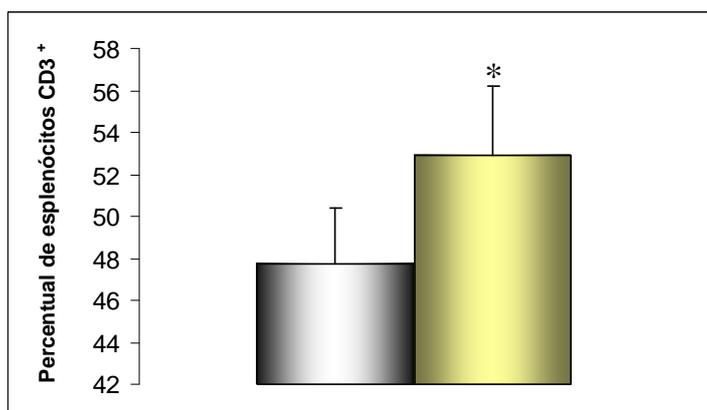


GRÁFICO 11 - Percentual de esplenócitos CD3⁺ em animais submetidos ao estresse crônico de contenção (■) e camundongos do grupo controle (□). O asterisco indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos analisados e as barras representam a média do percentual de esplenócitos CD3⁺, acompanhadas do desvio padrão.

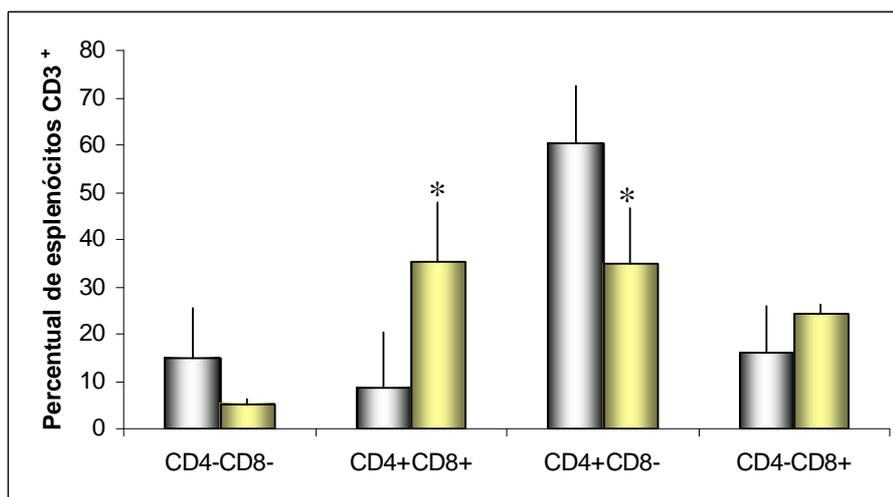


GRÁFICO 12 - Análise das frequências da expressão de esplenócitos CD3⁺ (CD4⁻CD8⁻, CD4⁺CD8⁺, CD4⁺CD8⁻ e CD4⁻CD8⁺) em camundongos submetidos ao estresse de contenção crônico (■) e em animais do grupo controle (□). O asterisco indica diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos analisados e as barras representam a média das frequências das populações de esplenócitos CD3⁺, acompanhadas do desvio padrão.

5. DISCUSSÃO

O estresse é uma condição de alteração da homeostase do organismo que vem sendo discutida desde 1936, quando Hans Selye demonstrou que animais submetidos a condições estressantes apresentavam involução tímica mediada pela glândula adrenal e que o mesmo não ocorria em animais adrenalectomizados estressados. Desde então, busca-se esclarecer os fenômenos envolvidos na reação frente a estímulos estressores, determinada pelo sistema nervoso central agindo na modulação do sistema imune, através de vias de comunicação bidirecional que também envolvem o sistema endócrino.

Na literatura, vários trabalhos têm demonstrado associação entre estresse e alterações do sistema imune, dentre as quais podemos citar a involução tímica, com alteração da diferenciação de linfócitos T e uma reestruturação dos componentes celulares do sistema imune (Tarcic *et al.*, 1998; Frieri, 2003; Padgett *et al.*, 2003). Para caracterizar as alterações na diferenciação de linfócitos T ocorridas em função do estresse crônico de contenção, utilizamos um modelo experimental, previamente estabelecido em nosso laboratório. Os estudos que avaliam a influência do estresse crônico nos sistemas endócrino, imune e nervoso, em sua maioria, foram realizados em ratos (Dhabhar *et al.*, 1994, 1995, 1997, 2000) e em humanos (Bauer *et al.*, 2001, 2003; Sternberg *et al.*, 1998, 2001; Shanks *et al.*, 1994). Já em nosso trabalho, utilizamos camundongos. É importante ressaltar que existe uma disponibilidade muito maior de anticorpos no mercado para camundongos, facilitando assim, a realização de diversos estudos envolvendo o estresse e as alterações imunológicas.

