

EDNA CONSTANZA GÓMEZ VICTORIA

**RESPOSTA PSICONEUROIMUNOLÓGICA AO ESTRESSE CRÔNICO
MODERADO EM FÊMEAS DE RATOS (*Rattus norvegicus*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2013**

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV

T

G633r
2013

Gómez Victoria, Edna Constanza, 1987-

Resposta psiconeuroimunológica ao estresse crônico moderado em fêmeas de ratos (*Rattus norvegicus*) / Edna Constanza Gómez Victoria. – Viçosa, MG, 2013.
xv, 65f. : il. (algumas color.) ; 29 cm.

Orientador: Marlene Isabel Vargas Vilorio.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.
Referências bibliográficas: f.60-65.

1. Rato como animal de laboratório. 2. Histologia.
3. Sistema nervoso central. 4. Sistema imunológico. 5. Sistema endócrino. 6. Imunohistoquímica. 7. Stress (Fisiologia).
8. Córtex cerebral. 9. Hormônios. I. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Veterinária. Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. II. Título.

CDD 22 ed. 636.9352

EDNA CONSTANZA GÓMEZ VICTORIA

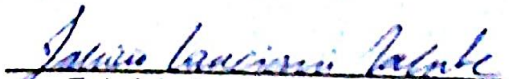
**RESPOSTA PSICONEUROIMUNOLÓGICA AO ESTRESSE CRÔNICO
MODERADO EM FÊMEAS DE RATOS (*Rattus norvegicus*)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.


APROVADA: 05 de julho de 2013.



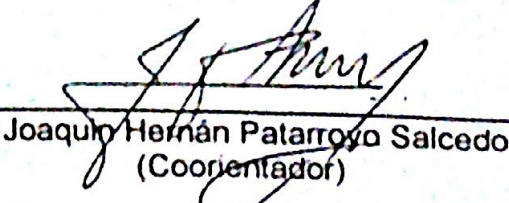
Anna Paula Baptista Ribeiro Ferreira



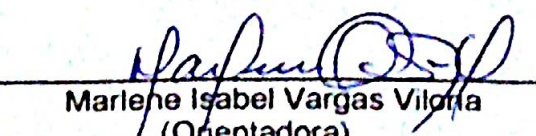
Fabrício Luciani Valente



Ita de Oliveira e Silva



Joaquín Hernán Patarroyo Salcedo
(Coorientador)



Marlene Isabel Vargas Viloria
(Orientadora)

A Deus, por minha vida.
Meus maravilhosos pais, pelo amor e ajuda incondicional.
Meus irmãos e familiares, pelo apoio.
Ao Jaime Alejandro, por ser meu companheiro e motivação para concluir este
trabalho.

“O futuro pertence àqueles que acreditam na beleza de seus sonhos”

Eleanor Roosevelt

AGRADECIMENTOS

Chegar à conclusão deste trabalho não foi fácil, iniciando que sou estrangeira, num país totalmente diferente às costumes e cultura do meu, onde lutar cada dia por entender, aprender e sobreviver ajudou em mim a crescer e maturar como pessoa, uma oportunidade maravilhosa que só consegui ter graças a Deus principalmente, pois graças a ele tenho esta vida, as oportunidades, a saúde, inteligência e sobre todo pelo privilegio de ter tão espetacular família.

Um trabalho que só pude terminar graças ao amor incondicional de meus pais, Jesus e Astrid, que com seus conselhos, apoio, carinho e sabedoria me levam a ser melhor pessoa cada dia, me ensinam a viver em este mundo e a lograr meus objetivos dia a dia, GRACIAS PAPITOS por crer em mim e me dar a melhor herança que é o estudo, é para vocês meu mais profundo amor.

Aos meus irmãos, Cristian e Dorian, pelo apoio, carinho, confiança e ajuda em cada momento difícil, suas palavras e atitudes me ajudam a ser melhor pessoa.

A minha família, meus avós, especialmente Manuel e Carlina; meus tios especialmente minha tia Vellanit e todos meus primos, que com seu carinho sempre estão me apoiando, aconselhando e dando forças para continuar adiante.

O Jaime Alejandro, meu namorado e amigo incondicional, que com seu amor e apoio me ajuda e motiva cada vez mais a sonhar num futuro melhor.

Aos meus orientadores a Profa. Marlene e o Prof. Joaquin Patarroyo, pela oportunidade que me deram de fazer parte de suas pesquisas, a orientação acadêmica, os conselhos e as lições que me ajudaram a maturar como pessoa profissional.

A Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de fazer o mestrado, além do estagio e me acolher netos três anos de crescimento profissional.

Aos professores e amigos Omar e Ximena, porque graças a suas experiências, sabedoria, conselhos e amizade, foi dada esta oportunidade, e a estadia e o estudo foi mais agradável.

Ao Prof. Dantas, pela sua ajuda incondicional, conselhos e amizade que me ajudaram a motivar e fazer melhor meu trabalho.

À Profa. Ita Silva, pela sua ajuda no meu trabalho quando mais precise.

As pessoas que ajudaram a ser possível este trabalho: o João Paulo, pela sua ajuda, conselhos e sabedoria me ajudaram a seguir e lutar neste trabalho e este duro caminho, a Thalita, sem sua ajuda não poderia ter feito uma boa imunomarcção e a Astrid, pela ajuda com a estatística.

A Blanca Mercedes, pelos conselhos, cuidados, convivência e amizade.

A meus amigos Blanca Lizeth, Paul, Catalina, Adriana, Natalia, Juliana, Jessica, Erly, Lina, Leito, Eliana, Jota, Felipe, Elisa, Luciana, Mariana, Clarissa e muitos mais que quero muito e me ajudaram nestes três anos, com seu apoio e conselhos nas coisas malas e boas, com sorrisos, festas e tristezas acompanharam esta grade travessia.

A Moema, por ser como minha vovó brasileira, com seus conselhos, cuidados e magicas.

Aos funcionários do Departamento de Veterinária: Rose, tão especial como sempre, Adão, pela ajuda no laboratório e todos meus colegas com quem convivi durante todos estes anos e aqueles que se fizeram amigos.

A Blair, minha gata, que me acompanha incondicionalmente em todo e embora não fale, com suas ações sempre me reconforta e escuta sempre, e me lembra diariamente o maravilhoso de ser Medica Veterinária.

Obrigada a todos por todo e a cada pequeno momento da vida em que se cruzam nossos caminhos e aprendemos mais de cada um, porque assim nascem as ideias e crescem oportunidades, que o Senhor os abençoe sempre.

BIOGRAFIA

EDNA CONSTANZA GÓMEZ VICTORIA, filha de JESUS GÓMEZ MANCHOLA e MARIA ASTRID VICTORIA AMAYA, nasceu em Neiva, Huila, Colômbia, no dia 4 de fevereiro de 1987.

Em fevereiro de 2005, iniciou o curso de Medicina Veterinária e Zootecnia na Universidade do Tolima, Colômbia, graduando-se em setembro de 2010.

No ano de 2011, ingressou no mestrado do Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária na Universidade Federal de Viçosa, defendendo sua dissertação no dia 5 de julho de 2013.

SUMÁRIO

Pág.

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
LISTA DE GRÁFICOS	xi
RESUMO	xii
ABSTRACT.....	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVO.....	4
3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA	5
3.1 Psiconeuroimunologia	5
3.2 O Sistema Nervoso Central	7
3.3 Hipocampo	8
3.4 Córtex Pré-Frontal	10
3.5 Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA)	12
3.6 Estresse.....	13
3.6.1 Via e mecanismos de ação do estresse	15
3.6.2 Efeito do estresse crônico sobre o cérebro	18
3.6.3 Hipocampo e o Estresse	20
3.7 O papel dos neuroesteroides durante o estresse	23
3.8 Dobramento proteico, chaperonas e co-chaperonas	24
3.8.1 Resposta celular ao estresse: HSP	27
3.8.2 Proteínas de Choque Térmico (HSP27 e HSP90).....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Delineamento experimental	31
4.2 Animais	32
4.3 Estressores.....	33
4.4 Tratamentos <i>in Vivo</i>	36
4.5 Eutanásia.....	36
4.6 Amostras cerebrais.....	36

4.7	Análise dos dados	37
4.8	Histopatologia	37
4.9	Imunoistoquímica para expressão de HSP	38
5	RESULTADOS	41
5.1	Análise histológica do Hipocampo	41
5.2	Análise morfométrica do hipocampo	44
5.3	Análise histológica do córtex pré-frontal medial.....	45
5.4	Análise Imunoistoquímica	48
5.4.1	Imunomarcção HSP 27	48
5.4.2	Imunomarcção HSP 90	50
5.5	Análise de dados qualitativos	51
6	Discussão	52
7	CONCLUSÃO.....	58
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1 - Regulação psiconeuroendocrinoimunologica ante o estresse crônico.....	14
Figura 2 - Efeitos do estresse e glicocorticoides sobre os principais tipos de células do hipocampo.....	21
Figura 3 - Função das HSP 90, 27 e 70 dentro da célula.....	28
Figura 4 - Mensuração da marcação total no Córtex Pré-frontal no programa Image-Pro Plus.....	40
Figura 5 - Diferenciação citoarquitetônicas dos hipocampos em cada grupo. Observe-se a diminuição da viabilidade neuronal dos estratos piramidal e granular nos grupos estressados, especialmente no (E) e (E+G). Objetiva de 4X, Coloração Cresil Violeta.	41
Figura 6 - Grupo C: Características celulares das regiões do hipocampo na rata controle.....	42
Figura 7 - Grupo V. Características celulares das regiões do hipocampo na rata estressada mais aplicação do glicocorticoide.....	43
Figura 8 - Característica celular do Córtex pré-frontal (40X) do grupo Controle	46
Figura 9 - Diferenciação da dispersão e morfologia neuronal no Córtex Pré-frontal medial nos grupos.....	47
Figura 10 - Característica celular do Córtex pré-frontal medial do grupo E+G.....	48
Figura 11 - Imunomarcção em córtex pré-frontal medial do grupo E+G.....	50
Figura 12 - Queda de pelo em animais do grupo E+G.	52

LISTA DE TABELAS

	Pág.
Tabela 1. Constituição dos grupos estudados	32
Tabela 2. Distribuição dos grupos submetidos ao protocolo de estresse	35
Tabela 3. Caracterização dos escores selecionados para a classificação da marcação das lamínas de IHQ.....	40
Tabela 4. Análise de ANOVA entre as medidas das regiões de cada grupo	44
Tabela 5. Resultados da classificação da marcação e intensidade do HSP 27 no Hipocampo e Córtex pré-frontal medial dos grupos.....	49
Tabela 6. Resultados da classificação da marcação e intensidade do HSP 90 no Hipocampo e do Córtex pré-frontal medial dos grupos.....	51

LISTA DE GRÁFICOS

Pág.

Gráfico 1 - Variações das porcentagens das regiões CA1, CA2, CA3, CA4 e GD de cada grupo. Observe-se a região GD do grupo E+G que apresentou diferencia significativa maior.	45
---	----

RESUMO

VICTORIA, Edna Constanza Gómez, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, julho de 2013. **Resposta psiconeuroimunológica ao estresse crônico moderado em fêmeas de ratos (*Rattus Norvegicus*)**. Orientadora: Marlene Isabel Vargas Viloria. Co-orientador: Joaquín Hernan Patarroyo Salcedo.

O conceito de estresse que evolucionou desde sua origem como *resposta inespecífica*, hoje se considera um *fenômeno psicobiológico complexo* de alarme e adaptação que permite ao organismo fazer frente a situações de perigo. A vida adulta é mais vulnerável a situações de estresse porque sua resposta a este, vai diminuindo com a idade. O estresse produz a ativação de vários sistemas fisiológicos, incluindo o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), o sistema nervoso autônomo e o sistema imune; ativando a resposta psiconeuroendocrinoimunológica que permite aprofundar na interação entre os três supersistemas e assim compreender melhor as bases biológicas deste processo. Atualmente esta bem estabelecida que existam diferenças de gênero na prevalência do estresse, sendo as mulheres as mais resistentes que os homens, sugerindo que os estrógenos desempenham um papel importante na etiologia do estresse assim como seu possível tratamento. Para se avaliar o efeito do estresse sobre a vida adulta, foi aplicado um modelo de estresse crônico moderado em fêmeas de *Rattus norvegicus*. Vinte e cinco animais foram divididos em cinco grupos. Sendo o controle (C), estresse (E), estresse associado a um desafio imunológico (E+D), estresse com uso de GH (E+S) e estresse com glicocorticoide (E+G). O experimento teve uma duração de 28 dias, com aplicação de estressores variados em dias alternados, os estressores utilizados foram: o calor, o frio, o isolamento, a contenção por 20 minutos, privação de água e comida, inclinação da gaiola 45° e iluminação noturna. Ao final do experimento, os animais foram eutanasiados e foi coletado material para análise. Os animais estressados apresentaram diminuição de peso corporal e sinais clínicos de doença (conjuntivite, pneumonia e alopecia) como consequência do aumento de glicocorticoides. Foram analisadas histológica e morfometricamente as áreas do hipocampo e do córtex pré-frontal medial (CPFm) apresentando alterações

coincidentes entre estas áreas dependendo dos tratamentos *in vivo* aplicados; especialmente se apresento danos morfológicos nas áreas CA1, CA3, CA4 e GD do hipocampo e nas camadas II e III do CPFm, concluindo que foram as mais afetadas pelo estresse crônico. Nos tratamentos aplicados a GH e a saponina sugerem um efeito neuroprotetor pela melhora na citoarquitetura e morfologia das camadas celulares no hipocampo e CPFm. A análise estatística foi feita sobre medidas do comprimento de cada região do hipocampo (CA1, CA2, CA3, CA4 e GD), sendo observada uma diferença significativa maior na região GD do grupo E+G. Finalmente se avalio a expressão imunistoquímica das proteínas de choque térmico, HSP 27 e HSP 90 no hipocampo e o CPFm, apresentando uma expressão basal baixa, especialmente das HSP27 no CPFm e foi induzível pelo estresse crônico independente do tratamento no hipocampo; a HSP90 teve uma expressão rara e foi dependente do tratamento aplicado, só expressando-se nos grupos E+D e E+G no hipocampo e CPFm, deduzindo que por ser uma proteína constitutiva com a idade diminui sua produção.

ABSTRACT

VICTORIA, Edna Constanza Gómez, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, July 2013. **Psiconeuroimunológica response to chronic mild stress in female rats (*Rattus Norvegicus*)**. Advisor: Marlene Isabel Vargas Vilorio. Co-advisor: Joaquín Hernan Patarroyo Salcedo.

The concept of stress evolved from their origin as a nonspecific response, today is considered a phenomenon psychobiological complex of warning and adaptation enabling the body to confront danger. Adulthood is more vulnerable to stress because their response to this, going decrescendo at the age. Stress produces the activation of multiple physiological systems, including the hypothalamus-pituitary-adrenal (HPA) axis, the autonomic nervous system and the immune system, activating the response psychoneuroendocrineimmunological that allows deepen the interaction between the three supersystems and thus better understand the biological basis this process. Currently this well established that there are gender differences in the prevalence of stress, and women are more resistant than men, suggesting that estrogens play an important role in the etiology of stress as well as its possible treatment. To evaluate the effect of chronic mild stress on adulthood, we applied a model of chronic mild stress in female *Rattus norvegicus*. Twenty-five animals were divided into five groups. Being the control (C), stress (E), stress associated with an immune challenge (E+D), stress the use of GH (E+S) and glucocorticoid stress (E+G). The experiment lasted 28 days, with the application of various stressors on alternate days, the stressors were used: heat, cold, isolation, containment for 20 minutes, water and food deprivation, cage tilt 45 ° and night lighting. At the end of the experiment, the animals were euthanized and samples for analysis. The stressed animals showed a decrease in body weight and clinical signs of disease (conjunctivitis, pneumonia, and alopecia) the effect of increasing glucocorticoids. Were histologically and morphometrically areas of the hippocampus and medial prefrontal cortex (mPFC) showing changes coincident between these areas depending on the treatments applied in vivo, especially if present morphological damage in areas CA1, CA3, CA4 and DG of the hippocampus and the layers II and

III of the mPFC, concluding that were most affected by chronic stress. The treatments applied to GH and saponin suggest an improvement in the neuroprotective effect cytoarchitecture and morphology of cell layers in the hippocampus and mPFC . Statistical analysis was done on measuring the length of each region of the hippocampus (CA1, CA2, CA3, CA4 and DG), with a significant difference in the higher region of the GD group E+G. Finally evaluate the immunohistochemical expression of heat shock proteins, HSP 27 and HSP 90 in the hippocampus and mPFC, with a low basal expression, especially in the mPFC and HSP27 was inducible by chronic stress regardless of the treatment in the hippocampus, the HSP90 expression had a rare and was dependent on the treatment applied, only expressing themselves in groups E+D and E+G in the hippocampus and mPFC, deducing that to be a constitutive protein with age decreases its production.

1 INTRODUÇÃO

“Mente saudável no corpo saudável”: a célebre frase de Hipócrates (400 anos A.C) já descrevia a associação entre as situações de estresse físico e psicológico. Adicionalmente a pesquisa nos últimos 20 anos tem demonstrado que a interação entre o sistema nervoso central (SNC) e o organismo é muito mais dinâmica e complexa do que pensado, porque há moléculas, a partir do sistema imune (SI) que alteram as funções psicológicas e neurológicas tanto ao nível central como periférico, sugerindo que essa comunicação é bidirecional (HEIJNEN, 2000). A estabilidade da vida esta constantemente ameaçada por uma grande variedade de estressores internos e externos, e, nestas circunstâncias, mecanismos ativos para a manutenção celular são necessários para proteger a integridade do organismo (MERAZ e BAÑUELOS, 2009).

Um paradigma central da investigação do estresse é que os “super sistemas” nervoso, endócrino e imunológico se envolvem em múltiplas interações durante a resposta do corpo ao estresse agudo ou crônico. Cada sistema é também vulnerável e responde a definidos estressores. Em resposta ao estresse, neuro-hormônios, neurotransmissores, neuropeptídios e neurotrofinas estimulam uma serie de respostas de adaptação. Estes tipicamente incluem alterações comportamentais, cardiovasculares, metabólicas, endócrinas e imunológicas que variam de imunossupressão à inflamação. Estes divergentes e, às vezes, aparentemente efeitos contraditórios, refletem o papel duplo e multifuncional do sistema imunológico tanto como um órgão sensorial e efector em resposta ao estresse (Paus et al., 2006).