Um dos principais parâmetros utilizados para avaliar a indução de estresse é o aumento sistêmico dos níveis de cortisol. Para certificarmos da eficiência da metodologia de contenção dos camundongos na indução do estresse, realizamos medição dos níveis plasmáticos de cortisol momentos antes do sacrifício dos animais. Observamos um aumento de 86% nos níveis de cortisol nos camundongos submetidos ao estresse de contenção, quando comparados aos animais do grupo controle.

Os corticóides, em altas concentrações, têm efeito sobre células do sistema imune, de maneira que qualquer estresse que altere o eixo HPA pode ter considerável influência sobre a função deste sistema. (Dhabhar, 1995; Bertok, 1998; Davis, 1998; Gaillard, 1998; Sacedon, 1998; Szabo, 1998; Chrousos, 2000; Conti, 2000; Pruett, 2000). Tendo constatado o aumento dos níveis de cortisol nos animais submetidos à contenção, iniciamos a avaliação das alterações ocorridas no timo, bem como o papel da inervação noradrenérgica neste processo. Realizamos, ainda, a fenotipagem de linfócitos T no baço com o objetivo de investigar a repercussão da involução tímica no sistema linfocitário T periférico.

O timo é um órgão linfóide primário e constitui o principal sítio de amadurecimento das células T, proporcionando estímulos necessários para a proliferação e maturação dos timócitos (Killeen *et al.*, 1998). Em nosso trabalho, observamos redução significativa no peso e celularidade do timo dos animais estressados, quando comparados aos animais do grupo controle. A redução mais evidente foi observada na camada cortical do timo. A celularidade dos tecidos linfóides depende não só das taxas de recrutamento e saída de células, mas também dos índices de proliferação celular e de morte celular, essa última principalmente decorrente da apoptose. Dados da literatura demonstram que o cortisol induz apoptose em timócitos, principalmente nas fases iniciais de desenvolvimento que acontecem na camada cortical do órgão (Tarcic *et al.*, 1998). É possível que a involução tímica observada em nosso modelo, que acomete principalmente a camada cortical, seja devido, pelo menos em parte, à elevação do cortisol induzida pelo estresse.

Além do cortisol, as catecolaminas também são aumentadas durante o estresse, o que sugere sua participação no processo de involução tímica. Além disso, durante o envelhecimento na fase adulta, paralelamente ao processo de involução tímica, ocorre aumento dos níveis tímicos de noradrenalina (Cavalloti *et al.*, 1999), bem como aumento da densidade de fibras noradrenérgicas neste órgão (Madden *et al.*, 1998). Em timos de ratos, fibras noradrenérgicas são encontradas densamente distribuídas na camada subcapsular do córtex e na junção cortico-medular e em menor concentração na região medular (Kendall *et al.*, 1991). Para

avaliar a participação da noradrenalina no processo de involução tímica induzido pelo estresse de contenção, utilizamos o modelo de adrenalectomia química através da 6-OH-DA. Esta substância destrói os terminais noradrenérgicos periféricos e interfere na atividade da tirosina hidroxilase, alterando a síntese de dopamina (Asada Kubota *et al.*, 1995). Em roedores, a 6-OH-DA é utilizada para investigar a interação entre os sistemas nervoso e imune (Madden *et al.*, 1991; Kruszewska *et al.*, 1995).

Em nosso trabalho, o pré-tratamento dos camundongos com 6-OH-DA não inibiu a involução tímica induzida pelo estresse. Ao contrário, análises histológicas revelaram que a 6-OH-DA intensificou a involução tímica, além de alterar significativamente a distribuição de células nas regiões cortical e medular do órgão. Kendal *et al.* (1991) observaram em ratos normais tratados com 6-OH-DA, alterações no timo como diminuição da celularidade, aumento da taxa de apoptose e aumento no número de células proliferativas no córtex. Em conjunto, as nossas observações e os dados da literatura indicam um papel essencial para a inervação simpática na manutenção da fisiologia e arquitetura tímica, mas não suportam um papel para a noradrenalina como mediador único da involução tímica induzida pelo estresse de contenção.

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. Tal fenômeno poderia ocorrer tanto por um comprometimento do processo de diferenciação da linhagem linfóide na medula, como por uma deficiência no processo de migração de pré-timócitos para o timo. A circulação de células da linhagem linfóide envolve a expressão ordenada e diferenciada de moléculas de adesão pelas células em diferentes estágios de maturação e ativação, bem como a produção de fatores quimiotáticos, a produção de citocinas e a expressão dos ligantes nas células endoteliais de diferentes órgãos. Vários trabalhos demonstram alterações nessa dinâmica decorrentes do estresse agudo em modelos experimentais (Dhabhar *et al.*, 1995; Bauer *et al.*, 2001), mas não encontramos estudos na literatura que tenham avaliado a taxa de migração de pré-timócitos do timo para a medula.

Com o objetivo de aprofundar nossas investigações sobre a involução tímica induzida pelo estresse crônico de contenção, analisamos, por citometria de fluxo, o fenótipo dos timócitos em diferenciação. Observamos aumento da porcentagem de timócitos CD3⁻ e diminuição da frequência de células CD3⁺. Esses dados, de uma certa forma, contradizem a análise histológica que mostra uma redução mais significativa da camada cortical do timo, onde são encontradas as células nos estágios iniciais de diferenciação (timócitos CD3⁻). É possível que a distribuição de células CD3⁻ e CD3⁺ no timo do animal submetido a estresse não corresponda àquela encontrada no animal normal, fato que poderia ser investigado através de análises imunohistoquímicas. Neste caso, linfócitos em estágios iniciais de diferenciação poderiam estar migrando para a região medular do timo e até saindo desse órgão não completamente diferenciados.

Dominguez-Gerpe e Rey-Méndez (2001) relataram resultados de estudo sobre a involução tímica em camundongos C57BL/6 submetidos a estresse crônico de contenção por 14 dias. Esses autores observaram uma diminuição da frequência de células CD3⁻, ao contrário do observado em nosso modelo. Esta diferença poderia ser explicada pelo tempo de estresse entre os dois modelos. Como já mencionado anteriormente, a resposta ao estresse depende da idade do animal, do período do dia em que o animal é submetido ao agente estressor e ainda do tempo de estresse. No trabalho mencionado acima não foram analisadas alterações específicas de timócitos CD3⁻ ou CD3⁺ em estágios distintos de diferenciação.

Os timócitos CD3⁻ passam por, pelo menos, quatro estágios de diferenciação, definidos pela expressão de CD44 e CD25. Observamos aumento da frequência das células pró-T1 (CD3⁻CD44⁺CD25⁻) e pró-T2 (CD3⁻CD44⁺CD25⁺) e diminuição das células pró-T3 (CD3⁻CD44⁻CD25⁺) e pró-T4 (CD3⁻CD44⁻CD25⁻), revelando que o estresse de contenção compromete especificamente eventos importantes para a diferenciação de pró-T2 para pró-T3. Considerando que as etapas de diferenciação no timo são reguladas pela ativação diferencial de fatores de transcrição (Rothenberg *et al.*, 2005), tais como Notch, GATA 3, fatores de transcrição da família Runx, da família Ikaros, protooncogene c-Myb, dentre outros, é possível que as alterações neuro-endócrinas decorrentes do estresse afetem, de forma diferenciada, a ativação

ou a inibição de distintos fatores de transcrição, o que explicaria a alteração observada.

Com o objetivo de avaliar as fases mais tardias do processo de diferenciação de timócitos, utilizamos a tripla marcação para as glicoproteínas CD3, CD4 e CD8. Trabalhos relatados na literatura mostram que na parte mais externa do córtex, os timócitos duplo-negativos ($CD4^-CD8^-$) proliferam e começam o processo de recombinação somática aleatória dos genes do TCR, levando à expressão do pré-TCR, juntamente com os co-receptores CD4 e CD8 (Killeen *et al.*, 1998). Em seguida, expressam as duas cadeias do TCR, sofrem os processos de seleção positiva e negativa e tornam-se células maduras de positividade única ($CD4^+CD8^-$ ou $CD4^-CD8^+$) (Janeway *et al.*, 2002).

Em nosso trabalho, observamos nos camundongos submetidos ao estresse crônico de contenção uma diminuição significativa das células duplo-negativas e aumento na porcentagem das células duplo-positivas. Observamos, ainda, aumento da porcentagem de células $CD8^+CD4^-$, e diminuição na frequência da subpopulação $CD4^+CD8^-$. Nossos dados sugerem que o estresse crônico de contenção afeta não só os estágios iniciais de diferenciação dos timócitos, mas também os estágios tardios desse processo. É importante ressaltar que o processo de seleção negativa dos timócitos ocorre nos estágios tardios de diferenciação. Nesse processo de seleção, timócitos cujos TCR se ligam com grande avidéz a peptídeos próprios, apresentados pelas células apresentadoras de antígenos tímicas, são eliminados através da apoptose (Janeway *et al.*, 2002). Dessa forma, é possível que o estresse crônico de contenção possa alterar o processo de seleção de timócitos, permitindo a sobrevivência e saída de células auto-reativas, levando à perda da tolerância central, o que favoreceria o surgimento de doenças auto-imunes. Na literatura, diversos trabalhos têm demonstrado relação entre estresse e desenvolvimento de doenças auto-imunes (Sternenberg, 2001; Elenkov *et al.*, 2002).