A limitação da resposta ao estresse é claramente uma prioridade, todos os vertebrados tem uma resposta de retroalimentação negativa que ao ser interrompido pode ser acumulativa, causando que os glicocorticoides que são os principais hormônios durante o estresse produzam efeitos degenerativos no corpo e no cérebro (MERAZ e BAÑUELOS, 2009).

O hipocampo é o primeiro alvo para os glicocorticoides e tem efeitos na plasticidade e dano de neurônios hipocampais especialmente nas regiões CA3 e GD. Os glicocorticoides podem chegar a modular a plasticidade sináptica neuronal em 30 minutos. Os hormônios adrenais junto com os receptores NMDA e o aumento

de glutamato modulam as mudanças na formação sináptica e na estrutura dendrítica assim como também regulam o volume do giro denteado (GD) durante o desenvolvimento da vida adulta. O córtex pré-frontal medial é também um alvo para estes hormônios de estresse, alterando a morfologia da camada II e III, apresentando danos similares ao hipocampo pela sua conexão na “via tri-sináptica” (WELLMAN, 2001).

Atualmente esta bem estabelecida que existam diferenças de gênero na prevalência do estresse, sendo as mulheres as mais resistentes que os homens; se sabe atualmente que os estrógenos atuam como reguladores positivos na geração de novos neurônios no hipocampo do cérebro adulto. A implicância do estradiol no controle da reatividade do eixo HPA ao estresse parece complexa, assim como a influência recíproca do eixo HPA sobre o eixo gonadal. (VEGA et al., 2012). Os estrógenos e a idade também modulam a produção de hormônio de crescimento (GH), os quais se produzem endogenamente no hipocampo ajudando à aprendizagem mediante a neogênese (DONAHUE et al., 2005).

A resposta celular mediante situações de estresse é uma resposta adaptativa e constitui uma parte fundamental do processo evolutivo. Sendo assim, um grande número de genes encontra-se especificamente envolvidos com o potencial de detoxificação celular quando na presença de agentes nocivos. As células apresentam variações fisiológicas e morfológicas após o estresse: muitas vias bioquímicas ficam comprometidas ou redirecionadas com consequente queda no pH intracelular, decréscimo nos níveis de ATP, aumento nos níveis de cálcio citosólico, alterações na função mitocondrial e em particular no mecanismo aeróbico, levando a uma maior dependência energética das células através do metabolismo glicolítico (BORIN e NATALI, 2006). De forma geral como resposta celular ao estresse se encontram as proteínas “heat shock proteins” (HSP) que são abundantes em todos os seres vivos, desde os microrganismos e plantas até o homem. Algumas delas se encontram também nas células normais cultivadas, mas o notável é que suas concentrações aumentam enormemente em situações de estresse, protegendo à célula do dano produzido pelo estresse, mediante a união a proteínas parcialmente desnaturalizadas, dissociando agregados de proteínas e regulando o dobramento correto e translocação intracelular de novas proteínas sintetizadas. O entendimento do funcionamento destes tipos de proteínas pode

ampliar o conhecimento de múltiplas doenças no homem e possivelmente ter certo papel como alvos terapêuticos (LATCHMAN, 2005).

O presente estudo foi desenhado para pesquisar sobre os efeitos protetores e prejudiciais de esteroides adrenais e estrógenos no cérebro, particularmente no hipocampo e o CPFm. Aqui também discutiremos o tema da neuroproteção e do valor potencial de estrógenos, GH e saponina como promotores da alostase e aumento da resiliência ao dano neuronal como a presença de HSP 90 e 27 como proteínas de estresse, avaliando a sua expressão num modelo de estresse crônico moderado.

2 OBJETIVO

O principal objetivo deste trabalho é avaliar a resposta psiconeuroimunológica no sistema nervoso central (hipocampo e córtex pré-frontal medial) de fêmeas (*Rattus norvegicus*) entre 10 e 11 meses de idade, submetidas a estresse moderado crônico, com aplicação de tratamentos *in vivo*. Para este objetivo principal, se derivam os seguintes objetivos específicos:

1. Verificar a expressão imunoistoquímica de proteínas de choque térmico (HSP27 e HSP90) em ratas adultas, durante o processo de estresse crônico e a influência do hormônio de crescimento, saponina e dexametasona em sua expressão.
2. Avaliar, mediante as colorações especiais na histopatologia do SNC (Cresil Violeta, Nitrato de Prata e HeE), as mudanças morfológicas e citoarquitetônicas do hipocampo e córtex pré-frontal medial, em fêmeas adultas e o efeito do hormônio de crescimento, saponina e dexametasona, no processo de estresse crônico.
3. Analisar a morfometria e mudanças no hipocampo e córtex pré-frontal medial, em ratas adultas durante o processo de estresse crônico e a influência dos tratamentos *in vivo* aplicados (hormônio de crescimento, saponina e dexametasona).

3 REVISÃO BIBLIOGRAFICA

3.1 Psiconeuroimunologia

A psiconeuroimunologia (PNI) é um campo científico interdisciplinar que se dedica ao estudo dos mecanismos de interação e comunicação entre o cérebro (mente/conducta) e os sistemas responsáveis pela manutenção homeostática do organismo: os sistemas nervoso (central e autônomo), imunológico e neuroendócrino, assim como suas implicações clínicas. Embora comumente conhecida pelo nome de psiconeuroimunologia que deu o psicólogo Robert Ader, também é conhecida como neuroimunoimodulação, neuroendocrinologia e imunologia condutal (SOLOMON, 2001).

Desde há 20 anos um grande número de evidencias experimentais e clinicas tem demonstrado a existência da uma comunicação constante e bidirecional entre o sistema neuroendócrino e a resposta imunológica. Esta comunicação se denomina “interações psiconeuroendocrinoimunológicas” (PNEI), mesmas que nos permitem manter a homeostase ante os estímulos estressantes, tanto de tipo sistêmicos: lesões tissulares, infeções mediadas por bactérias vírus e parasitas, como de tipo psicológico, secundários à percepção e processamento do estímulo por cada individuo. As interações PNEI são uma complexa rede de moléculas mediadas por citocinas, hormônios e neurotransmissores e pelos receptores de moléculas que em seu conjunto nos permitem manter a homeostase ante os estímulos estressantes, tanto físicos como psicológicos. O eixo hipotálamo-hipófise-adrenais (HHA) é a coluna vertebral de estas interações. Quando estas interações estão desreguladas, as implicações clinicas que se podem apresentar abarcam aspectos físicos e condutais, que se apreciam em patologias tão variadas como o estresse pós-traumático, a depressão, a esquizofrenia, a doença de Alzheimer e transtorno de alimentação como a anorexia. Estes quadros clínicos têm em comum um componente inflamatório mediado pelas citocinas (PAVÓN et al., 2004).

Segundo Raison e Miller (RAISON e MILLER, 2001) a rede de conexões que entrelaçam estes três sistemas apresentam uma alta complexidade, o que leva dificuldades metodológicas no estudo de suas interações apresentando nos achados experimentais uma baixa homogeneidade e sendo difícil sua replicação. As evidências proporcionadas pelos diversos trabalhos de investigação permitem concluir:

- a) Que as células do sistema imune (SI) expressam receptores para uma ampla variedade de moléculas reguladas em parte pelo SNC: receptores alfa e beta adrenérgicos, dopamina, serotonina, acetilcolina, histamina, GH, ACTH, prolactina, CRH, substância P, VIP, somatostatina, hormônio tireóideo, encefalinas e endorfinas, vasopressina, esteroides adrenais, estrógenos e progesterona, andrógenos, etc., cuja regulação vem condicionada por fatores de *timing* e de idade dos sujeitos estudados.
- b) Que a identificação de fibras do sistema nervoso central (SNC) nos tecidos linfáticos (timo, medula óssea, gânglios ou baço) mostra a comunicação direta entre o SNC e o SI e este papel parece corresponder de modo significativo ao sistema nervoso vegetativo.
- c) Que as lesões de regiões do SNC nos estudos com animais levados a cabo na década dos 60 evidenciam a regulação do SI pelo cérebro. Lembremos as lesões no hipotálamo anterior que se acompanhavam de uma diminuição da atividade de células assassinas (NK), as respostas a mitógenos e antígenos e números de células do baço e o timo.
- d) Que outra evidência de que existe uma conexão entre o SNC e o SI é que os processos de aprendizagem são capazes de influenciar o SI, condicionando-ló, seja potenciando-ló ou diminuindo-ló a partir das experiências da vida ou do condicionamento Pavloviano. Todo isto conhecendo as dificuldades que envolvem os fatores demográficos, a mensuração das condutas, o estilo de vida ou a doença que se estude, o método de seleção da amostra populacional e o próprio método de investigação básico (RAISON e MILLER, 2001).

3.2 O Sistema Nervoso Central

O nosso conceito de manutenção imunodependente do cérebro (RONHAREL et al., 2008) é suportado por uma grande quantidade de provas acumuladas na década passada, mostrando que as células periféricas do sistema imunológico, através de sua direta ou indireta interação com a micróglia residente e o infiltrando monócitos pelo sangue, contribuem para a renovação celular, melhorar a sobrevivência neuronal e facilitar a restauração da homeostase do SNC sob doenças neurodegenerativas (SCHWARTZ e ZIV, 2008).

A manutenção imune dependente da plasticidade cerebral em condições fisiológicas é mediada pela regulação positiva de substâncias benéficas, incluindo o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF) (ZIV et al., 2006) e o fator-1 de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) (BUTOVSKY et al., 2005), melhorando a capacidade sensitiva das células e a resposta aos vários desvios da homeostase (GARG et al., 2008).

Em condições neurodegenerativas, o sistema imunológico periférico pode tentar reverter ou limitar os efeitos adversos do meio inflamatório local (BUTOVSKY et al., 2006; SIMARD et al., 2006).

O envelhecimento normal cerebral também é caracterizado por elevação nos marcadores de ativação das micróglia, em associação alterações estruturais e alterações fenotípicas (CONDE e STREIT, 2006).

A maior parte dos danos depois de uma lesão aguda ao sistema nervoso central de mamíferos é causada pela progressiva degeneração secundária dos neurônios adjacentes ao local da lesão. A morte celular primária provoca um aumento na concentração de substâncias fisiológicas tóxicas, tais como o glutamato e os radicais livres e criam um ambiente hostil para os neurônios vizinhos, o mesmo ocorre para as doenças neurodegenerativas; em que fatores primários de risco incluem compostos autoendógenos que se acumulam extracelularmente a níveis não fisiológicos, as células que medeiam a atividade neuroprotetora imune são linfócitos T CD4+ específicos para os antígenos do SNC (KIPNIS et al., 2002).

Estudos mostraram que tais células T autoimunes, controlam localmente a micróglia residente e aumentam de forma temporal e espacial, controlando o

infiltrando de monócitos pelo sangue, ajudando-os a adquirir um fenótipo que os permite combater condições degenerativas (SHECHTER e al., 2008).

A micróglia ativada e macrófagos removem as células mortas e os resíduos celulares, compostos tóxicos tamponantes (tais como o glutamato e fatores de crescimento de espécies reativas de oxigênio), produzindo o necessário para a sobrevivência celular e a sua renovação, sem produzir inflamação associada a compostos tais como o TNF- α , óxido nítrico e ciclo-oxigenase 2 g (GARG et al., 2008).

3.3 Hipocampo

O hipocampo (do latim: *hippocampus*) é uma das principais estruturas do cérebro humano e dos mamíferos. O nome foi determinado pelo anatomista do século XVI Giulio Cesare Aranzio, que encontrou uma grande semelhança entre a forma do cavalo marinho o hipocampo. É uma estrutura marginal e de menor complexidade em comparação da substância cinzenta cortical ou do lóbo temporal. Por isto é composta, de uma parte de sistema límbico e a outra no arquicórtex, compondo junto ao subículo e o giro dentado a chamada formação hipocampal. Igualmente ao resto do córtex é uma estrutura emparelhada, com duas metades que são imagens iguais nos dois hemisférios. Tanto nos humanos como em outros primatas, o hipocampo se localiza no interior da parte media ou interna do lóbo temporal, sub a superfície cortical. A forma de cavalo marinho é típica de primatas, mas em outros mamíferos como os ratos tem formas variadas, como de banana e se encontra na parte superior do lóbo temporal (DUVERNOY, 2005).

O termo “hipocampo” é comumente utilizado para descrever conjuntamente duas regiões interligadas: o giro denteado (GD) e o hipocampo propriamente dito (“Corno de Ammon”; CA). Ambos possuem uma organização interna trilaminada, composta por dois tipos de células principais: as células granulares do giro denteado e as células piramidais do Corno de Ammon, sendo estas divididas nos setores de CA1, CA2, CA3 e CA4. Cada uma dessas regiões mantém um padrão organizado de conexões intrínsecas e extrínsecas, sendo que a principal aferência para o

hipocampo origina-se no córtex entorrinal. As fibras que deixam o córtex entorrinal (CE) em direção ao hipocampo constituem a chamada “via perfurante” e inervam os dendritos das células granulares na região da camada molecular do giro denteado (GD). Os axônios das células granulares (“fibras musgosas”) projetam-se para as células piramidais da região de CA3, que por sua vez emitem fibras para a região de CA1, constituindo a chamada “via colateral de Schaffer”. De CA1, as fibras projetam-se para o complexo subicular e então para as camadas profundas do córtex entorrinal. O circuito CE-GD-CA3-CA1 é tradicionalmente denominado “via trisináptica” e utiliza o glutamato como principal neurotransmissor (ARELLANO et al., 2004). Dentro do sistema límbico hipofisário-adrenal (LPHA) o hipocampo faz um papel central, já que é importante no funcionamento neuroendócrino e contém uma alta concentração de receptores para corticosteroides (MERAZ e BAÑUELOS, 2009).

Esta área tem dois tipos de receptores para esteroides adrenais: os de tipo I para mineralocorticoides (MR), que têm afinidade, mas baixa capacidade para o cortisol e estão influenciados pelas flutuações diurnas do sistema de glicocorticoides; e os receptores de tipo II para glicocorticoides (GR), que têm uma baixa afinidade, mas uma grande capacidade de união ao cortisol. Estes receptores medeiam a regulação do crescimento de ramos dendríticos nos neurônios piramidais do hipocampo (MERAZ e BAÑUELOS, 2009).

Os estudos com humanos são escassos, mas se tem investigado amplamente em roedores, como parte do sistema cerebral responsável pela memória espacial e a navegação. Muitos neurônios do hipocampo de rato respondem como “células do lugar” ou células de posição: isto é, que disparam potenciais de ação quando o animal atravessa por uma zona específica de seu entorno. As “células de lugar” do hipocampo interatuam amplamente com as “células de orientação” da cabeça, que atuam como modo de compasso inercial e também com as “células grid” ou de rede, nas proximidades do córtex entorrinal. A forma da plasticidade neuronal conhecida como potenciação em longo prazo (LTP) foi descoberta pela primeira vez no hipocampo e ainda é principalmente estudado nesta estrutura. Está muito relacionada à hipótese que a LTP é um dos mecanismos neurais principais pelos que a memória se armazena no cérebro (SQUIRE e SCHACTER, 2002).

3.4 Córtex Pré-Frontal

O córtex pré-frontal, é uma região do encéfalo, que se caracteriza por ter uma aparição recente filogeneticamente, é dizer, só se há achado de forma desenvolvida em animais mais complexos como os vertebrados e em especial os homínídeos, incluindo o ser humano. A ubiquação no cérebro de esta área abarca toda a parte anterior a partir da cissura central e tem sido dividida em distintas regiões que participam diferencialmente em processos cognoscitivos e emocionais. Segundo estudos neuroanatômicos o CPFm do rato é considerado como a área homóloga do CPF dorsolateral em primatas (FUNAHASHI, 2006).

Nos últimos anos, se iniciou a precisar a organização laminar ou das camadas do córtex pré-frontal humano. O resumo dos principais achados são os seguintes: a camada I é fina, com uma espessura de 11% total cortical. A camada II é também fina, facilmente identificável, com uma espessura relativa cerca do 9%, inclui células com formas piramidais e granulares pequenas. A camada III é mais extensa com um 31% de espessura relativa, as células mais superficiais são pequenas enquanto nos setores mais profundos da camada, o tamanho destas células são maiores. A camada IV é fina entre 6% e 9% de espessura cortical total e seus limites com as camadas II e V são facilmente discernível, contem predomínio de células granulares pequenas. A camada V possui uma espessura relativa de 17%, com predomínio de células piramidais grandes; esta camada apresenta duas subcamadas: Va e Vb e a densidade celular desta ultima subcamada é menor que a primeira. A camada VI tem 23% de espessura relativa e incluem células piramidais medias e fusiformes; suas bordas com a camada V são evidentes. As camadas II e III são supragranulares e as camadas V e VI são infragranulares (BURITICA e PIMIENTA, 2007). Em ratos a diferenciação entre as 6 camadas do CPF é complexa e só se distinguem só quatro camadas: a camada I, II/III, V e VI (FUNAHASHI, 2006).

No funcionamento do córtex pré-frontal, uma importante sub-região deste, se ha relacionado de jeito diferente com respeito às partes que a compõem. As regiões dorsolaterais se hão associado com as chamadas “funções executivas” que se referem às características que permitem dirigir nossa conduta até um final, isto é,

atenção, planificação, sequenciação e reorientação sobre os nossos atos; enquanto que as regiões orbito e ventromediais tem sido relacionadas com a avaliação emocional da informação e a toma de decisões com base no significado emocional dos objetos (GONZALEZ et al., 2006).

No rato o CPF se subdivide em três áreas principais: a lateral (áreas insular agranular dorsal (AID) e ventral (AIV)), orbital (localizada ventralmente ao corpo caloso) e media. A sua vez, o córtex pré-frontal medial (CPFm) se divide em três áreas (de dorsal a ventral): cingulada anterior (Cg1), pré-límbica (PL) e infralímbica (IL), embora não esteja claro a função de estas subdivisões no rato, estudos recentes inferem do padrão de projeções na zona PL e IL que a primeira participaria mais nas funções límbico-cognitivas (homologas ao CPF dorsolateral em primatas) e a segunda controlaria as atividades viscerais-autónomas (homologas ao CPF orbitomedial em primatas); enquanto à camadas celulares a II/III é a que pertence ao CPFm. As funções do CPF estão intimamente ligadas a sua conectividade com uma grande variedade de estruturas cerebrais e não podem compreender-se fora deste contexto (PUIG et al., 2005).