A redução de linfócitos $CD3^+CD4^+CD8^-$ no timo de camundongos submetidos a estresse crônico poderia ser explicada por comprometimento do processo de diferenciação, elevação da taxa de apoptose ou ainda aumento na liberação dessa subpopulação para os órgãos linfóides periféricos. Para avaliação do sistema linfóide

periférico, utilizamos o baço. A análise do fenótipo dos linfócitos T deste órgão revelou diminuição de linfócitos $CD3^+CD4^+CD8^-$, mostrando que a última hipótese levantada acima não pode ser considerada para explicar a diminuição dessa subpopulação no timo.

A diminuição de linfócitos T $CD4^+$ no baço dos animais submetidos a estresse poderia levar a uma deficiência secundária de linfócitos B, dada a importância daqueles no processo de ativação de células B. Não podemos confirmar esta hipótese, mas nossos dados sugerem que isso possa realmente estar acontecendo. Análises por citometria de fluxo do baço dos animais submetidos a estresse mostraram que, no *gate* de linfócitos, a porcentagem de linfócitos T aumentou, sugerindo diminuição da frequência de linfócitos B.

É interessante notar as semelhanças entre as alterações observadas no baço e no timo. Observamos, no baço de animais submetidos ao estresse, redução da população $CD3^+CD4^+CD8^-$ e aumento da frequência de linfócitos $CD3^+CD4^-CD8^+$. Além disso, observamos presença significativa de linfócitos $CD3^+CD4^+CD8^+$, ou seja, com fenótipo de células imaturas. É possível que estas alterações possam repercutir na alteração da montagem de respostas imunes. Embora não tenhamos avaliado neste trabalho distúrbios nos mecanismos efetores das respostas imunes em camundongos submetidos ao estresse, vários trabalhos na literatura apontam para uma associação entre estresse crônico e desenvolvimento de doenças de base imunológica, como doenças auto-imunes e doenças infecciosas.

Alternativamente, as células imaturas observadas no baço, poderiam originar-se de outras vias extra-tímicas de diferenciação de linfócitos T, que ocorrem principalmente no fígado e no intestino. De acordo com Abo (2001), é possível que, paralelamente ao processo de atrofia tímica induzida pelo estresse ou pelo envelhecimento, o processo de diferenciação de linfócitos T extra-tímicos seja estimulado.

Ao compararmos nossos resultados àqueles obtidos em modelos experimentais de estresse agudo, podemos observar algumas diferenças. Pruett *et al.* (2000), utilizando camundongos BALB/c em modelo de estresse de contenção agudo, observaram atrofia acentuada do timo, com diminuição do número total de

células. No timo e no baço, o estresse afetou levemente a proporção das subpopulações de linfócitos, muito embora ambos tenham demonstrado drástica redução no número total destas células. Houve significativa redução do número de células $CD4^+CD8^+$, ligeiro decréscimo de células $CD4^+CD8^-$ e nenhuma alteração na subpopulação celular $CD8^+CD4^-$. Os autores atribuem as observações acima tanto à elevação no índice de apoptose, como ao aumento da taxa de liberação de células para a corrente sanguínea. Resultados semelhantes foram obtidos por Padgett *et al.* (1998). Em nosso trabalho, observamos aumento das células $CD4^+CD8^+$, enquanto esses autores observaram redução. Vimos diminuição das células $CD4^+CD8^-$ da mesma forma que os autores acima citados e aumento das células $CD4^-CD8^+$, diferente desses autores. Fato é que, tanto no estresse agudo como no estresse crônico houve um comprometimento do processo de diferenciação celular, com uma diminuição do fenótipo das células $CD4^+CD8^-$.

É importante ressaltar a existência de semelhanças imunológicas entre o estresse crônico e o processo de envelhecimento. O processo de envelhecimento depende também dos fatores biológico, psíquico e social. Acredita-se que a somatória de eventos de estresse, quebrando a homeostase, seja um dos mecanismos responsáveis pelas alterações imunológicas associadas ao envelhecimento. Uma das conseqüências do envelhecimento é a atrofia tímica. O timo sofre uma diminuição progressiva de tamanho devido a alterações anatômicas associadas à perda de células epiteliais tímicas e redução da timopoiese (Bauer *et al.*, 2005). Aspinal *et al.* (1997) mostraram que, em camundongos idosos, ocorre uma redução na população de timócitos pró-T3, demonstrando um comprometimento no processo de diferenciação de pró-T2 para pró-T3. Interessantemente, o mesmo foi observado no nosso modelo de estresse crônico. 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 a ativação de linfócitos B e a produção de anticorpos (Aspinal *et al.*, 2003). Bauer *et al.* (2005) relataram diminuição do número de linfócitos B no sangue e acúmulo de auto-anticorpos em humanos. Não avaliamos neste trabalho a frequência de linfócitos B periféricos, mas nossos dados de aumento

da frequência de células CD3+ no *gate* de linfócitos e diminuição dos linfócitos auxiliares, sugerem que também no estresse crônico, a resposta de linfócitos B possa estar comprometida.

Por fim, vale a pena lembrar que desde a Grécia antiga até o início do século XX, médicos e pacientes acreditavam que a mente tivesse efeitos sobre a doença e isso era levado em consideração no tratamento das enfermidades. Com o advento dos antibióticos, passou-se a ignorar o fato de que as respostas do próprio corpo pudessem influenciar a suscetibilidade e o desenvolvimento das doenças. O estresse, hoje, afeta 90% da população mundial, segundo dados da Organização Mundial de Saúde. Nossos dados aqui apresentados suportam a hipótese de que o estresse é capaz de causar alterações significativas no processo de diferenciação de células T no timo e levar a alterações em órgãos periféricos. Determinamos as etapas de diferenciação mais comprometidas pelo estresse crônico de contenção e acreditamos que essas informações possam servir como referência para estudos moleculares futuros acerca dos mecanismos responsáveis por tais alterações. Além disso, para a melhor compreensão dos efeitos do estresse no sistema imunológico, é importante que sejam avaliadas ainda neste modelo, alterações nos mecanismos efetores das respostas imunes. Isto deverá ser efetivado através da análise da produção de citocinas, da expressão de moléculas de adesão, de moléculas co-estimulatórias e de marcadores de ativação celular em diferentes compartimentos teciduais.

6. CONCLUSÕES

O estresse crônico de contenção em camundongos BALB/c induz involução tímica, o que pode ser observado pela diminuição do peso e da celularidade do órgão, além de diminuição da camada cortical.

No processo de diferenciação de timócitos, as etapas mais comprometidas são aquelas correspondentes à diferenciação de pró-T2 para pró-T3 e no desenvolvimento final de linfócitos T CD3⁺CD4⁺CD8⁺. Alterações semelhantes são observadas no baço, sugerindo serem estas uma repercussão do processo de involução tímica.

A simpatectomia química com 6-hidroxi-dopamina não inibiu a involução tímica induzida pelo estresse crônico de contenção, não suportando um papel para a noradrenalina como mediador desse processo.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABO, T. Extrathymic pathways of T-cell differentiation and immunomodulation. *International Immunopharmacology*. v.1, p.1261-1273, 2001.
2. ADLER, R., FELTER, D.L., COHEN, N. *Psychoneuroimmunology*. 2ed. Academic Press: San Diego, 1991.
3. ASPINALL, R. Age-associated thymic atrophy in the mouse is due to a deficiency affecting rearrangement of the TCR during intrathymic T cell development. *Journal of Immunology*. v.158, p.3037-3045, 1997.
4. ASPINALL, R., ANDREW, D. Age-associated thymic atrophy is not associated with a deficiency in the CD44⁺CD25⁺CD3⁻CD4⁻CD8⁻ thymocyte population. *Cellular Immunology*. v.212, p.150-157, 2001.
5. ASADA-KUBOTA, M. Inhibition of hair growth by subcutaneous injection of a sympathetic neurotoxin, 6-hydroxydopamine in neonatal mice. *Anatomy Embryology*. v.191, n.5, p.407-414, 1995.
6. BAIRD, A., GERSTEIN, R. M., BERG, L. J. The Role of Cytokine Receptor Signaling in Lymphocyte Development. *Current Opinion in Immunology*. v.11, p.157-166, 1999.
7. BAUER, M.E. et al. Chronic stress in caregivers of dementia patients is associated with reduced lymphocyte sensitivity to glucocorticoids. *Journal of Neuroimmunology*. v.103, p.84-92, 2000.
8. BAUER, M. E. et al. Are adhesion molecules involved in stress-induced changes in lymphocyte distribution? *Life Sciences*. v.69, p.1167-1179, 2001.
9. BAUER, M.E. et al. Restraint stress is associated with changes in glucocorticoid immunoregulation. *Physiology & Behavior*. v.73, p.525-532, 2001.
10. BAUER, M.E. et al. Estresse: como ele abala as defesas do corpo. *Ciência Hoje*. v.30, p.20-25, 2002.
11. BAUER, M.E., et al. Impact of psychological and endocrine factors on cytokine production of healthy elderly people. *Mechanisms of Ageing and Development*. v.124, p.887-895, 2003.
12. BAUER, M.E. Stress, glucocorticoids and aging of the immune system. *Stress*. v.8, n.1, p.69-83, 2005.