O córtex pré-frontal tem sido implicado em muitas doenças relacionadas ao estresse e esta envolvido nos principais processos cognitivos que são influenciados pelo estresse crônico, incluindo o condicionamento do medo e recuperação de extinção, junto com o deslocamento da atenção, aprendizagem espacial, reconhecimento e memória de trabalho. A exposição a fatores de estresse resultam numa variedade de alterações neuroquímicas no córtex pré-frontal. Por exemplo, o estresse agudo aumenta o glutamato, dopamina e liberação de acetilcolina no CPFm e prolonga a regulação serotoninérgica do GABAérgicos de iPSCs em neurónios piramidais pré-frontais através da ação da proteína quinasse C. Além disso, o previa exposição ao estresse crônico diminui os níveis basais de dopamina aumentados no CPFm (HOLMES e WELLMAN, 2009).

3.5 Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA)

O eixo HPA é necessário para a adaptação do organismo para as mudanças do ambiente tanto interno como externo; funciona como um laço neuroendócrino, inicia no núcleo paraventricular parvocelular medial (PVN), donde os neurônios sintetizam secretagogos de ACTH, hormônio liberador de Corticotropina (CRH) e da arginina vasopressina (AVP). Sem dúvida a CRH e a AVP têm efeitos sinérgicos sobre o aumento de ACTH na pituitária, pois quando aumenta é transportada pela circulação sistêmica até o córtex adrenal onde promove a síntese e secreção dos glicocorticoides (MERAZ e BAÑUELOS, 2009).

A comunicação entre os sistemas permite que o eixo HPA seja um sistema integral que pode ser alterado e adaptar suas respostas ao tipo e duração do estressor ao que um organismo é exposto (MERAZ e BAÑUELOS, 2009).

Os glicocorticoides têm um poderoso efeito catabólico no organismo, que controla a magnitude e duração da resposta ao estresse. Este controle é acompanhado de um mecanismo de feedback negativo do eixo HPA a través do hipocampo, hipotálamo, pituitária e outros sítios; os esteroides podem limitar seu próprio aumento e assim terminar a resposta inicial de jeito eficiente, o feedback negativo esta controlado primariamente pelo cérebro; no entanto como pode ser visto, é provável que não seja só um *locus* no cérebro que realize esta função (MERAZ e BAÑUELOS, 2009).

A limitação da resposta ao estresse é claramente uma prioridade. Todos os vertebrados têm uma resposta de feedback negativo, que ao ser interrompido pode ser acumulado, provocando que os glicocorticoide produzam efeitos degenerativos no corpo e cérebro (MERAZ e BAÑUELOS, 2009).

Por outro lado, os glicocorticoides promovem a glicogênese: ao incrementar a pressão sanguínea suprimem aspectos das funções imunes e reprodutivas, além de, inibir a síntese e secreção de outros hormônios endócrinos. O aumento resultante das concentrações de glicocorticoides produz alterações na regulação da energia e do metabolismo (MERAZ e BAÑUELOS, 2009).

3.6 Estresse

O estresse é um conceito importado da física, definido por Robert Hook no século XVII para explicar a relação entre a carga ou força exercida sobre um objeto e a sua consequente deformação, cujo resultado dependeria das propriedades estruturais do objeto e das características da força (CARLSON, 2006). O termo de *estresse* foi usado pela primeira vez por Hans Sele em 1936, para descrever aquela situação em que fatores médio ambientais agressivos ou estressantes desencadeiam uma resposta fisiológica e de comportamento no indivíduo que tem como finalidade preparar ao organismo para confrontar estes estímulos que se apresentam ao interatuar com o médio ambiente (MERAZ e BAÑUELOS, 2009).

O estresse permite a adaptação do organismo a novas exigências do mundo exterior. Ante as mudanças ambientais, o organismo produz uma cadeia de respostas fisiológicas, que variam ao longo do tempo. O sistema límbico se encarrega de adaptar as condutas do organismo à conservação do estado ótimo do meio interno (ALMIRÓN, 2009).

O estresse produz a ativação de vários sistemas fisiológicos, incluindo o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA), o sistema nervoso autônomo e o imune. A magnitude da resposta fisiológica ao estresse pode representar a diversidade da ameaça e consequentemente o grado de adaptação. A secreção da ACTH desde a pituitária e dos glicocorticoides desde o córtex adrenal, são os passos finais para a ativação do eixo HPA, que por seu efeito sobre o metabolismo restaura a homeostase do organismo (Figura 1) (MERAZ e BAÑUELOS, 2009).

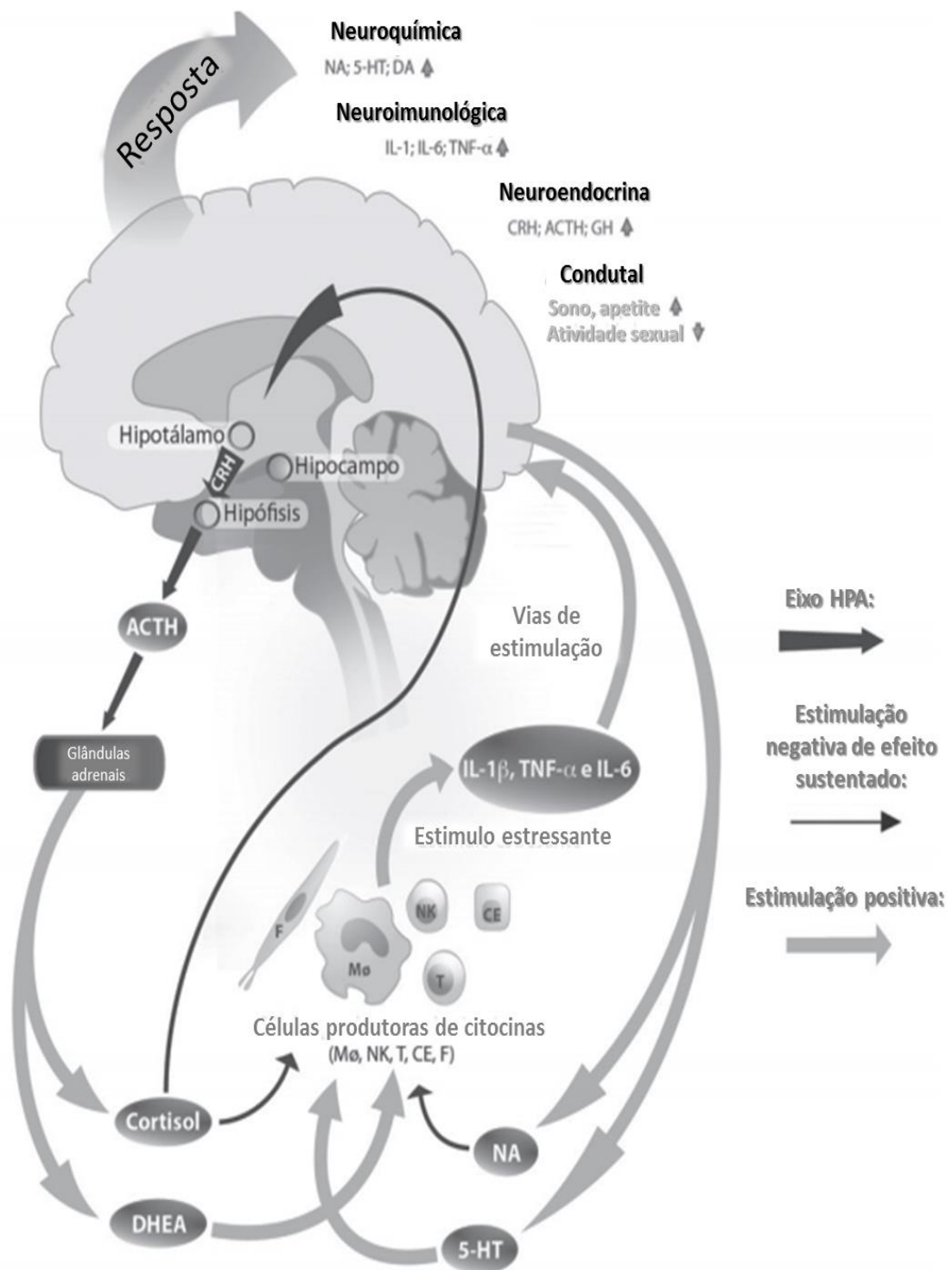


Figura 1 - Regulação psiconeuroendocrinológica ante o estresse crônico. Setas cinza representam estimulação positiva, setas pretas representam estimulação negativa. M Φ : macrófago, NK: "natural killer", T: linfócito T, F: fibroblasto, CE: célula epitelial, IL: interleucina, ACTH: hormônio adrenocorticotrófico, GH: hormônio de crescimento.

Fonte: Adaptado (VILLANUEVA et al., 2012).

Segundo Pacák e Palkovits (2001), o estresse faz com que se apresente a síndrome geral de adaptação, em que as alterações fisiológicas ante uma situação estressante atravessam três fases: a) ALARME, quando se detecta o agente nocivo se ativa o sistema nervoso simpático, as glândulas suprarrenais iniciam a secreção de glicocorticoides (entre eles o cortisol) e adrenalina, mobilizando recursos energéticos necessários para fazer frente à ameaça; b) RESISTÊNCIA, quando o organismo incrementa a atividade do sistema imune e suprime a função dos sistemas e órgãos que não são necessários para sobreviver à emergência; e c) ESGOTAMENTO, que se apresenta em casos de estresse crônico quando o organismo desenvolve processos patológicos devido ao desgaste energético, como hipertensão, úlceras gástricas e alterações neurológicas chegando inclusive ao óbito.

No início das modificações endócrinas, o hipotálamo secreta CRH, a hipófise secreta ACTH e a medula adrenal aumenta a secreção de catecolaminas e o córtex adrenal provoca um aumento dos corticoides, fundamentalmente cortisol, nas etapas iniciais e adaptativas do estresse. Um rápido incremento da adrenalina (catecolamina) se relaciona com as respostas ativas de afrontamento ao estressor, os corticoides preparam o organismo para uma emergência e aumentam a glicemia a partir da glicogenólise. Também diminuem a síntese de proteínas e aceleram sua degradação. Os aminoácidos liberados são usados na glicogenólise e na síntese de componentes intracelulares. Em longo prazo ocorre debilitação muscular e suspensão da resposta imunitária. Esta cascata também altera as membranas celulares provocando retenção de água e promovem a saída de ácidos graxos do tecido adiposo para o sangue, onde atuam como fontes de energia (ALMIRÓN, 2009).

3.6.1 Via e mecanismos de ação do estresse

As ações do cortisol são mediadas pelos receptores de glicocorticoides (GR) e mineralocorticoide (MR), os dois pertencentes a uma superfamília de receptores nucleares relacionados com a regulação de transcrição de genes. O MR tem uma

afinidade alta (Kd: 0.5-2 nM) pelo cortisol, corticosterona e pelo mineralocorticoide aldosterona. Sua distribuição no organismo é discreta, mas ocupa áreas de muita importância nos processos homeostáticos e cognitivos, tais como no rim, hipocampo, córtex entorrial e hipotálamo. Por outro lado o GR apresenta baixa afinidade (Kd: 10-20 nM) pelo cortisol e corticosterona. Os GR estão amplamente distribuídos no corpo e sua ativação depende diretamente da concentração do ligante. Assim, os MRs medeiam os efeitos do cortisol em concentrações baixas e, quando níveis do hormônio aumentam, como ocorre durante o estresse, os GRs são ocupados para mediar os efeitos biológicos do cortisol (BUCKLEY e SCHATZBERG, 2005).

Em geral, os dois tipos de receptores do cortisol constam de três domínios funcionais: um domínio N-terminal que facilita a atividade transcricional; um domínio de união ao elemento de resposta do DNA que se une a uma sequência específica do genoma, o qual promove ou inibe a produção de tipos de proteínas que levam a cabo a resposta ao estresse; e um domínio de união ao ligante localizado na extremidade C-terminal, que reconhece o hormônio. No citoplasma, os dois tipos de receptores formam complexos multiproteicos que incluem as proteínas do choque térmico Hsp90 e Hsp70 cuja função é conservar o receptor em uma conformação ideal para sua união com o ligante. Uma vez que o hormônio se une ao receptor, neste último ocorre uma mudança conformacional mediante a qual se separa das proteínas de choque térmico e fica exposto ao domínio de união à molécula de DNA; a continuação os receptores podem homo ou heterodimerizarem-se para depois unirem-se a elementos de resposta aos glicocorticoides do DNA da célula alvo. Seguindo a isto, dá-se um recrutamento de coativadores ou corepressores que favorecerá ou inibirá a transcrição genica. Alguns monômeros de receptores glicocorticoides têm a capacidade de interagir com fatores de transcrição para impedir as reações primárias ao estresse e amortecer, até certo limite, as ações do cortisol (VIENGCHAREUN et al., 2007).

É importante dizer que ante o incremento súbito de cortisol sérico se gera uma resposta celular rápida através de agentes de ação imediata tais como as catecolaminas, neuropeptídios e até o mesmo o cortisol (atuando provavelmente sobre um receptor esteroide de membrana ainda não identificado) garantindo uma situação de alerta e atenção máxima do indivíduo. Uma vez normalizado o nível de

hormônio circulante serão os MRs e os GRs os encargados de mediar os efeitos de longo prazo do cortisol (BUCKLEY e SCHATZBERG, 2005).

Ao aplicar um modelo de estresse crônico se produzem mudanças adaptativas na função HPA no nível de pituitária ou suprapituitária e incrementa a sensibilização das células adronocorticotropas, aumentando assim a circulação de ACTH e incrementando os níveis basales das concentrações de cortisol (MERAZ e BAÑUELOS, 2009).

Os títulos de cortisol e ACTH em plasma decrescem continuamente com a repetição do estressor, o que sugere um processo de adaptação. Os níveis baixos de cortisol circulante se devem ao truncamento do ritmo circadiano do cortisol, o qual é um indicador sensível de estresse crônico (MERAZ e BAÑUELOS, 2009).

A habilidade de um animal para ter uma resposta de adaptação a seu médio ambiente depende do balanço da função de receptores a mineralocorticoides (MR) e os receptores a glicocorticoides (GR). Um distúrbio no balanço pode permitir a redução ou o aumento da resposta e promover a susceptibilidade ao estresse, alternando a conduta de adaptação. O estresse crônico produz adaptação na expressão de receptores a mineralocorticoides no hipocampo e de receptores a glicocorticoides no córtex pré-frontal e no núcleo praventricular (PVN). Junto com os aminoácidos excitatórios e os receptores NMDA, os esteroides adrenais participam na regulação da estrutura plástica em neurônios piramidais do hipocampo adulto, assim como na remodelação dos dendritos apicais CA3 no hipocampo (MERAZ e BAÑUELOS, 2009).

Dependendo do tipo de estresse, físico ou psicológico, se ativam os neurônios cerebrais ou das áreas do sistema límbico (respetivamente), as quais incidem sobre neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) que sintetizam CRH (hormônio liberados de Corticotropina) (JOSEPH-BRAVO e DE GORTARI, 2007). Tanto na estimulação por frio como por sucção ocorre um rápido aumento do conteúdo de corticosterona sérica que afeta, dependendo da dose e do tempo de exposição, a concentração de RNAm de TRH (JOSEPH-BRAVO e DE GORTARI, 2007). O estresse calórico é uma combinação de variáveis ambientais diretas, principalmente temperatura e humidade. As ratas expostas a estresse calórico extremo (40°C) não suam nem arfam. Em lugar de isto elas ativam outros mecanismos de perda de calor tais como vasodilatação, especialmente da cauda,

também salivam e a usam para cobrir sua pele e pelagem com esta saliva para dissipar o calor por evaporação. A perda de saliva sob estresse calórico tem severas implicações para a economia dos fluidos do corpo da rata e contribui à desidratação térmica e subsequente sensação de sede. Nas ratas o umbral para a ativação de perda de água pela vaporização e salivagem para dissipar o calor, existe em um rango de 32 a 36° de temperatura ambiente. Reportam que ratas expostas a 38°C durante 60 minutos apresentaram um incremento significativo dos níveis na circulação de ACTH e corticosterona, demonstrando a intensidade da resposta ao estresse. Também existe um incremento da produção da aldosterona como resultado da estimulação do eixo HPA e o qual o efeito fisiológico corresponde ao hormônio hipotalâmico Vasopressina, para reestabelecer a homeostase osmótica (HÜBSCHLE et al., 2001).

3.6.2 Efeito do estresse crônico sobre o cérebro

Diversos estudos têm mostrado que as situações do estresse crônico em ratos, induzem uma regressão do crescimento das ramificações dendríticas de neurônios piramidais do hipocampo em especial na região CA3 e CA1 do Corno de Ammon e suprime a neurogênese de neurônios granulares no GD, tratamentos com estresse por 21 dias suprime a neurogênese e por 42 dias causa decremento no número de neurônios e volume total do GD; produz decremento no crescimento, número de ramificações e espinhos dendríticos de neurônios piramidais das camadas II e III do córtex pré-frontal medial assim como também causa hipertrofia dendrítica em neurônios do complexo basolateral da amígdala (BLA) (MERAZ e BAÑUELOS, 2009).

No cérebro, os axônios excitatórios do córtex entorrinal inervam os neurônios granulares do GD (via perfurante); estas enviam fibras musgosas até os neurônios piramidais e interneurônios do hilus, os quais enviam projeções da natureza inibitória até os neurônios piramidais de CA3. Pela sua parte, as *colaterais de Shaffer* se originam em neurônios de CA3 e se conectam com neurônios piramidais de CA1 que a sua vez se projetam sobre o subículo que se conectam de

regresso à área entorrinal, cerrando o circuito pelo que seu nome é *circuito trisináptico* (MERAZ e BAÑUELOS, 2009).

O estresse e os glicocorticoides alteram a morfologia pré-sináptica das fibras musgosas no *estratum lucidum* da região CA3, os terminais das fibras musgosas estão nas regiões proximais dos dendritos apicais dos neurônios CA3. As aferências distais ao soma dos neurônios forma a sinapse dos *espinhos* e incluem as fibras comissurais do hipocampo colateral, axônios colaterais recorrentes e os neurônios CA3 e da via perfurante do córtex entorrinal (MERAZ e BAÑUELOS, 2009).