13. BERCZI, I. The Stress Concept and Neuroimmnoregulation in Modern Biology. *Annals of the New York Academy of Sciences*. v.851, p.3-12, 1998.
14. BERCZI, I., NAGY, E. Effects of hypophysectomy on immune function. In: ADER, R., FELTER, D.L., COHEN, N. (ed) *Psychoneuroimmunology*. 2ed., Academic Press: San Diego, 1991. p. 339-375.
15. BERNTON, E.W., BRYANT, H.U., HOLADAY, J.W. Prolactin and immune function. In: ADER, R., FELTEN, D.L., COHEN, N. (ed) *Psychoneuroimmunology*. 2ed., Academic Press: San Diego, 1991. p. 403-428.
16. BERTÓK, L. Stress and Nonspecific Resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences*. v.851, p.1-2, 1998.
17. BESCHOP, R.J., CAMBIER, J.C. B cell development: signal transduction by antigen receptors and their surrogates. *Current Opinion in Immunology*. v.11, p.143-151, 1999.
18. BUCKLEY, A.R., BUCKLEY, D.J. Prolactin Regulation of Apoptosis-Associated Gene Expression in T Cells. *Annals of the New York Academy of Sciences*. v.851, p.523-532, 1998.
19. CANNON, W.B. et al. Emotional stimulation of adrenal secretion. *American Journal of Physiology*. v.28, p.64-70, 1911.
20. CANNON, W.B. et al. The emergency function of the adrenal medulla in pain and in the major emotions. *American Journal of Physiology*. v.33, p.356-372, 1914.
21. CANNON, W.B. The wisdom of the body. Nova Iorque: Norton, 1939
22. CAVALLOTTI, D. et al. Occurrence of adrenergic nerve fibers in human thymus during immune response. *Immunological Letters*. v.70, p.53-62, 1999
23. CHROUSUS, G.P. The stress response and the immune function: clinical implications. *Annals of the New York Academy of Sciences*. v.917, p.38-67, 2000.
24. CONTI, A. Oncology in neuroimmunomodulation. What progress has been made? *Annals of the New York Academy of Sciences*. v. 917, p.68-83, 2000.
25. DARDENNE, M., SAVINO, W. Interdependence of the endocrine and immune systems. *Advances in Neuroimmunology*. v.6, p.297-307, 1996.
26. DAVIS, S.L. Environmental modulation of the immune system via the endocrine system. *Domestic Animal Endocrinology*. v.15, n.5, p.283-289, 1998.

27. DHABHAR, F.S. et al. Diurnal and acute stress-induced changes in distribution of peripheral blood leukocyte subpopulations. *Brain, Behavior and Immunity*. v.8, p.66-79, 1994.
28. DHABHAR, F.S. et al. Effects of stress on immune cell distribution: dynamics and hormonal mechanisms. *Journal of Immunology*. v.154, p.5511-5527, 1995.
29. DHABHAR, F.S., McEWEN, B.S. Stress-induced enhancement of antigen-specific cell-mediated immunity. *Journal of Immunology*. v.156, n.7, p.2608-2615, 1996.
30. DHABHAR, F.S., McEWEN, B.S. Acute stress enhances while chronic stress suppresses cell-mediated immunity in vivo: a potential role for leukocyte trafficking. *Brain, Behavior and Immunity*. v.11, p.286-306, 1997.
31. DHABHAR, F.S., McEWEN, B.S., SPENCER, R.L. Adaptation to prolonged or repeated stress – comparison between rat strains showing intrinsic differences in reactivity to acute stress. *Neuroendocrinology*. v.65, p.360-368, 1997.
32. DHABHAR, F.S. Acute Stress Enhances While Chronic Stress Suppresses Skin Immunity. *Annals of the New York Academy of Sciences*. v.840, p.877-893, 2000.
33. DHABHAR, F.S. Stress-induced Enhancement of Cell-mediated Immunity. *Annals of the New York Academy of Sciences*. v.840, p.359-372, 1998.
34. DOMINGUEZ-GERPE, L., REY-MÉNDEZ, M. Alterations induced by chronic stress in lymphocyte subsets of blood and primary and secondary immune organs of mice. *BMC Immunology*. p.2-7, 2001.
35. DORSHKIND, K., HORSEMAN, N.D. Anterior pituitary hormones, stress, and immune system homeostasis. *BioEssays*. v.23, p.288-294, 2001.
36. DUNN, A.J. Cytokine Activation of the HPA Axis. *Annals of the New York Academy of Sciences*. v.851, p.609- 617, 1998.
37. ELENKOV, I.J., CHROUSOS, G. Stress hormones, proinflammatory and antiinflammatory cytokines, and autoimmunity. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.966, p.290-303, 2002.
38. FOSTER, M. P., MONTECINO-RODRIGUEZ, D.K., DORSHKIND, K. Proliferation of bone marrow pro-B cells is dependent on stimulation by the pituitary/thyroid axis. *Journal of Immunology*. v.163, n.11, p.5883-5890, 1999.
39. FRIERI, M. Neuroimmunology and inflammation: implications for therapy of allergic and autoimmune diseases. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*. v.90, suppl. 3, p.34-40, 2003.

40. GAILLARD, R.C. The Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis of Athymic Swiss Nude Mice. *Annals of the New York Academy of Sciences*. v.840, p.480-490, 1998.
41. GODFREY, D.I. et al. A developmental pathway involving four phenotypically and functionally distinct subsets of CD3⁺CD4⁻CD8⁻ triple-negative adult mouse thymocytes defined by CD44 and CD24 expression. *Journal of Immunology*, v.150, p.4244-4252, 1993.
42. HEIJNEN, C.J., KAVELAARS, A., BALLIEUX, R.E. Corticotropin-releasing hormone and propiomelanocortin-derived peptides in the modulation of immune function. In: ADER, R., FELTEN, D.L., COHEN, N. (ed) *Psychoneuroimmunology*. 2ed., Academic Press: San Diego, 1991. p. 429-446.
43. HENINGER, G.R. Neurobiological and Clinical Consequences of stress: From Normal Adaptation to PTSD. 1995: p. 381-401.
44. JANEWAY, C.A. et al. *Imunobiologia. O sistema immune na saúde e na doença*. 5ed. Artmed, Porto Alegre, 2002.
45. KELLEY, K.W. Growth hormone in immunobiology. In: ADER, R., FELTEN, D.L., COHEN, N. (ed) *Psychoneuroimmunology*. 2ed., Academy Press: San Diego, 1991. p. 377-402.
46. KEMENY, M.E. et al. Psychoneuroimmunology. In: *Neuroendocrinology*. NEMEROFF, C.B. (ed). CRC Press: Boca raton, 1992. p. 563-591.
47. KENDALL, M.D. et al. Innervation of the rat thymus gland. *Brain Behavior Immunology*. v.5, p.9-28, 1991.
48. KILEEN, B.A. et al. Signaling checkpoints during the development of T lymphocytes. *Current Opinion in Immunology*. v.10, p.360-367, 1998.
49. KRUGER, T.E. Immunomodulation of peripheral lymphocytes by hormones of the hypothalamus-pituitary-thyroid axis. *Advances in Neuroimmunology*. v.6, p.387-395, 1996.
50. KRUSZEWSKA, B., FELTEN, S.Y., MOYNIHAN, J.K. Alterations in cytokine and antibody production following chemical sympathectomy in two strains of mice. *Journal of Immunology*. v.155, n.10, p.4613-4620, 1995.
51. LAZARUS, R.S.; FOLKMAN, S. Stress, appraisal, and coping. New York: Springer; 1984
52. LAZARUS, R.S.; LAZARUS, B.N. Passion and Reason. New York: Oxford U. Press. 1994

53. LENT, R. Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociências. Ed. Atualizada e revisada. São Paulo. Atheneu, 2004, cap. 15, 483-518.
54. MADDEN, K.S., THYAGARAJAN, FELTEN, D.L. Alterations in sympathetic noradrenergic innervation in lymphoid organs with age. *Annals New York Academy of Sciences*, v.840, p.262-268, 1998.
55. MAIER, S.F., WATKINS, L.R., FLESHNER, M. Psychoneuroimmunology: the interface between behavior brain and immunity. *American Psychologist*. v.49, p.1004-1017, 1994.
56. MAIER, S.F., WATKINS, L.R. Cytokines for psychologists: implications of bidirectional immune-to-brain communication for understanding behavior, mood and cognition. *Psychological Review*. v.105, p.83-107, 1998.
57. MAIER, S.F. et al. The role of the vagus nerve in cytokine-to-brain communication. *Annals New York Academy of Sciences*, v.840, p.289-300, 1998.
58. MC EWEN, B.S. Stress, adaptation, and disease. Allostasis and allostatic load. *Annals of the New York Academy of Sciences*. v.840, p.33-34, 1998.
59. MC EWEN, B.S. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Research*. v.886, p.172-189, 2000.
60. MC CRUDEN, A.B., STIMSON, W.H. Androgen and other sex steroid cytosol receptors in the rat thymus. *Journal of Endocrinology*. v.85, p.47-48, 1980.
61. MC CRUDEN, A.B., STIMSON, W.H. Androgen binding cytosol receptors in the rat thymus: Physicochemical properties, specificity and localization. *Thymus*. v.3, p.105-117, 1981.
62. MICHELSON, D., LICINIO, J., GOLD, P.W. Mediation of the stress response by the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. In: FRIEDMAN, M.J., CHARNEY, D.S. DEUTCH, A.Y. Neurobiological and Clinical Consequences of Stress: from normal adaptation to post-traumatic stress disorder. Lippincott-Raven: Philadelphia, 1995. p. 225-238
63. MUNCK, A., GUYRE, P.M. Glucocorticoids and immune function. In: ADER, R., FELTEN, D.L., COHEN, N. (ed) *Psychoneuroimmunology*. 2ed., Academic Press: San Diego, 1991. p. 447-474.
64. MUNCK, A., NÁRAY-FEJES-TÓTH, A. Glucocorticoids and stress: permissive and suppressive actions. *Annals of the New York Academy of Sciences*. v.743, p.115-130, 1994.
65. MURPHY, W.J., LONGO, D.L. Growth Hormone as an Immunomodulating Therapeutic Agent. *Immunology Today*, v.21, n.5, p.211-213, 2000.