Durante longos períodos de estresse liberam-se altos níveis de glicocorticoides (GCs) e aminoácidos excitatórios (AE), que são transportados pelo caminho das fibras musgosas até a região CA3 no hipocampo onde participam na remodelação dendrítica. O glutamato é o principal AE liberado durante o estresse crônico, já que seu transportador Glt-1 se encontra elevado na área de CA3 durante este período. Evidência recente indica que os receptores pré-sinápticos que contem subunidades de receptores a kainato como GluR6 são importantes para o glutamato nas fibras musgosas terminais (MERAZ e BAÑUELOS, 2009).

O estresse crônico produz uma drástica remodelação da arvore apical dos dendritos CA3, que corresponde ao sitio de expressão dos receptores glutamatérgicos tipo *N-methyl-D-aspartate* (NMDA). Como consequência, diversos estudos implicam a associação das fibras comissurais do hipocampo colateral, como contribuição para a retração dendrítica de CA3. Outro estúdio mostra que as lesões no córtex entorrinal, as quais se projetam até as porções distais da região apical de CA3, as protegem contra a retração dendrítica depois de um estímulo de estresse crônico. Porém, a retração dendrítica típica ocorre sobre a região apical do CA3 e não no arvore dendrítico basal; a região anterior recebe a maioria de impulsos das fibras musgosas desde o GD, indicando que o dano seletivo para o GD pode também prevenir a remodelação dendrítica induzida pelo estresse (MERAZ e BAÑUELOS, 2009).

Os glicocorticoides são protagonistas desta remodelação dendrítica já que afetam o sistema AE: primeiro os esteroides adrenais modulam a expressão dos receptores NMDA no hipocampo, a exposição crônica a glicocorticoides permite o incremento da expressão dos sítios de união para receptores de tipo NMDA em ambas das subunidades de NR2A e NR2B; depois, os glicocorticoides afetam a

expressão dos níveis de mRNA para subunidades específicas dos receptores de glutamato na área CA3 e GD, o que sugere que os glicocorticoides podem alterar a excitabilidade dos neurônios hipocâmpais a través da regulação da expressão do receptor NMDA (MERAZ e BAÑUELOS, 2009).

3.6.3 Hipocampo e o Estresse

O hipocampo é o primeiro alvo para os esteroides adrenais (glicocorticoides), que são os principais hormônios durante o estresse e que demonstram ter efeitos na plasticidade e perda de neurônios hipocâmpais. Os glicocorticoides podem chegar a modular a plasticidade sináptica neuronal em 30 minutos. Os hormônios adrenais junto com os receptores NMDA e o aumento do glutamato modulam os câmbios na formação sináptica e na estrutura dendrítica assim como também regulam o volume do GD durante o desenvolvimento da vida adulta (MERAZ e BAÑUELOS, 2009).

Estudos anteriores mostraram que a capacidade de ratos imunodeficientes para realizar uma aprendizagem espacial ou de memória que são hipocampo-dependentes é prejudicada (BRYNSKIKH et al., 2008).

Um dos efeitos encontrados sobre o comportamento provocado pelo estresse é o dano do conhecimento espacial, reconhecimento e memória no hipocampo (MERAZ e BAÑUELOS, 2009). Consequentemente o estresse se relaciona hermeticamente com as mudanças celulares no hipocampo e por tanto, com mudanças condutais associadas a este órgão cerebral.

O estresse crônico induz a diminuição na complexidade da arvore dendrítica a qual acontece junto com a diminuição da densidade de excrescências e espinhas dendríticas. Dentro do hipocampo os impulsos vêm do córtex entorrinal ao GD que a sua vez se ramifica por conexões às células piramidais CA3 (Figura 2). Alguns neurônios granulares inervam uma meia de outros 50 neurônios de CA1 via os axônios colaterais, assim como 25 células inibitórias via outros axônios colaterais. Os resultados são 600 amplificações excitatórias e 3000 amplificações inibitórias, que proveem alguns grados de controle do sistema (MERAZ e BAÑUELOS, 2009).

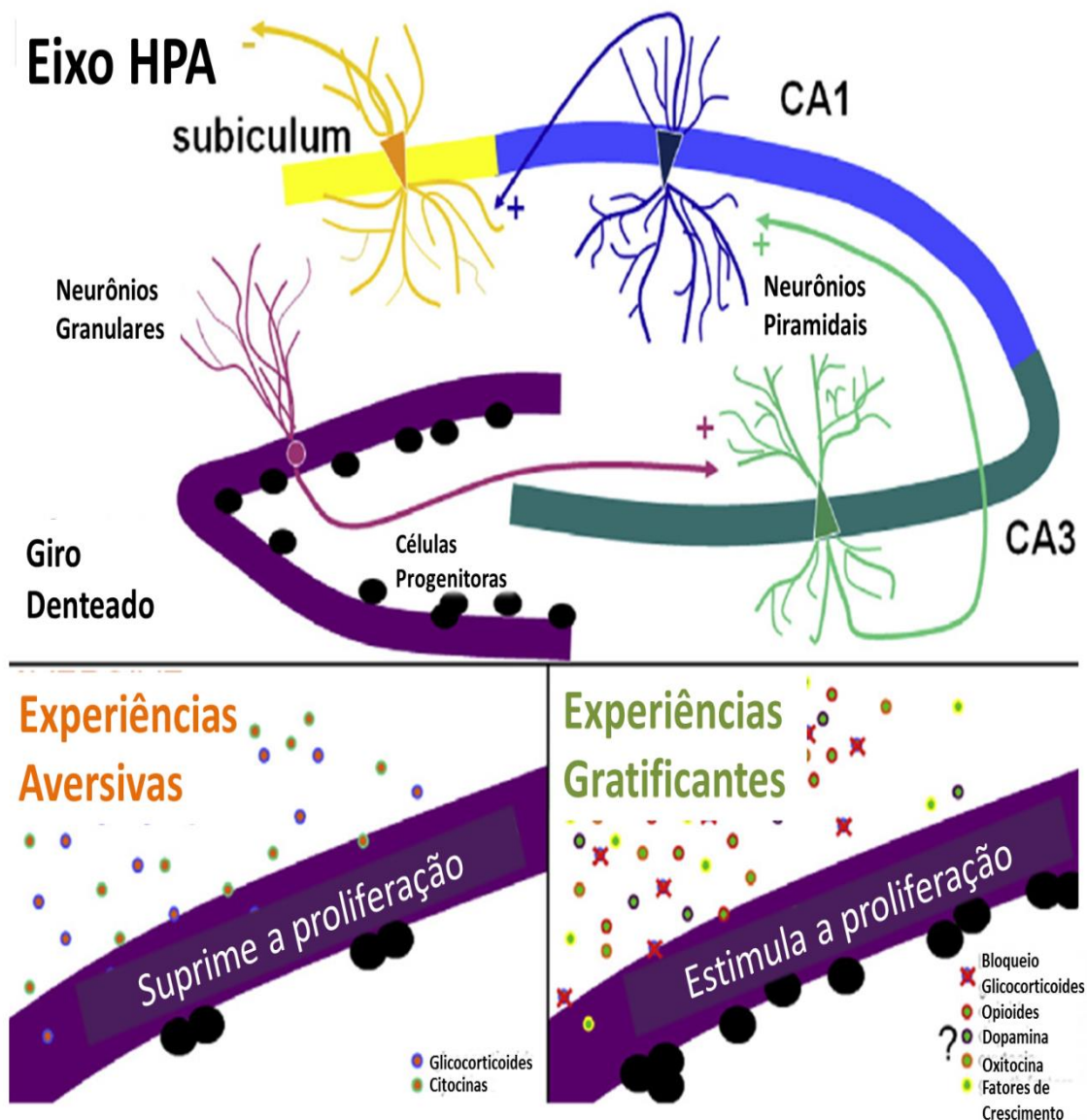


Figura 2 - Efeitos do estresse e glicocorticoides sobre os principais tipos de células do hipocampo. Via tri-sináptica que participa na resposta ao estresse no hipocampo, dependendo da experiência se suprime ou se estimula a neurogênese.

Fonte: Adaptado (SHOENFELD e GOULD, 2012).

Recentemente, se mostrou que ratinhos imunodeficientes são capazes de adquirir uma nova tarefa que requer de navegação espacial, mas estas são debilitadas na memória subsequente da sua formação. Além disso, mostrou que, mesmo jovens, animais saudáveis sofrem de memória espacial alterada como consequência da depleção súbita de células T. Como corolário, imuno-relacionada à

perda de memória espacial poderia ser parcialmente corrigido por reconstituição imune (RON-HAREL et al., 2008).

Estes resultados sugerem que o mau funcionamento imunológico tem um efeito devastador sobre hipocampo-dependente da capacidade de memória espacial e é reversível pela ativação imune. A memória espacial e episódica hipocampo-dependentes são severamente prejudicadas, mesmo durante o que é considerado envelhecimento normal. Tal disfunção hipocampal é manifestada pela reduzida capacidade para recuperar-se de um mapa num ambiente conhecido e se ajustar às mudanças espaciais. Algumas dessas disfunções neuronais têm sido atribuídas a perturbações na homeostase de Ca^{2+} . Níveis superiores de Ca^{2+} celular em combinação com níveis reduzidos de AMPc basais causam aumento do potencial após hiperpolarização, tornando os neurônios idades longe de seus limites de potencial de ação e, portanto, menos excitáveis em comparação com células jovens. Um aspecto adicional do envelhecimento do hipocampo, possivelmente contribuindo para o comprometimento do desempenho da memória espacial, é a redução do número de sinapses contidas no hipocampo idoso, no giro dentado (BURKE e BARNES, 2006) e a densidade pré-sináptica (BILLARD, 2006).

Estudos neuroquímicos e eletrofisiológicos mostram que o processo de neogênese no hipocampo gera neurônios funcionais e integrados aos circuitos hipocampais (VAN PRAAG et al., 2002). Eles poderiam repor a perda de outros neurônios, conferindo maior plasticidade ao hipocampo. Os novos neurônios são mais susceptíveis a sofrerem potencialização de longa duração no hipocampo (LTP), um fenômeno relacionado à aprendizagem e à memória (SNYDER et al., 2001). Durante situações de estresse, o hipocampo pode sofrer modulação pelo complexo amigdalóide. Esta estrutura subcortical do lobo temporal é fundamental na elaboração de respostas emocionais frente a ameaças. Ela atribuiria significado (positivo ou negativo) a novas experiências e modularia processos plásticos sediados no hipocampo envolvidos com o processamento de informações (McGAUGH, 2000), especialmente durante situações de estresse (AKIRAV e RICHTER-LEVIN, 2002).

3.7 O papel dos neuroesteroides durante o estresse

A resposta da atividade reprodutiva a vários estímulos externos incluindo o estresse são modulados pelos esteroides ováricos. A ação da retroalimentação dos estrógenos altera a resposta ao estímulo ambiental (estresse) dos neurônios que regulam o eixo gonadal (DÍAZ, 2006).

Os efeitos sensibilizadores dos estrógenos sobre a supressão da secreção pulsátil da LH podem também ser exercidos diretamente no nível da área preóptica por aumentar a liberação estimulada como basal do ácido gamma-aminobutírico (GABA) (MITCHELL et al., 2005). Além, sugere ao locus coeruleus como um lugar plausível para os efeitos de sensibilização dos estrógenos na disfunção do eixo reprodutivo induzido pelo estresse, já que em este se expressam os receptores de estrógenos α e β . Reportam uma diminuição dos níveis basais de CRH e um incremento da resposta de corticosterona ao estresse em ratas ovariectomizadas tratadas com 17β -estradiol, e apesar da adaptação das respostas da corticosterona durante exposições subsequentes ao estresse, os níveis de corticosterona permanecem mais altos em as ratas tratadas com 17β -estradiol que em ratas ovariectomizadas. O que sugere que a magnitude da secreção inicial e a adaptação da resposta da corticosterona são controladas de jeito diferente pelo 17β -estradiol (LUNGA e HERBERT, 2004). Sugerem que enquanto a corticosterona não tem efeito agudo sobre os pulsos da LH na rata, a super-regulação dos esteroides ováricos do RNAm da CRH no PVN pode contribuir na regulação central destes pulsos na resposta ao estresse. Além de confirmar que o efeito sensibilizador dos estrógenos sobre a supressão pulsátil da LH induzida pelo estresse metabólico (hipoglicêmico) é potencializado pela P_4 (LI et al., 2003).

A progesterona participa de modo muito importante na plasticidade sináptica que ordinariamente se produz no hipotálamo a traves do ciclo ovárico e em modular a reorganização do citoesqueleto astrocitário em respostas a outros hormônios gonadais (DÍAZ, 2006).

Estudos revelam que 48 horas de privação da comida resulta na supressão da liberação da LH em ratas ovariectomizadas. O jejum agudo suprime a liberação de LH a traves de um mecanismo de retroalimentação negativa dos estrogênios.

Sugere-se que a ação de retroalimentação dos estrógenos sobre o PVN é requerido para suprimir a liberação pulsátil da LH durante o jejum agudo em ratas, em comparação com a suposta retroalimentação negativa dos estrógenos sobre a área supraquiasmática preóptica e hipotálamo médio basal, que suprime tonicamente a secreção da LH em ratas bem alimentadas (LUNGA e HERBERT, 2004).

3.8 Dobramento proteico, chaperonas e co-chaperonas

A maquinaria de síntese proteica é dividida em várias etapas de igual importância, começando na transcrição dos genes codificadores, formando o RNA mensageiro, o qual tem por função transmitir a informação contida no DNA para formação das proteínas. O RNA mensageiro é traduzido pelos ribossomos presentes no citoplasma ou no retículo endoplasmático rugoso, que se anela ao RNA transportador. Este, por sua vez, está ligado a um aminoácido específico proporcionando assim a aproximação dos aminoácidos, que através de uma variedade de proteínas sintetases, formam uma cadeia de resíduos de aminoácidos (GOLDING e COX, 2006). Após a tradução do RNA mensageiro, uma proteína necessita de dobramentos das cadeias polipeptídicas para a formação das estruturas secundárias, terciárias e quaternárias, as quais são intimamente ligadas à localização e a função da proteína sintetizada (YON, 1997). A estrutura de uma proteína recém-sintetizada pode adquirir várias conformações. Este fato é devido a estereo química da cadeia polipeptídica que pelo número de resíduos aminoácidos, cada um pode formar até oito ângulos distintos. Isto é, a cada resíduo presente na cadeia polipeptídica, esta pode tomar até oito direções possíveis, determinados pelos tipos de ligação. Em geral toda molécula, de qualquer proteína, adota uma única conformação chamada de estado nativo, sendo que para maioria das proteínas o estado nativo é a conformação mais estável (BRANDEN e TOOZE, 1999). Estando com a estrutura estável a molécula proteica pode ou não estar funcional. Por exemplo, proteínas que dependem de co-fatores, como ATP ou NADH, para executar suas funções, tem a conformação da estrutura modificada em presença dos co-fatores. Cessando a atuação do co-fator a proteína volta a assumir

uma conformação mais estável, mas não funcional. Por outro lado existem proteínas, como algumas do citoesqueleto, que são constitutivamente funcionais, não necessitando de co-fatores. Para a estrutura proteica recém sintetizada chegar ao seu estado nativo é necessário à ação de co-fatores e outras proteínas que possibilitem o dobramento da estrutura na forma correta. Testes *in vitro* de renaturação de proteínas demonstraram que somente as informações presentes na estrutura primária “sequência aminoacídica” não é suficiente para um dobramento correto da estrutura (ZHANG et al., 2002). Estes dobramentos são feitos com auxílio de chaperoninas, as quais atuam na formação da conformação proteica.

As chaperoninas são complexos proteicos formados pela junção de chaperonas durante o dobramento proteico, acelerando e mantendo a eficiência do processo de dobramento. As proteínas auxiliares chamadas de chaperonas possuem este nome devido ao termo inglês *chaperons*, que designa uma jovem senhorita que acompanha damas idosas, sendo estas assistidas quase todo tempo pelas *chaperons*. Define-se chaperona a molécula proteica que estabiliza proteínas sem conformação ou parcialmente dobradas, e chaperonina é definida como uma proteína que auxilia no dobramento da molécula. Também é dado o nome de chaperonina o complexo proteico responsável pelo dobramento. As chaperonas possuem em sua estrutura molecular regiões que permitem a ligação a proteínas, havendo uma preferência pelas proteínas sem conformação definida. Estas regiões na molécula são expostas quando as chaperonas estão ligadas a ATP, formando um bolsão hidrofóbico, onde será acoplada a proteína que deve ser dobrada. Após a hidrólise do ATP, ligado a chaperona, em ADP, o bolsão hidrofóbico fecha-se dobrando a proteína ali acoplada, que é imediatamente liberada. Este processo ocorre logo após a síntese da cadeia polipeptídica pelos ribossomos no citoplasma e no retículo endoplasmático rugoso. Este fato diminui a probabilidade da conformação proteica ser dobrada erroneamente, ou haver agregação da cadeia polipeptídica (ZHANG et al., 2002).

As chaperonas são fatores de grande importância na síntese proteica acumulando várias funções, como auxílio na nova síntese proteica, rearranjo dos oligômeros proteicos e proteção contra os efeitos do estresse celular. Também participam da degradação proteica via lisossomal em procariotos e via ubiquitinação em eucariotos, com (KORNITZER e CIECHANOVER, 2000). Originalmente

identificadas como proteínas super expressas (“upregulated”) sob condições de estresse por calor, as chaperonas são descritas como proteínas de choque térmico (HSPs) e são classificadas e nomeadas pela massa molecular (MORAN et al., 2005). Há componentes desta classe proteica, conhecidas como HSC (Heat Shock Cognates) (FEIGE e POLLA, 1994), que são expressos constitutivamente, isto é, dentro da vida normal dos organismos não submetidos às condições de estresse (FULLER et al., 1994). As formas cognatas não são idênticas às formas indutáveis; estas, quando surgem, somam quantidades muito maiores do que aquelas constitutivas. Na Entretanto, nem toda chaperona foi descrita por stress térmico e nem toda proteína denominada HSP identifica uma chaperona.

As HSP são uma classe de proteínas altamente conservadas, desde seres primitivos (procariontes) até o homem, o que é um indício de seu grande valor evolutivo⁶. As HSP podem ser agrupadas em famílias: HSP-27, HSP-47, HSP-60, HSP-70, HSP- 90 e HSP-1103, de acordo com suas sequências de aminoácidos e com seus pesos moleculares (em kD quilodaltons), determinados pelo método SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamidasódio-dodecil-sulfato) (FULLER et al., 1994). Em cada família, há diferentes proteínas, por exemplo, HSP-72 e HSP-73 no grupo HSP-70; os pesos moleculares são similares, mas os padrões de indução e expressão são distintos. A família HSP-70 é a mais conservada filogeneticamente; sua estrutura, no homem, são 72% homóloga em relação às HSP-70 de drosófilas (HUNT e MORIMOTO, 1985). As famílias HSP-60 e HSP-70 são as mais ligadas ao processo geral de dobramento de proteínas nas células (WYNN et al., 1994).