66. OYA, H. The Differential Effect of Stress on Natural Killer (NKT) and NK Cell Function. *Clinical and Experimental Immunology*, v.121, n.2, p.384-390, 2000.
67. PADGETT, D.A., MARUCHA, P.T., SHERIDAN J.F. Restraint Stress Slows Cutaneous Wound Healing in Mice. *Brain, Behaviour and Immunity*. v.12, p.64-73, 1998.
68. PADGETT, D.A., GLASER, R. How stress influences the immune response. *Trends in Immunology*. v.24, n.8, p.444-448, 2003.
69. PLAUT, M. Lymphocyte hormone receptors. *Annual Review of Immunology*. v.5, p.621-669, 1987.
70. PRUET, S.B. Qualitative Analysis of the neuroendocrine-Immune Axis Modeling of the Effects of Exogenous Corticosterone and Restraint Stress on Lymphocyte Subpopulations in the Spleen and Thymus in Female B6C3F1 mice. *Brain, Behaviour and Immunity*. v.14, p.270-287, 2000.
71. REICHLIN, S. Alternative Pathways of Neural Control of the Immune Process. *Annals of the New York Academy of Sciences*. v.840, p.301-316, 1998.
72. RICHARDS, S.M., MURPHY, W.J. Use of Human Prolactin as a Therapeutic Protein to Potentiate Immunohematopoietic Function. *Journal of Neuroimmunology*. v.109, p.56-62, 2000.
73. ROTHENBERG, E.V., TAGHON, T. Molecular genetics of T cell development. *Annual Reviews Immunology*. v.23, p.601-649, 2005.
74. SACEDON, R. Role of Glucocorticoids in Early T-Cell Differentiation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.840, p.733-740, 1998.
75. SAPOLSKY, R.M. The physiological relevance of glucocorticoid endangerment of the hippocampus. *Annals of the New York Academy of Sciences*. v.746, p.294-304, 1994.
76. SAPOLSKY, R.M. et al. How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory and preparative actions. *Endocrinology Reviews*. v.21, p.55-89, 2000.
77. SAVINO, W. et al. Neuroendocrine Control of the Thymus. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.840, p.470-479, 1998.
78. SHANKS, N., MEANEY, J., TANNENBAUM, B. Early environmental programming hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Seminars in The Neurosciences*, v.6, p.247-259, 1994.
79. SEI, Y., et al. Stress modulates calcium mobilization in immune cells. *Life Sciences*. v.49, p.671-676, 1991.

80. SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. *Nature*. v.32, p.138, 1936.
81. SELYE, H. *Stress. The physiology and pathology of exposure to stress*. Acta Inc, Medical Publishers, 1956.
82. SILVA, G.G. Dissertação: Modelo experimental para estudo das interações entre os sistemas neuroendócrino e imunológico na fase aguda da infecção murina por *Trypanosoma cruzi*. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2001.
83. STERNBERG, E.M., GOLD, P.W. The mind-body interaction in disease. *Scientific American*. Nov., special issue, p.8-15, 1998.
84. STERNEBERG, E.M. Neuroendocrine regulation of autoimmune/inflammatory disease. *Journal of Endocrinology*. v.169, p.429-435, 2001.
85. SZABO, S. Hans Selye and the Development of the Stress Concept. *Annals of the New York Academy of Sciences*. v.851, p.19-27, 1998.
86. TARCIC, N. et al. Restraint stress-induced thymic involution and cell apoptosis are dependent on endogenous glucocorticoids. *Journal of Neuroimmunology*. v.82, p. 40-46, 1998.
87. WATKINS, A. Mind-body Pathways. A Clinician`s Guide to Psychoneuroimmunology. First ed. 1997: Pearson Professional. 1-25.
88. WEBSTER, J.I., TONELLI, L., STERNBERG, E.M. Neuroendocrine regulation of immunity. *Annual Reviews Immunology*. v.20, p.125-163, 2002.