Dentre as chaperonas destacam-se as Hsp70 e Hsp90, as quais participam funcionalmente de vários processos intracelulares e é foco de vários estudos, sendo as mais descritas atualmente (KIM et al., 2006). A perda da eficiência ou comprometimento do processo de dobramento de proteínas recém sintetizadas, e também proteínas que perderam sua conformação, compromete a homeostase intracelular. A quebra da homeostase intracelular deve-se ao fato das proteínas não estarem funcionais, o que compromete o evento biológico que a proteína iria atuar (HENDERSON et al., 1996). Falhas na formação da estrutura proteica causam problemas como perda de função de proteínas e/ou acúmulo, como ocorre nas patologias de Creutzfeldt Jacob, Gerstmann-Straussler-Scheinker, Kuru e doença degenerativa espongiforme (PRUSINER, 1998). Isto se deve as características

conformacionais da molécula proteica, que se alteradas inutilizam a molécula, além da possibilidade de gerar uma resistência à proteólise com conseqüente acúmulo. Este acúmulo proteico anormal refere-se como inclusões amiloides, que desencadeiam uma série danos, os quais podem levar o indivíduo à morte.

Para a perfeita funcionalidade do complexo chaperonina e sua estabilização são necessárias moléculas acessórias às HSPs chamadas co-chaperonas, as quais têm por finalidade estabilizar e modular a função do complexo chaperona durante o dobramento de moléculas proteicas recém-sintetizadas. Além disso, elas atuam no redobramento de moléculas que perderam a conformação por mutação ou fatores do micro ambiente, como stress. (CAPLAN, 2003). As co-chaperonas podem interagir com um grande número de famílias de proteínas de diferentes funções ou mesmo outras HSPs.

A função mais conhecida das co-chaperonas é impedir a agregação de cadeias polipeptídicas recém traduzidas. Tal função implica na estabilização do complexo Hsp70/Hsp90 coordenando a sequência de dobramento correto da molécula alvo. Muitas co-chaperonas não se ligam diretamente a sua "proteína cliente", mas apenas exercem uma ação reguladora sobre as chaperonas. Esta ação pode ser através de catalise da ligação de nucleotídeos, hidrólise ou alterações conformacionais nas HSPs (FRYDMAN, 2001). A interação das Hsp70/90 com as co-chaperonas é específica e bem coordenada com a sequência de eventos do dobramento proteico, sendo que o complexo chaperonina tem a capacidade de reconhecer regiões específicas das cadeias polipeptídicas, as quais serão moldadas, tendo assim um papel de facilitadoras do dobramento (FRYDMAN, 2001). Além da participação das co-chaperonas no processo de dobramento de novas proteínas, pouco se sabe sobre outras possíveis funções, entretanto parecem estar relacionadas com sinalização celular e fosforilação de proteínas (PRODROMOU et al., 1999).

3.8.1 Resposta celular ao estresse: HSP

O processo pelo qual as células respondiam ao estresse ficou conhecido como Heat Shock Response (HSR), ou resposta ao choque térmico. Diversos tipos

de estresse metabólico (exposição ao calor, metais pesados, diversos ionóforos, análogos de aminoácidos e venenos metabólicos que afetam a produção de ATP), resultam em alterações similares na expressão de genes, levando ao acúmulo de HSP (Figura 3). Células submetidas a estresse podem sobreviver ou morrer, na dependência do tipo celular, tipo e intensidade do estresse e de outros fatores. A exposição prévia das células a estresses não mortais pode suscitar a HSR, com a síntese de HSP. Uma nova exposição das células a estresses vai produzir menos lesões. As células que sintetizaram as HSP ficam protegidas contra novas exposições, o que se reflete em menores lesões também no organismo ou em partes dele (FEIGE e POLLA, 1994).

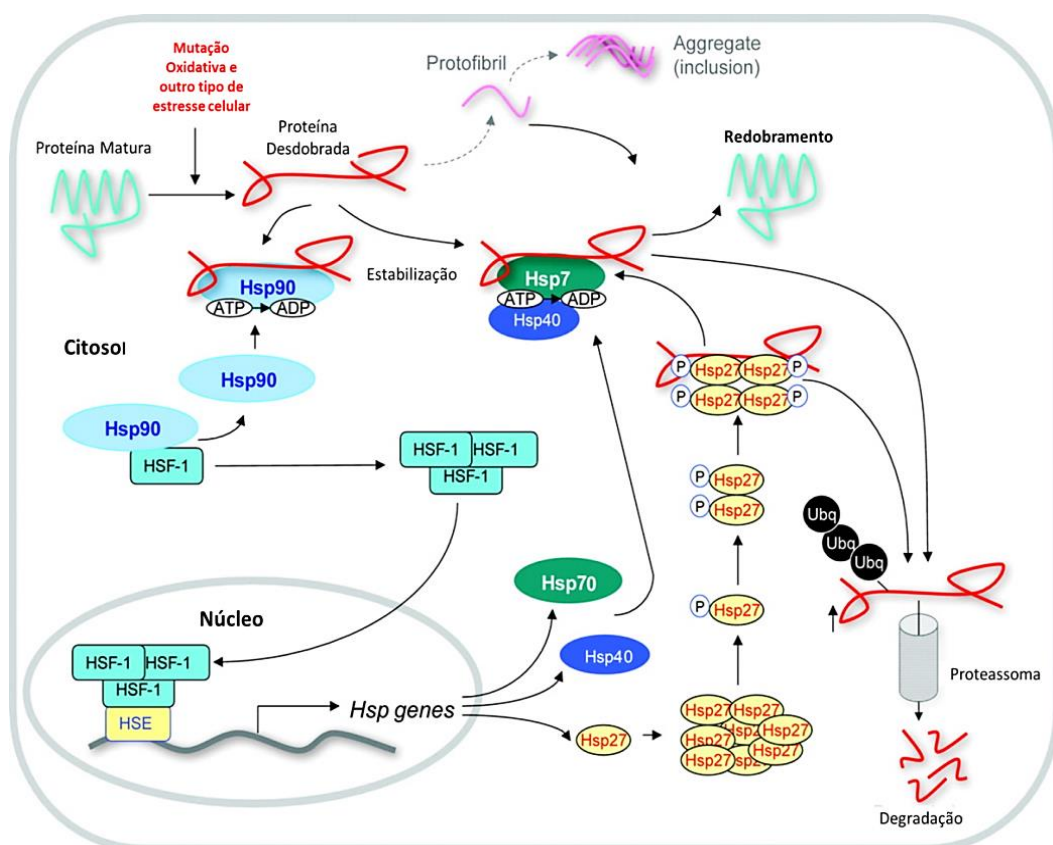


Figura 3 - Função das HSP 90, 27 e 70 dentro da célula, quando se apresenta um estressor.

Fonte: Adaptado (BENARROCH, 2011).

Muitos destes agentes estressantes indutores compartilham a propriedade comum de serem “caotopos protéicos” afetam, de modo adverso, a conformação correta e, conseqüentemente, a função das proteínas (MINOWADA e WELCH, 1995).

Nas condições em que proteínas incorretamente dobradas se acumulam nas células, começa uma resposta ao estresse, ou HSR. Esta se inicia pela ativação de um fator específico de transcrição, chamado HSF- 1 (Heat Shock Factor, ou fator do choque térmico). Em resposta ao estresse metabólico, rapidamente sofreria trimerização, o que tornaria possível sua ligação imediata a uma sequência de nucleotídeos, chamada de HSE (Heat Shock Element, ou elemento do choque térmico), localizada dentro da região promotora dos genes que codificam as HSP, tudo resultando em alto nível de transcrição dos genes do choque térmico. Há componentes desta classe proteica, conhecidas como HSC (Heat Shock Cognates) (FEIGE e POLLA, 1994), que são expressos constitutivamente, isto é, dentro da vida normal dos organismos não submetidos às condições de estresse (FULLER et al., 1994). As formas cognatas não são idênticas às formas indutáveis; estas, quando surgem, somam quantidades muito maiores do que aquelas constitutivas.

Têm coerência as observações de que as HSP protegem células e tecidos dos efeitos deletérios da inflamação, o que ocorreria através da prevenção da quebra de cadeias de DNA induzida por ROM e peroxidação lipídica, bem como através de proteção da estrutura e função das mitocôndrias. *In vivo*, o choque térmico protege órgãos contra uma série de lesões associadas com produção aumentada de citocinas e/ou de ROM. A acumulação de agregados de proteínas deformadas pode sobrecarregar o sistema ubiquitina-proteassômica, induzindo apoptose e aumenta a vulnerabilidade neuronal para posterior insulto (KANG et al., 2004). Devido a atividade anti-apoptotica e papel de chaperona das HSPs, estão sendo consideradas para ser usadas com finais terapêuticos em doenças tais como Alzheimer, Parkinson e acidente vascular cerebral (LATCHMAN, 2005).

3.8.2 Proteínas de Choque Térmico (HSP27 e HSP90)

As Hsp27 e Hsp90 (chamadas cada de acordo com sua massa em kilodaltons) são as melhores caracterizadas da família das HSPs, além das Hsp70. O papel anti-apoptótico destas HSPs está mediado por diferentes mecanismos. As maiores das doenças neurodegenerativas estão associadas a eventos de enrolamento incorreto da proteína.

Os astrócitos ativados aumentam a expressão de proteínas de choque térmico, especialmente da HSP27 (Heat Shock Protein of 27 KDa). Dentre as funções descritas para essa proteína destaca-se a função de proteger as células do estresse (CURRIE et al., 2000).

As Hsp27 aumenta seu nível de expressão várias vezes em resposta ao estresse, pois está envolvida na resistência ao estresse, e é fosforilada por MAPKAP quinase-2, sua função é inibir a ativação da caspase-3, induz depois aumento do citocromo-C na mitocôndria e depois ativação dos receptores da morte como os FAS (BRUEY et al., 2000), além da modulação da polimerização e reorganização dos filamentos de actina na célula. As Hsp90 se ligam ao Apaf-1 e previne a interação com o citocromo-C (PANDEY et al., 2000), está envolvida na transcrição celular, ciclo celular e apoptose. Um número superior a 150 proteínas clientes das Hsp90 já é conhecido e elas podem ser classificadas em 3 grupos: receptores de hormônios corticóides, proteínas quinase e proteínas não relacionadas. A função das Hsp90 é dirigida por associação dinâmica com seus substratos e suas co-chaperonas que formam grandes complexos com outras chaperonas moleculares e outras proteínas celulares. Atualmente, inibidores da Hsp90 têm sido apontados como potenciais fármacos para o tratamento de alguns tipos de câncer. As Hsp90 apresentam atividade de hidrólise de ATP e sua co-chaperona p23 reconhece o estado no qual o ATP está ligado à Hsp90 estimula a dissociação do complexo Hsp90 e outras proteínas (GARRIDO et al., 1999).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental

No presente experimento foram utilizadas 25 fêmeas (*Rattus norvegicus*) com idade entre 10 e 11 meses, o que representa 27,5 anos humanos. Na vida adulta, cada mês do rato equivale a 2,5 anos humanos. (ANDREOLLO et al., 2012). O experimento foi desenhado visando minimizar o número de animais utilizados, conforme Chigr et al (2009). Igualmente, foram seguidas as Normas do Comitê de Ética Para Experimentação Animal da Universidade Federal de Viçosa e do COBEA, sendo o projeto aprovado pelo protocolo (39/2013), com o número de projeto 177727 e do registro 50554200775.

Todos os animais foram pesados no primeiro dia do experimento e divididos em cinco grupos, cada grupo com cinco fêmeas, nos quais, com exceção do grupo controle, foi aplicado o mesmo protocolo de estresse moderado crônico. O protocolo de estresse moderado crônico foi adaptado de Ferreira (2011).

O protocolo consistiu de agentes estressores variados e para evitar a adaptação dos animais ao protocolo de estresse, os agentes estressores foram aplicados em diferentes tempos e dias. Optou-se por retirar estressores como ruídos elevados, natação forçada e flashes de luz, que são comumente usados para animais jovens (STEFANSKI, 2000; HERMAN et al., 2001; GAMARO et al., 2003; BARAN et al., 2009; LUCCA et al., 2009). Cada um dos grupos recebeu um tratamento com o desafio imunológico, estímulo com hormônio do crescimento e glicocorticóide, respeitando os protocolos de estresse moderado crônico, mencionados mais adiante nos tratamentos *in vivo*.

4.2 Animais

Os animais foram adquiridos do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa, com idade de três meses e mantidos no Biotério do Laboratório de Controle de Hematozoários e Vetores (LBCHV). Todos foram agrupados em gaiolas plásticas coletivas (41x34x16cm), forradas com maravalha, sendo cinco fêmeas por gaiola, até atingir a idade de entre 10 e 11 meses, para o início do experimento. O ambiente foi controlado para temperatura de 24 graus (± 2) e períodos de luz de 12 horas. Água e comida foram oferecidas *ad libitum* e a cada três dias, as gaiolas e as garrafas de água foram lavadas, higienizadas com hipoclorito de sódio, e a maravalha substituída. Durante o período em que os animais foram mantidos alojados para que o atingissem a idade necessária, nenhum animal veio a óbito.

Associado ao estresse crônico moderado, de acordo com o grupo experimental, os animais receberam um desafio imunológico, alguns tiveram o estímulo com GH ou imunossupressão com dexametasona, sendo os grupos assim divididos, como ilustrados na Tabela 1.

Tabela 1. Constituição dos grupos estudados. Obs: O número de animais (n) refere-se à amostra final estudada.

GRUPO	DEFINIÇÃO	NOMENCLATURA
GRUPO I	Fêmeas controle. (n=5)	C
GRUPO II	Fêmeas submetidas ao protocolo de estresse crônico moderado. (n=5)	E
GRUPO III	Fêmeas submetidas ao protocolo de estresse crônico moderado associado ao desafio imunológico. (n=5)	E+D
GRUPO IV	Fêmeas submetidas ao protocolo de estresse crônico moderado associado ao hormônio de crescimento. (n=5)	E+S
GRUPO V	Fêmeas submetidas ao protocolo de estresse crônico moderado associado ao glicocorticóide. (n=5)	E+G

Fonte: Dados de pesquisa

4.3 Estressores

Para evitar a adaptação dos animais, os agentes estressores, foram aplicados em diferentes tempos e dias (FERREIRA, 2011).

Os estressores adotados foram:

- a) Privação de água por 12 horas.
- b) Privação de alimento por 12 horas.
- c) Imobilização individual por 20 minutos.
- d) Inclinação da gaiola em um ângulo de 45 graus por 12 horas.
- e) Diminuição da temperatura ambiente a 4° por 2 horas.
- f) Aumento da temperatura ambiente de 38° a 40° por 2 horas.
- g) Manutenção da luminosidade por 24 horas.
- h) Período de isolamento por 24 horas.

Nos períodos de contenção, os animais foram envolvidos em capa de gaze feita de um tecido leve de algodão presa rente ao corpo por meio de fita transparente, de forma que eles se mantiveram imóveis, por vinte minutos.

Nas alterações de temperatura, quando submetidos ao estressor frio, os animais eram transferidos para um freezer horizontal Consul 320, regulado para a temperatura desejada, onde permaneciam por duas horas. A temperatura era monitorada a cada cinco minutos com o sensor externo do termômetro ambiental posicionado dentro da gaiola, próximo ao fundo, mas sem tocá-lo. Para a aplicação do calor, as gaiolas dos animais eram colocadas dentro de uma caixa grande de madeira e um aquecedor de ar elétrico portátil posicionado dentro da caixa. Da mesma forma, o sensor do termômetro foi colocado ao fundo da caixa e a temperatura monitorada a cada cinco minutos, sendo mantida entre 38 e 40°C. O estressor foi aplicado durante duas horas.

Os animais, quando submetidos ao isolamento, foram transferidos para gaiolas individuais, onde permaneceram por 24 horas, das 7h da manhã do dia indicado no cronograma até às 7h da manhã do dia seguinte. As gaiolas ficaram

posicionadas lado a lado, porém foram inseridas divisórias entre elas, impedindo o contato visual entre os animais, mas não o auditivo e olfativo.

Para a inclinação, as gaiolas dos animais foram mantidas apoiadas na parede, de maneira que o fundo da gaiola forme um ângulo de 45° com o plano horizontal. A aplicação deste estressor foi mantida por 12 horas.

Quando submetidos à privação de água, a garrafa foi retirada da gaiola às 7h da manhã e retornada às 19h, quando era então iniciada a privação de alimento durante 12h.

Para o estresse associado à privação do período escuro, as gaiolas foram transferidas para outra sala, onde a luz permanecia acesa durante o período noturno. Na manhã do dia seguinte, os animais retornaram à sala principal do experimento.

Cada um dos grupos, exceto o controle, recebeu um tratamento, respeitando o protocolo de estresse crônico moderado, conforme descrito na Tabela 2.

Tabela 2. Distribuição dos grupos submetidos ao protocolo de estresse crônico moderado, neste experimento, baseado no modelo experimental de Ferreira (2011).

DIA	C	E	E+D	E+S	E+G
1	CP	I	I	I	I
2	CP	F	F	F	F
3	CP	C	C	C	C
4	CP	C20	C20	C20	C20
5	CP	IN	IN	IN	IN
6	CP	CP	CP	CP	CP
7	CP	PA	PA	PA	PA
8	CP	PC	PC	PC	PC
9	CP	I	I	I	I
10	CP	I45	I45	I45	I45
11	CP	F	F	F	F
12	CP	C	C	C	C
13	CP	C20	C20	C20	C20
14	CP	IN	IN	IN	IN
15	CP	CP	CP	CP	CP
16	CP	PA	PA	PA	PA
17	CP	PC	PC	PC	PC
18	CP	I	I	I	I
19	CP	I45	I45	I45	I45
20	CP	F	F	F	F
21	CP	C	C	C	CP
22	CP	C20	C20	C20	C20
23	CP	IN	IN	IN	IN
24	CP	CP	CP	CP	CP
25	CP	PA	PA	PA	PA
26	CP	PC	PC	PC	PC
27	CP	I	I	I	I
28	CP	I45	I45	I45	I45
	EUTANASIA	EUTANASIA	EUTANASIA	EUTANASIA	EUTANASIA

(I) Isolamento, (F) Frio, (C) Calor, (C20) Contenção 20 minutos, (CP) Condições Padrão, (PA) Privação de Água, (PC) Privação de Comida, (I45) Inclinação da Gaiola 45°, (IN) Iluminação noturna.

Fonte: Dados de pesquisa

4.4 Tratamentos *in Vivo*

Os animais dos grupos E+D, além do cronograma de estresse já descrito, receberam via subcutânea 0.5ml de uma substância adjuvante de vacinas, a Saponina®, no primeiro dia do protocolo. O grupo E+S recebeu a administração de hormônio de crescimento Somatotropina®, com doses diárias de 25µg/kg por via subcutânea durante os 28 dias do protocolo, com o objetivo de avaliar a modulação da resposta imunológica. No grupo E+D, foi administrado o corticóide Acetato de Dexametasona (Decadronal®), em doses de 0.05ml via subcutânea, no dia 1 e no dia 15 do protocolo.

4.5 Eutanásia

Os animais foram eutanasiados no 28º dia do protocolo de estresse crônico moderado. Foi realizada a decapitação por guilhotina, para evitar danos celulares não desejados no encéfalo. Todos os procedimentos de eutanásia estão de acordo com as Normas Procedimentos e Métodos de eutanásia contidas na resolução N° 1000, de 11 de Maio de 2012.

4.6 Amostras cerebrais

Após a eutanásia e remoção do encéfalo, o órgão foi imediatamente transferido para um frasco contendo paraformaldeído (10%) por 48 horas, transferidos para frascos com paraformaldeído a 4% durante 24 horas e desidratados diariamente, passando desde o álcool a 70% até o álcool absoluto, antes de procederem-se as secções anatômicas. Foram realizadas duas secções transversais para separar o córtex pré-frontal e expor o hipocampo para melhor corte

no micrótomo. Todas as secções foram incluídas em Paraplast® (WAPPLER et al., 2009).

4.7 Análise dos dados

O presente estudo inclui um trabalho histológico, imunoistoquímico e outro qualitativo. Para a análise microscópica os cortes histológicos foram observados no microscópio modelo Eclipse E600 marca Nikon acoplados a uma câmera digital Feldmann Wild Leitz Digi-Pro 5.0. As imagens foram diretamente transmitidas e trabalhadas no software Micrometrics SE Premium®. Depois das fotomicrografias, foi medida a área do Corno de Ammon (CA) e do Giro Denteado (GD) de cada rata, utilizando-se o programa computacional Image-Pro® Plus. Os dados paramétricos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste Tukey. A análise dos resultados obtidos foi realizada com o auxílio do programa GraphPadPrism.

Finalmente os dados qualitativos avaliados em cada grupo, principalmente características físicas observadas, foram colocados em tabelas para sua análise respectiva.

4.8 Histopatologia

A análise histológica dos encéfalos retirados foi através dos métodos de coloração Cresil Violeta, Cajal e Hematoxilina e Eosina (HE).

O método de Cresil violeta, usa um corante básico utilizado para evidenciar o citoplasma de neurônios. O citoplasma contém várias estruturas, inclusive os corpúsculos de Nissl (ou substância de Nissl). Esses corpúsculos são compostos, basicamente, por RNA. Dessa maneira, tal coloração serve como indicador de viabilidade neuronal, pois, quando da ocorrência de lesão neuronal, esses

corpúsculos podem desaparecer (fenômeno conhecido por cromatólise). O método de Cajal permite avaliar a morfologia dos neurônios, permitindo a sua classificação por tipo, utilizando o Nitrato de Prata. Hematoxilina e Eosina é um método geral, topográfico, que permite mostrar a organização celular.

No presente estudo, como medida histológica de alteração estrutural pelo modelo experimental de estresse crônico, verificou-se a morfologia total do hipocampo, especificamente das regiões do Corno do Ammon (CA1, CA2, CA3 e CA4) e do Giro Denteado, com intuito de padronizar os parâmetros analisados, bem como as amostras de medidas morfométricas. Analisou-se no Corno de Ammon, a densidade e a perda neuronal, presença de neurônios piramidais, astrócitos e características do estrato piramidal. No GD analisou-se a presença ou ausência de eosinofilia citoplasmática dos neurônios e proximidade entre as células além da espessura do estrato granular. No córtex pré-frontal medial, verificou-se a citoarquitetura total, avaliando-se principalmente a composição neuronal das camadas II e III deste.

4.9 Imunoistoquímica para expressão de HSP

A imunoistoquímica foi realizada pelo método indireto (revelação do complexo avidina-biotina-peroxidase). Foram utilizados cortes do hipocampo e córtex pré-frontal com 4 μ m, em lâminas preparadas com Poly-L-Lisina. Foram utilizados os anticorpos primários HSP 27 (c-20): sc-1048 e HSP 90 α/β (N-17): sc-1055 (Santacruz Biotechnology, INC) e o anticorpo secundário IgG anti-cabra (molécula completa) – Biotina, anticorpo produzido em coelho (Santacruz Biotechnology, INC).

Os blocos foram cortados em micrótomo (Olympus Cut 4060E). Os cortes foram desparafinados em estufa a 60^o por 2 horas, colocadas em xilol (dois banhos com duração de 5 minutos cada) e reidratadas em concentrações de álcool 100%, (dois banhos com duração de 5 minutos cada). A peroxidase endógena foi bloqueada com solução de peróxido de hidrogênio em metanol a 3% por 30 minutos

e continuado com a reidratação com álcoois decrescentes 96% (dois banhos com duração de 5 minutos cada) e 70% (banho com duração de 5 minutos). Após estas etapas, o material foi colocado em banho em tampão fosfato (PBS), pH 7,4 (5 minutos).

A recuperação antigênica foi feita com Citrato tamponado, pH 6, em *steamer* (panela a vapor) a 100°, por 40 minutos; posteriormente foi feita a estabilização das lâminas a temperatura ambiente por 20 minutos e dois banhos com PBS, pH 7,4 por 5 minutos cada. O bloqueio da biotina endógena foi feita com um banho em solução de leite em pó a 3% (fonte de biotina) por 30 minutos, seguido de dois banhos com PBS, pH 7,4, por 5 minutos. As lâminas foram então secadas ao redor dos cortes com papel toalha e foi feita incubação por 12 horas em câmara úmida com anticorpo primário (HSP90 e HSP27), a 4°C, na proporção de 1:50 em uma solução de PBS, pH 7,4. Depois do tempo de incubação, foram feitos dois banhos de PBS, pH 7,4 durante 5 minutos. Após os banhos em PBS, todos os cortes foram secados ao seu redor com papel toalha e incubados em câmara úmida com o anticorpo secundário por 1 hora em temperatura 37°C, na proporção de 1:500 em solução de PBS. Após essa etapa, foram feitos os dois banhos com PBS, pH 7,4 por 5 minutos. Os cortes foram novamente secados com papel toalha e foi feita a incubação em câmara úmida com substrato diluído de estreptoavidina a temperatura ambiente, por 1 hora, seguido por dois banhos com PBS, pH 7,4 de 5 minutos cada. Por fim, os cortes foram secados ao redor dos tecidos, foi feita a incubação das lâminas com o cromógeno diaminobenzidina DAB por 7 minutos em câmara úmida a temperatura ambiente por 7 minutos. O excesso de cromógeno foi retirado com água e foi feita a coloração das lâminas com hematoxilina de Harris por 15 segundos cada. As lâminas foram desidratadas e montadas em Entellan®.

Na avaliação da expressão imunoistoquímica dos HSP 27 e 90, analisou-se o Córtex Pré-frontal medial e a região CA (CA1, CA2, CA3 e CA4) e GD do hipocampo e classificou-se a imunomarcagem em quatro escores segundo a Tabela 3, baseada na quantidade de células positivas mensuradas no programa Image-Pro Plus.

Tabela 3. Caracterização dos escores selecionados para a classificação da marcação das lamínas de IHQ.

Score	CARACTERISTICA
+	Raras marcações (-5% do campo)
++	Marcações discretas (5 – 25% do campo)
+++	Boas marcações (25 – 50% do campo)
++++	Marcações fortes (+50% do campo)

O HSP 27 e 90 foi mensurado no hipocampo contando três campos por cada área (CA1, CA2, CA3, CA4 e GD) em cada lâmina, enquanto, no CPFm o HSP 27 e 90 foi mensurado contando três campos por cada lâmina, analisando-se principalmente as camadas II e III. Cada campo foi dividido em 130 quadros para fazer a mensuração exata das imagens e assim padronizar a grade trabalhada (Fig 4).

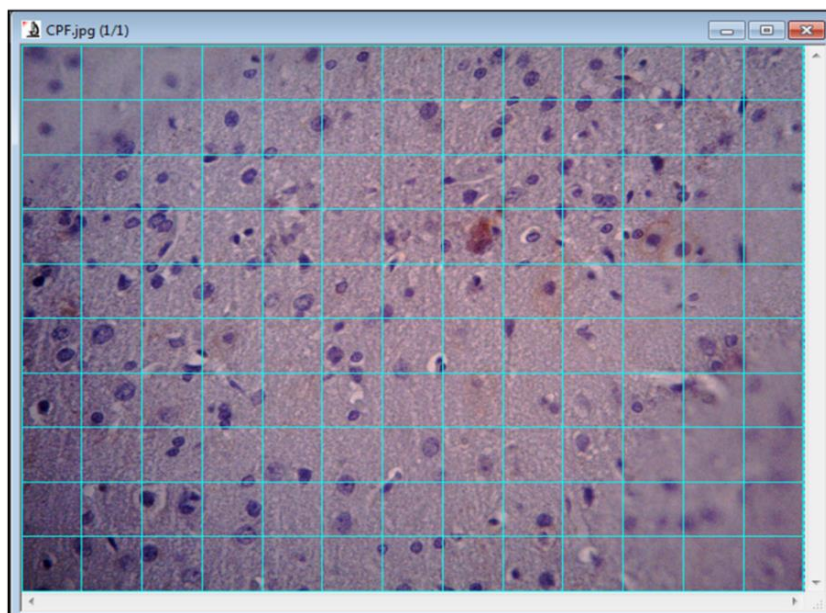


Figura 4 - Mensuração da marcação total no Córtex Pré-frontal no programa Image-Pro Plus.

Fonte: Dados de pesquisa.

5 RESULTADOS

5.1 Análise histológica do Hipocampo

Nossos resultados revelaram que fêmeas de *Rattus norvegicus* estressadas e desafiadas apresentaram um padrão citoarquitetônico variado dependendo do tratamento e houve diferenças em todos os parâmetros analisados. Na Figura 5 se observam as características individuais da citoarquitetura total do hipocampo de cada grupo na coloração Cresil Violeta analisados por microscopia óptica, descritos a continuação:

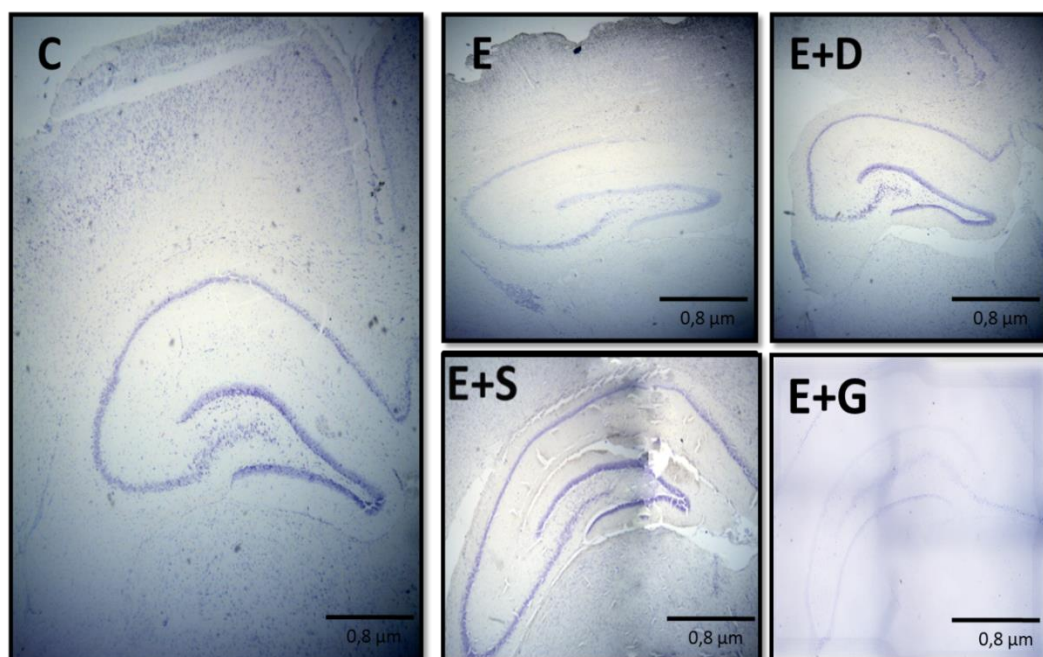


Figura 5 - Diferenciação citoarquitetônicas dos hipocampus em cada grupo. Observe-se a diminuição da viabilidade neuronal dos estratos piramidal e granular nos grupos estressados, especialmente no (E) e (E+G). Objetiva de 4X, Coloração Cresil Violeta.

Fonte: Dados de pesquisa.

Observou-se no grupo controle (C) um padrão de arquitetura homogêneo, com boa celularidade e presença de células hipercoreadas nas camadas piramidal e granular do hipocampo, sem presença de neurônios e astrócitos com características degenerativas (Figura 6).

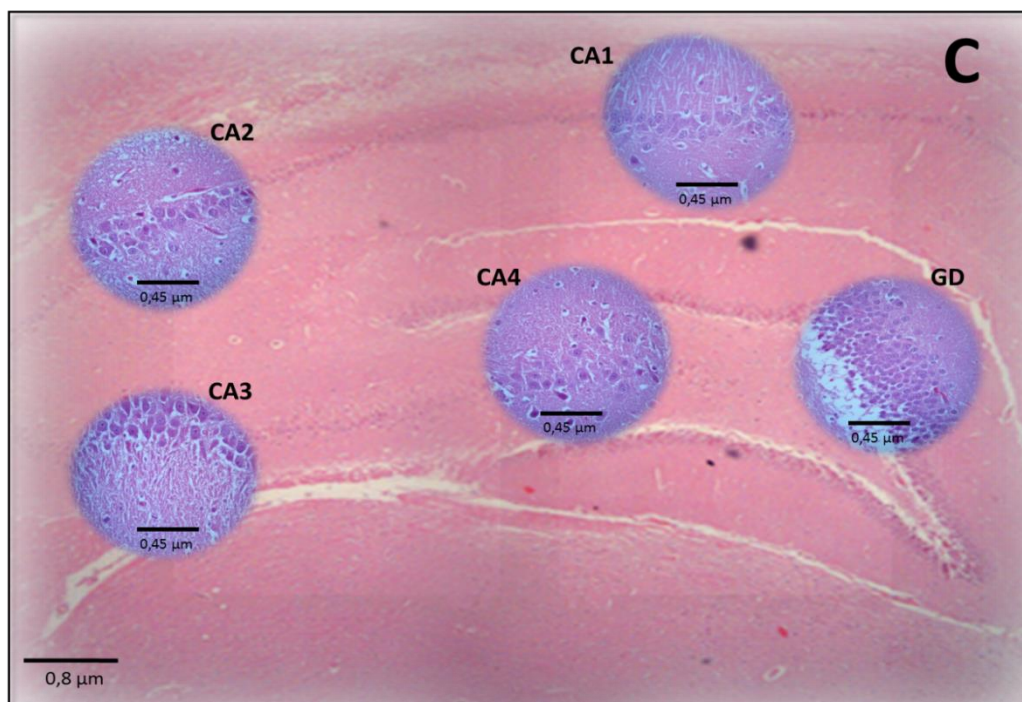


Figura 6 - Grupo C: Características celulares das regiões do hipocampo na rata controle (Coloração HeE); objetiva de 4X. CA1, CA2, CA3, CA4 e Giro denteado; objetiva de 40X.

Fonte: Dados de pesquisa.

Uma característica observada nos hipocampus dos grupos estressados, independente do tratamento aplicado foi uma maior dispersão entre as células dos estratos piramidal e granular em relação ao controle e que a espessura do estrato granular não muda.

O grupo estressado (E) apresentou de forma generalizada uma diminuição da viabilidade celular, morte neuronal, atrofia nas regiões CA4 e do GD e uma menor espessura do estrato piramidal.

Os grupos estressados com aplicação de saponina (E+D) e hormônio de crescimento (E+S) apresentaram aumento da viabilidade celular e melhora no padrão de arquitetura dos estratos piramidal e granular com uma maior espessura do estrato piramidal, sem presença de neurônios e astrócitos sugestivos de apoptose nem características degenerativas. O grupo E+D apresenta atrofia de CA1, CA3 e CA4 e aumento nas outras regiões. O grupo E+S apresenta uma hipertrofia celular nos estratos piramidal e granular com atrofia só na região CA1.

O grupo E+G apresenta aumento de todas as regiões do hipocampo, diminuição da viabilidade neuronal nos estratos piramidal e granular, neurônios e astrócitos com características degenerativas e com presença de morte celular especialmente nas regiões de CA1, CA3 e GD, como se pode observar na Figura 7.

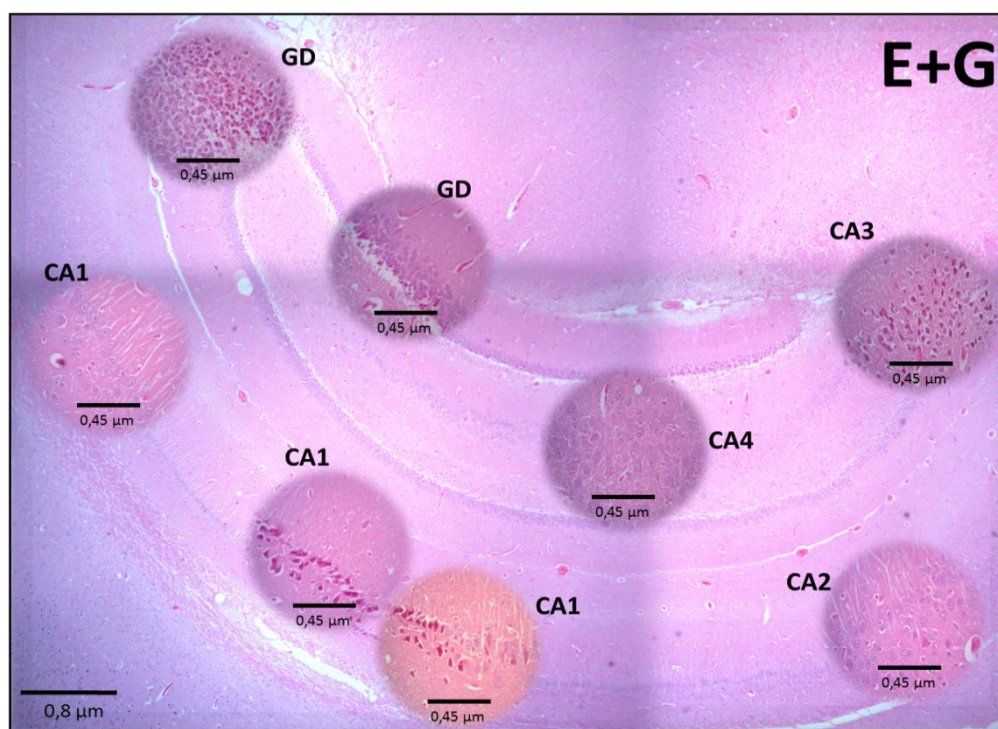


Figura 7 - Grupo V. Características celulares das regiões do hipocampo na rata estressada mais aplicação do glicocorticoide, Dexametasona, Observe-se a marcada morte neuronal especialmente em CA1 e CA3 e a dispersão celular nos estratos piramidal e granular (Coloração HeE); objetiva de 4X. CA1, CA2, CA3, CA4 e Giro denteado; objetiva de 40X.

Fonte: Dados de pesquisa.

5.2 Análise morfométrica do hipocampo

Ao se avaliar estatisticamente as respostas dos animais nos diferentes protocolos para cada região do hipocampo, observou-se que não houve efeito significativo para as variáveis entre grupos, em nível de significância $p > 0,05$. Somente mostrou-se significância maior ($p < 0,001$) entre as medidas de C e E+G nas regiões do GD, conforme os dados da Tabela 4.

Tabela 4. Análise de ANOVA que determina a diferença significativa entre as medidas das regiões de cada grupo em comparação com o Controle, indicando que o GD do grupo E+G é diferente.

C vs E				
Regioes	Difference	t	P value	Summary
CA1	114,41	0,67432	$P > 0.05$	ns
CA2	34,733	0,20472	$P > 0.05$	ns
CA3	80,413	0,47397	$P > 0.05$	ns
CA4	-20,157	0,11881	$P > 0.05$	ns
GD	-18,093	0,10664	$P > 0.05$	ns
C vs E+D				
Regioes	Difference	t	P value	Summary
CA1	1,0037	0,005916	$P > 0.05$	ns
CA2	28,992	0,17088	$P > 0.05$	ns
CA3	-24,007	0,1415	$P > 0.05$	ns
CA4	-14,408	0,08492	$P > 0.05$	ns
GD	66,479	0,39184	$P > 0.05$	ns
C vs E+S				
Regioes	Difference	t	P value	Summary
CA1	-8,0142	0,047237	$P > 0.05$	ns
CA2	24,006	0,1415	$P > 0.05$	ns
CA3	2,7162	0,01601	$P > 0.05$	ns
CA4	27,613	0,16275	$P > 0.05$	ns
GD	269,72	1,5898	$P > 0.05$	ns
C vs E+G				
Regioes	Difference	t	P value	Summary
CA1	123,1	0,72557	$P > 0.05$	ns
CA2	228,77	1,3484	$P > 0.05$	ns
CA3	250,89	1,4788	$P > 0.05$	ns
CA4	186,56	1,0996	$P > 0.05$	ns
GD	2168,4	12,781	$P < 0.001$	***

Fonte: Dados de pesquisa.

Analisando-se a interação dos tratamentos, as regiões dos grupos estressados que mais apresentam atrofia são a CA1, CA3 e CA4, isto pode ser observado a traves do Gráfico 1.

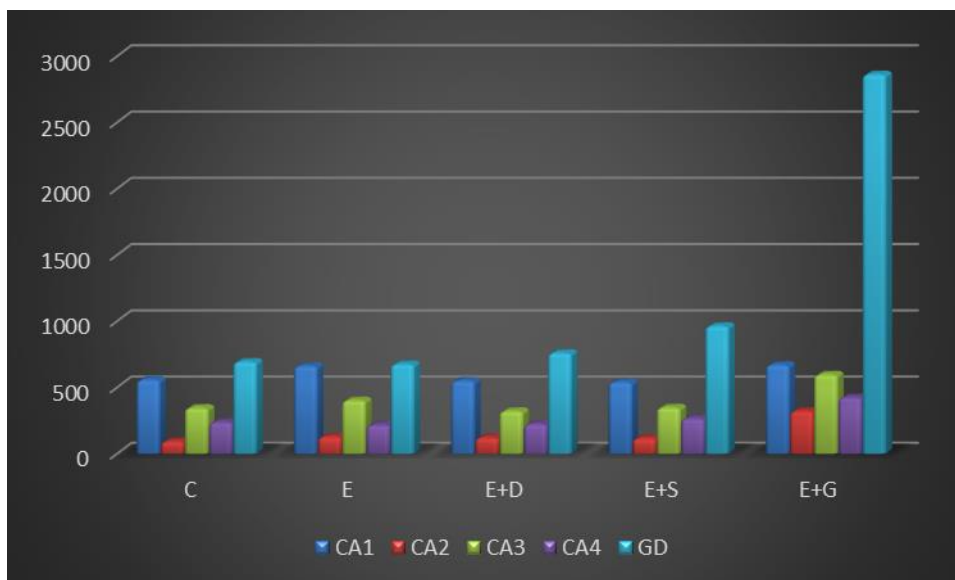


Gráfico 1 - Variações das porcentagens das regiões CA1, CA2, CA3, CA4 e GD de cada grupo. Observe-se a região GD do grupo E+G que apresentou diferencia significativa maior.

Fonte: Dados de pesquisa.

5.3 Análise histológica do córtex pré-frontal medial

No presente estudo mostra mudanças citológicas do CPFm que são semelhantes às apresentadas no histologia do hipocampo de cada grupo como resultado do estresse crônico, os grupos apresentam um padrão variado dependendo do tratamento aplicado.

As características das células piramidais do córtex pré-frontal medial em ratas controle apresentaram uma grande viabilidade neuronal e astrocitária com pouca dispersão das células nas camadas II e III, na Figura 8 podemos observar a característica celular normal do CPFm.

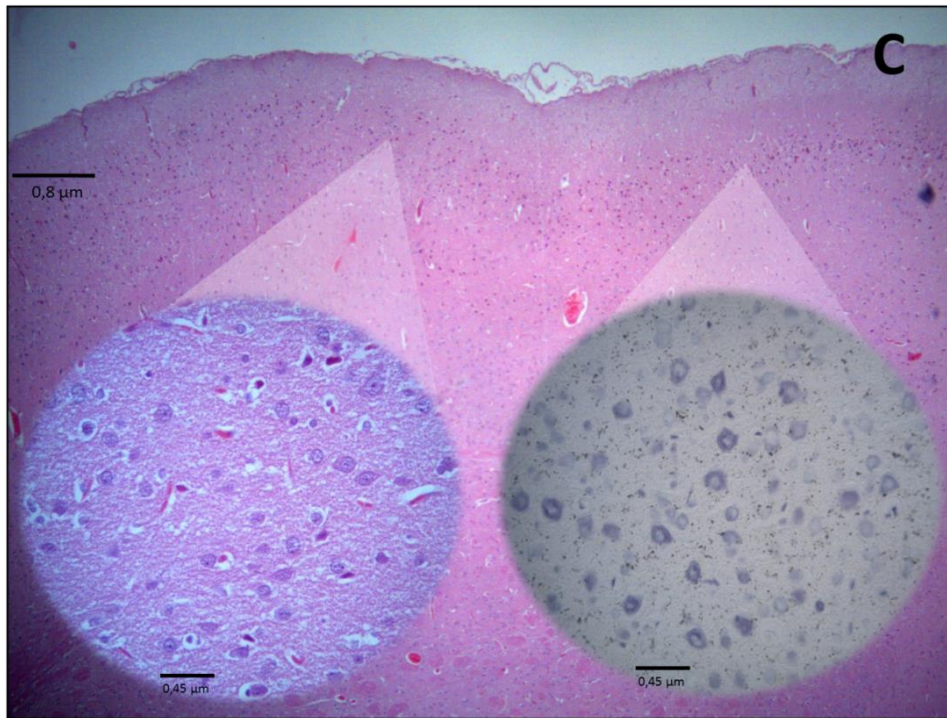


Figura 8 - Característica celular do Córtex pré-frontal (40X) do grupo Controle, na coloração HeE e aumento 4X na coloração de HeE e Cresil Violeta.

Fonte: Dados de pesquisa.

No grupo E observou-se uma menor viabilidade celular e uma maior dispersão celular, característica observada em todos os grupos estressados independentemente do tratamento aplicado.

O grupo E+D não apresentou diferenciação neuronal significativa e não se observou presença de características degenerativas celulares, mostrou um padrão similar ao grupo controle.

O grupo E+S apresentou uma hipertrofia neuronal com melhora na viabilidade e arquitetura celular sem presença de neurônios ou astrócitos com características sugestivas de apoptose.

As características dos grupos nomeados podem ser observadas na Figura 9 a continuação.

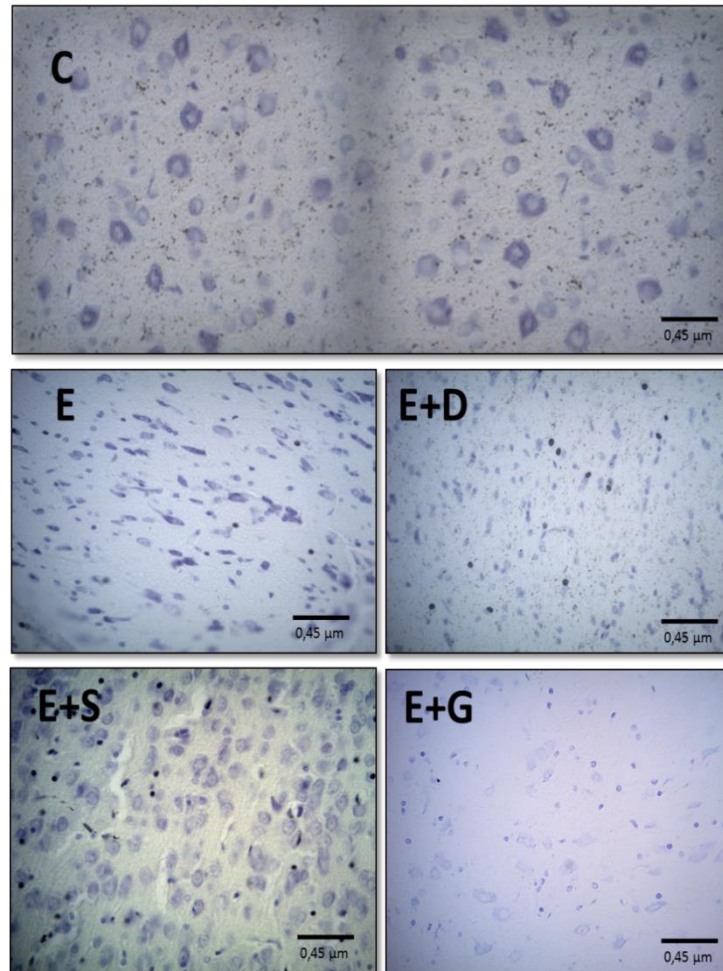


Figura 9 - Diferenciação da dispersão e morfologia neuronal no Córtex Pré-frontal medial nos grupos. Objetiva de 40X, Coloração Cresil Violeta.
Fonte: Dados de pesquisa.

No grupo E+G notou-se uma morte neuronal intensa das camadas celulares, além de maior dispersão e pouca viabilidade neuronal. Além disso, o tecido apresentou neurofagocitose no CPFm deste grupo comparado o grupo controle (Figura 10).

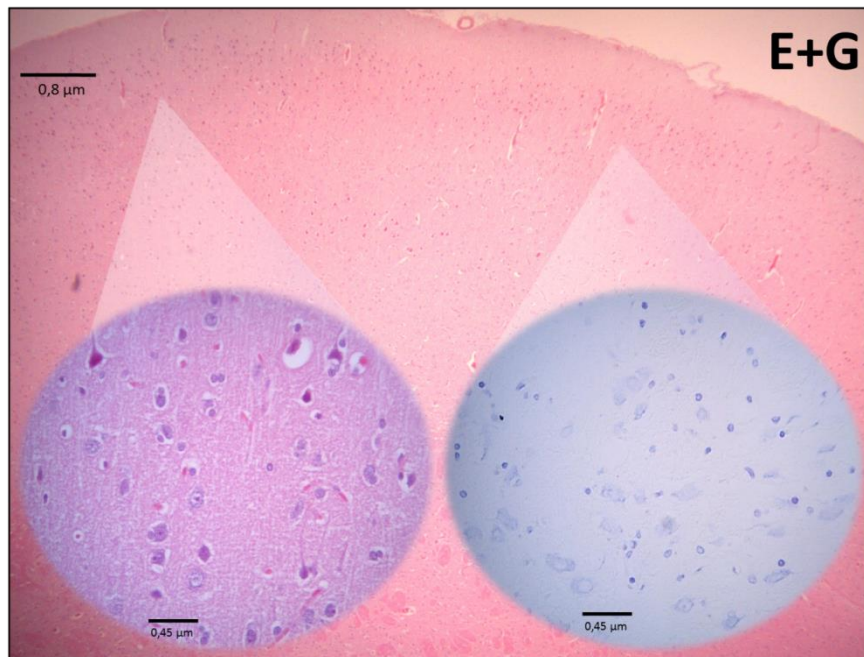


Figura 10 - Característica celular do Córtex pré-frontal medial (40X) do grupo E+G, na coloração HeE e aumento 4X na coloração de HeE e Cresil Violeta.

Fonte: Dados de pesquisa.

5.4 Análise Imunoistoquímica

5.4.1 Imunomarcção HSP 27

Nos resultados observou-se que para o HSP 27 no hipocampo, o grupo E+D apresentou uma marcação forte (++++), seguido do grupo E+G com boa marcação (+++) e depois os grupos C, E e E+S que apresentaram uma marcação discreta (++) , os resultados podem observar-se na Tabela 5. O hipocampo dos grupos C, E e E+S apresentaram uma marcação semelhante, com reação discreta (++) para o HSP 27, no citoplasma de neurônios piramidais, astrócitos e algumas células

endoteliais. Nestes grupos observou-se uma imunomarcaco nas áreas do hipocampo, dependendo do tratamento.

No grupo controle, apresentou-se imunomarcaco especialmente nas áreas CA3 e CA4. O grupo E apresentou mais imunomarcaco nas áreas CA1, CA4 e GD, enquanto o hipocampo do grupo E+S apresentou notável imunomarcaco nas áreas CA1 e CA3.

Os animais dos grupos E+D e E+G apresentaram imunomarcaco maior do que os outros grupos para o HSP 27 no citoplasma de astrócitos e neurônios piramidais, além no núcleo de algumas destas células. No grupo E+D a marcao foi forte (++++) especialmente na rea CA4 e no GD. Os animais do grupo E+G apresentaram imunomarcaco boa (+++) nas áreas CA3 e GD.

Tabela 5. Resultados da classificao da marcao e intensidade do HSP 27 no Hipocampo e Córtex pré-frontal medial dos grupos.

Hsp 27	C	E	E+D	E+S	E+G
HIPOCAMPO	++	++	++++	++	+++
CÓRTEX PRÉ-FRONTAL	++	++	++	++	+++

Fonte: Dados de pesquisa.

O CPFm de todos os grupos, mostraram uma marcao discreta (++) para o HSP 27 nas duas camadas analisadas, além do grupo E+G que apresentou uma marcao boa (+++) (Tabela 5). Como característica principal achada nas marcaoes apresentadas foi a expressão do HSP 27 na membrana celular dos astrócitos, além, da expressão no citoplasma destes e dos neurônios piramidais, na Figura 11 podemos observar a marcao de HSP 27 característica observada no CPFm.

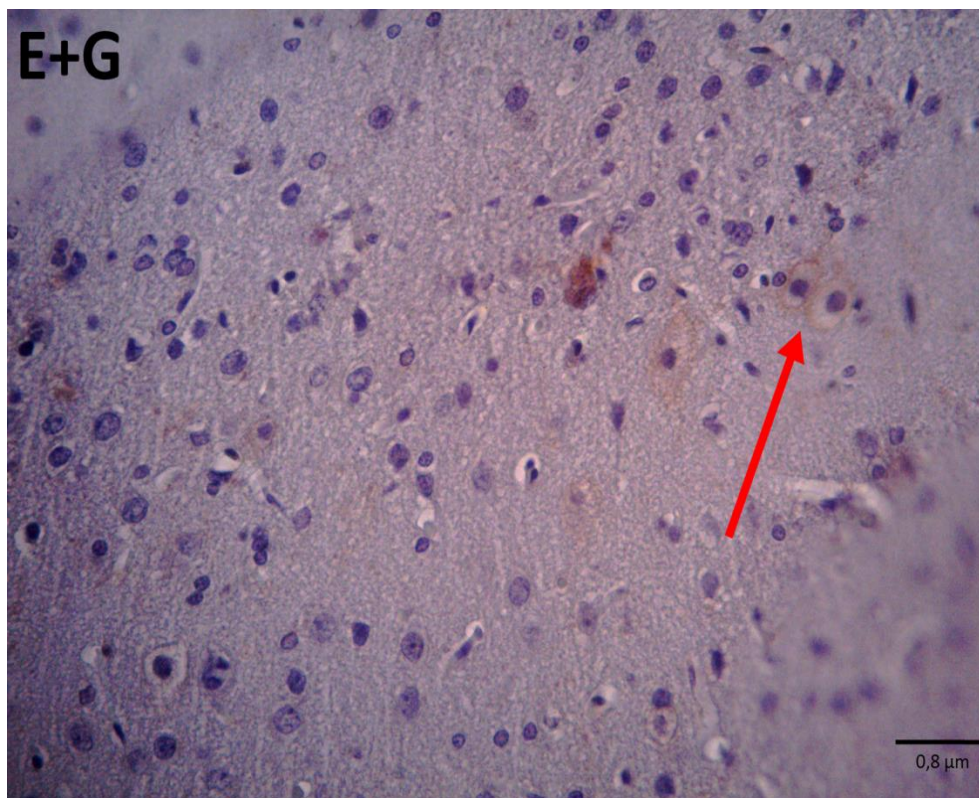


Figura 11 - Imunomarcção em córtex pré-frontal medial do grupo E+G, observe-se a marcação da membrana celular nos neurônios (seta). Objetiva de 4X, Coloração Cresil Violeta.

Fonte: Dados de pesquisa.

5.4.2 Imunomarcção HSP 90

O HSP 90 no hipocampo foi expresso em menor quantidade nos grupos. Apresentou-se uma imunomarcção rara (+) no citoplasma de astrócitos e neurônios piramidais das áreas CA4 e GD e ausente nas outras áreas do Corno de Ammon (CA1, CA2, CA3), além, do grupo tratamento E+S que apresentou uma marcação discreta (++) nas áreas CA1, CA4 e GD do hipocampo (Tabela 6).

Tabela 6. Resultados da classificação da marcação e intensidade do HSP 90 no Hipocampo e do Córtex pré-frontal medial dos grupos.

Hsp 90	C	E	E+D	E+S	E+G
HIPOCAMPO	+	+	+	++	+
CÓRTEX PRÉ-FRONTAL	-	-	+	++	-

Fonte: Dados de pesquisa.

A marcação geral do HSP 90 no CPFm foi ausente e muito rara em alguns dos grupos. Os grupos C, E e E+G não apresentaram marcação nenhuma, enquanto o grupo E+D apresentaram uma marcação rara (+) e o grupo E+S teve uma marcação discreta (++), expressando-se só no citoplasma de astrócitos (Tabela 6).

5.5 Análise de dados qualitativos

As características principais avaliadas nos cinco grupos foram: Peso (Inicial e Final), sinais clínicos e comportamento (ânsias de fuga).

- ✓ O peso de cada animal não excedeu a 20% da média do grupo que foi de 280g, no início do protocolo de estresse crônico moderado.
- ✓ O peso final dos animais não teve diferença significativa, a exceção do grupo E+G que apresentou uma média de 246g.
- ✓ Dentro dos sinais clínicos os grupos E e E+G, apresentaram pneumonia e conjuntivite, além de que o grupo E+G apresentou também queda de pelo (Figura 12).
- ✓ Todos os grupos apresentavam um comportamento de ansiedade na aplicação dos estressores, principalmente na imobilização.



Figura 12 - Queda de pelo em animais do grupo E+G.

Fonte: Dados de pesquisa.

6 Discussão

Os estrógenos produzem uma ampla gama de efeitos biológicos em todo o corpo, incluindo o SNC, no cérebro, além de atuar como agente neuroprotetor, os estrógenos desenvolvem um papel importante na regulação de processos neuronais (VEGA et al., 2012), vindo daí o nosso interesse em aplicar o modelo de estresse crônico só em fêmeas adultas. Por outro lado, os estrógenos tem um papel importante na indução de mudanças no nível da plasticidade neuronal e da neogênese no hipocampo adulto. Observou-se que os estrógenos regulam o desenvolvimento, a maturação e a sobrevivência dos novos neurônios no cérebro adulto, da mesma forma que atuam os antidepressivos. Os efeitos dos estrógenos sobre a neogênese e a plasticidade neuronal poderiam estar regulados pelos receptores a estrógenos, tanto o receptor alfa ($Re\alpha$), como o receptor beta ($Re\beta$). Os dois subtipos de receptores se expressam no hipocampo do cérebro adulto (VEGA et al., 2012).

O estresse crônico pode prejudicar as funções cognitivas, neuroendócrinas e emocionais que o hipocampo suporta: aprendizagem e memória declarativa e espacial, a regulação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, e o processamento dos aspectos contextuais e eventos emocionais (CONRAD, 2006), confirmando uma resposta PNEI neste estudo representada nas alterações evidentes tanto no cérebro como as observadas fisicamente nos animais tratados e submetidos ao estresse crônico moderado. Os grupos estressados no final do protocolo mostraram diminuição do peso corporal, pneumonia e conjuntivite; especificamente o grupo E+G apresentou queda de pelo; todos estes sinais clínicos são apresentados pela indução do estado de estresse crônico que produz lesões que resultam das alterações dos sistemas nervoso, imune e endócrino, nas quais se podem reverter dependendo do tempo de estresse (ALMIRÓN, 2009). No trabalho em questão não foram realizados testes cognitivos com o objetivo de avaliar parâmetros de aprendizagem ou memória. Estes parâmetros estão relacionados com a complexidade do cérebro pelo que tampouco foi analisado o peso do encéfalo.

O hipocampo regula representações episódicas de significado das emoções e interpretações dos eventos. O córtex pré-frontal permite antecipar e planificar o futuro, organiza temporalmente a conduta e o sentido da responsabilidade até o mesmo e os demais, estabelecendo a possibilidade de adaptar-se a um entorno social complexo (MOLINA et al., 2008).

Todos os animais apresentaram comportamento similar, nas primeiras imobilizações foram acompanhadas de um comportamento de ansiedade e os animais apresentavam ânsia de fuga. Segundo Sharp e La Regina (SHARP e LA REGINA, 1998) este comportamento deveria ter uma mudança e os animais tinham que se adaptar, mas neste estudo não foi percebida a capacidade de adaptação, devido a que a imobilização de um tempo de 20 minutos pode deprimir por feedback o eixo HPA e seus efeitos podem ser diferentes, em alguns casos as respostas parecem voltar aos valores normais, o que sugere um processo de adaptação só ao estado constante deste tipo de estresse, embora, seus efeitos se manifestam ao enfrentar aos estressores distintos posteriormente (CÁRDENAS-VILLALVAZO et al., 2010).

Os ratos submetidos a estresse social e emocional por longo tempo, como exemplo ao presenciar o que acontece com seu companheiro, a estimulação

sensorial que percebe o receptor procedente do que está recebendo o tipo de estresse, envolve diferentes sistemas sensoriais, como o auditivo (vocalizações), o olfativo (odores originários da mição e defecação) e também visual, ao olhar os brincos e tentativas de fugir do seu companheiro (MOLINA et al., 2008). Neste modelo de estresse crônico moderado destaca-se o sistema sensorial olfativo como presumível gerador do estresse social produzido pelos feromônios de alarme, ou seja, substâncias químicas que um indivíduo emissor secreta ao meio que o rodeia e que ao ser recebido pelo indivíduo receptor da mesma espécie gerando uma reação específica. Os feromônios de alarme são mensageiros químicos liberados num contexto de defesa e informam aos membros da mesma espécie que existe um perigo potencial; assim os indivíduos receptores se preparam para evitar o estímulo agressor (MOLINA et al., 2008). Estudos adicionais garantem que fatores sociais determinam a formação e manutenção do circuito neural associados à memória e cognição, causando atrofia hipocampal (WOSISKI-KUHH e STRANAHAN, 2012).

Em geral, as experiências que sejam prejudiciais como a exposição a estressores físicos ou sociais, reduzem a produção e sobrevivência de novos neurônios no GD (LANDFIELD et al., 2007), como foi observado neste trabalho nos grupos E e E+G a morte neuronal e diminuição da viabilidade celular nesta região, efeitos similares foram observados com aumentos nos níveis de corticosterona em ratos experimentais, sugerindo que o estresse reduz a neurogênese adulta, elevando os níveis de glicocorticoides (GLASPER et al., 2012). Embora no grupo E+G histológica e estatisticamente se apresente um aumento na região do GD, o qual pode estar associado à habilidade do processo neuronal para expandir-se, conectar-se ou formar novos neurônios para fazer conexões é dependente do meio ambiente extracelular em que a molécula *Poly-Sialic de adesão a neurônios* (PSA-NCAM) joga um papel principal, já que esta associada a regiões do cérebro que mostram plasticidade como a camada de células granulares internas do GD e as fibras musgosas terminais de CA3. O Estresse crônico durante 21 dias causa incremento da expressão de PSA-NCAM no GD, embora a supressão da proliferação celular tenha sido detida e estas mudanças desaparecem depois de 42 dias de tratamento (MERAZ e BAÑUELOS, 2009), em este estudo foi usado estresse crônico moderado durante 28 dias, explicando o aumento do GD no grupo E+G como diferença significativa.

Como já justificado na revisão bibliográfica, o estresse crônico e os glicocorticoides afetam a morfologia das regiões CA1, CA3 e do GD (MERAZ e BAÑUELOS, 2009), as alterações na região CA4 é devido a que possui um número maior de GR e à aplicação de diferentes estressores vão afetar mais esta área como, por exemplo, o calor (KRUEGER-NAUG et al., 2000). Em estudo similar a este, os grupos estressados apresentaram uma atrofia da região CA4 e as células da camada granular apresentavam-se mais dispersas em relação aos controles (FERREIRA, 2011), pelo que podemos deduzir em efeito que o protocolo de estresse crônico moderado utilizado afeta a morfologia destas regiões pela sua variedade de estressores.

Especificamente, ratos adultos expressam mais de duas vezes GH no seu hipocampo quando comparados com o hipocampo de juvenis, além disso, a expressão de GH é maior em mulheres do que homens e é particularmente sensível à presença de estrógenos, estes dados indicam que o GH no hipocampo é regulada pelas diferenças de sexo, e que estas diferenças são influenciadas pelo estrogênio e as mudanças que ocorrem para estabelecer a maturidade reprodutiva dos animais (DONAHUE et al., 2006). Os estrogênios também podem atuar como moduladores de processos relacionados com a plasticidade sináptica, o desenvolvimento neuronal e como reguladores de algumas funções cerebrais tais como a conduta, memória e cognição. O estradiol tem a capacidade de aumentar a proliferação celular no GD de roedores fêmeas adultas e de inibir a morte celular, assim como de induzir um incremento tanto na sinapse como no número de espinhos dendríticos nos neurônios do hipocampo (VEGA et al., 2012). O que ratifica neste trabalho que os estrogênios afetaram diretamente a ação a expressão do GH, causando uma hipertrofia celular e atuando como neuroprotetor ante o estresse crônico, comparando e corroborando, com outro trabalho similar a este (FERREIRA, 2011), que no estresse crônico as fêmeas senis tratadas com GH apresentaram melhora no padrão de arquitetura do GD e CA4, com maior espessura da camada granular.

O grupo E+D apresentou uma atrofia de CA1, CA3 e CA4, embora se mostrou uma melhora na citoarquitetura celular de todo o hipocampo, indicando que a saponina parece ser um fator neuroprotetor, esta ação pode ser feita pelo que as saponinas são moléculas com ação antiinflamatória, a qual é atribuída à inibição da enzima 11 β -hidróxi-esterol-desidrogenase, responsável pela inativação do cortisol

(conversão do cortisol à cortisona). A ausência congênita dessa enzima resulta na ação do cortisol como um potente mineralocorticoide (pseudoaldosteronismo). A inibição dessa enzima determina um aumento nos níveis de cortisol nos rins e em outros tecidos mineralocorticóides seletivos. Já que o cortisol, que ocorre em quantidades maiores do que a aldosterona, se liga com a mesma afinidade da aldosterona aos receptores mineralocorticóides, o resultado é um efeito hipermineralocorticóide do cortisol (SPARG et al., 2004). Segundo Ferreira (FERREIRA, 2011) os animais jovens e senis tratados com saponina no mesmo protocolo de estresse crônico moderado, apresentaram também atrofia na região CA4 e GD; se pode sugerir segundo estes resultados observados que para uma maior ação neuroprotetora da saponina deveria aumentarse sua dose e intervalo de aplicação.

No CPFm de animais experimentais, alterações morfológicas induzidas pelo estresse foram reveladas, que são comparáveis como às que foram vistas no hipocampo, com algumas diferenças significativas (CZÉH et al., 2007). Igualmente neste estudo se apresentaram alterações comparáveis entre o hipocampo e CPFm de cada grupo segundo o tratamento aplicado; a atrofia dos dendritos distais da camada II e III de neurônios piramidais pode ser um resultado a partir da perda de neurônios piramidais CA3 (WELLMAN, 2001), pelo que os neurônios das camadas II e III do CPFm (da área entorrinal) são a maior fonte de entrada cortical para todas as diferentes regiões do hipocampo. A camada II projeta seus axônios na região do GD e CA3, enquanto, a camada III distribui seus axônios em grande parte para a região CA1 e o subículo (ONO et al., 2009).

As HSP são secretadas como mediadores anti-inflamatórios que se ligam aos receptores de superfície e induz a produção de óxido nítrico, citocinas e outras moléculas imunoregulatorias (KALMAR e GREENSMITH, 2009), porém sua expressão é principalmente nas áreas que apresentam mais dano celular pelo estresse crônico neste trabalho.

A expressão da HSP27 no hipocampo é induzível especialmente em células da glia e limitadamente em neurônios estressados, além, tem um papel neuroprotetor no hipocampo (STETLER et al., 2009), como referido anteriormente o HSP27 se expressa, maiormente nas áreas mais afetadas pelos corticoides neste trabalho como são as áreas CA1, CA3, CA4 e GD, dependendo do tratamento

aplicado; se tem uma maior marcação nos grupos E+D e E+G inferindo que a HSP27 pode ser induzida naturalmente pelos glicocorticoides ou pela estimulação imunológica com saponina, pelo que as HSPs têm sido bem estudadas pelo seu papel na imunidade adaptativa em que parecem ajudar a potencializar esta resposta, pois a imunização de ratos com estes mesmo complexos podem induzir respostas de CD4, indicando que as HSP podem atuar também como adjuvantes (GIFFARD, 2008). É interessante notar que em trabalhos com diferentes tipos de estressores a expressão de HSP27 pode ser induzida em áreas comuns às apresentadas em nosso trabalho, como por exemplo, na hipertermia na qual foi observada aumento na área total do CA e GD (KRUEGER-NAUG et al., 2000), isquemia que se apresentou aumentada principalmente na área CA1 (NISHINO et al, 2004) e, convulsões, nas quais se apresentou a expressão aumentada em CA1, CA3 e CA4 (AKBAR et al, 2001); esta similitude é possível pelo desenho do protocolo de estresse crônico moderado aplicado aos animais do trabalho.

No CPFm se apresentou uma expressão constante nos grupos do deste estudo, pelo que a HSP27 no córtex pré-frontal mantém uma expressão basal, mais quando se apresenta uma queda de ATM-quinase a qual esta ligada as células baixo estresse, acontece uma expressão massiva de HSP27 induzível que protege os neurônios corticais da degeneração prevenindo a formação do apoptosoma, em diversas etapas do processo, o que poderia explicar as várias atividade protetoras exercidas pela proteína (STETLER et al., 2009), acreditando que o referido anteriormente seja a causa da marcação maior no grupo E+G.

O HSP 27 oferece proteção por meio de bloqueio dos radicais livres do oxigênio (ROS) gerados nas células e de algum modo à expressão de HSP 27 pode ser induzida antes que o dano neuronal, alguns sintomas neuropatológicos podem ser aliviados. Tal abordagem de fato, não é nova e tem sido proposta como um modelo para o tratamento das doenças causadas por seu defeito (MUCHOWSKI; WACKER, 2005).

A HSP90 teve uma expressão menor à HSP27, pelo que é uma proteína constitutiva, segundo Murphy (MURPHY et al., 2002) demonstraram que a expressão da proteína de choque térmico HSP 90 se reduz no hipocampo de ratos adultos e senis. Estes resultados confirmam marcação observada apenas no grupo

tratado com GH, porque ajuda a manter a plasticidade neuronal e a neogênese no hipocampo adulto, atuando também como neuroprotetor.

O HSP90 só se expressou no citoplasma de neurônios e astrócitos no hipocampo e o CPFm, conforme descrito na literatura é uma proteína essencial para a conexão do ligando e do transporte no núcleo de receptores esteroides GR (RAJAPANDI et al., 2000), a diminuição de HSP 90 pode reduzir a ligação de glicocorticoides aos receptores GR e sua translocação subsequente; no trabalho feito por Djordjevic et al (2009), os resultados indicaram que no estresse agudo, quando o corticoide encontra-se aumentado, o GR foi translocado para o núcleo de neurônios no hipocampo e CPF. Sob estresse crônico, quando o corticoide encontra-se baixo, semelhante ao nível do controle, o GR foi mantido no citoplasma do CPF e foi distribuído uniformemente nos compartimentos do hipocampo. Da mesma forma as proteínas do choque térmico (HSP 90) no hipocampo, parecem ser principalmente do tipo estresse-independente, enquanto que no CPF foi dependente do tipo de estresse; no CPFm se expressa só nos grupos E+D e E+S confirmando que a expressão de HSP90 dependeu da aplicação fatores dos neuroprotetores.

Com base nesses resultados, sugerimos que a presença constitutiva das proteínas (HSP 27 e 90), possa estar relacionada com os neuroesteroides, diferenciação e maturidade sexual, que pode ser estudada mais adiante.

7 CONCLUSÃO

As lesões de regiões do SNC neste estudo evidenciam a regulação do SI e do SE pelo cérebro.

Neste estudo houve alterações neuropatológicas na citoarquitetura hipocampal e do córtex pré-frontal medial nos animais sob estresse crônico moderado e no tratamento com glicocorticoide, demonstrando assim que o estresse isolado ou associado à corticoide foi capaz de causar destruição neuronal.

O tratamento com o hormônio de crescimento foi capaz de prevenir a degeneração neuronal.

O uso de saponina promove um efeito neuroprotetor nas áreas do hipocampo e do CPFm que foram afetadas pelo estresse crônico moderado.

A proteína de estresse HSP27 expressou-se melhor no hipocampo (CA3 e GD) e o córtex pré-frontal medial do grupo tratado com glicocorticoide.

A HSP90 no estresse crônico moderado em animais adultos não foi bem expressa como resultado da idade.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIRAV, I.; RICHTER-LEVIN, G. Mechanisms of amygdala modulation of hippocampal plasticity. **J Neurosci.** v. 22, p. 9912-9921, 2002.
- ALMIRÓN, M. R. (2009). Psiconeuroendocrinología del estrés. Conferencia Jornada de Neuroeducación. Buenos Aires, Argentina.
- ANDREOLLO, N. A.; DOS SANTOS, E. F.; ARAÚJO, M. R.; LOPES, L. R. RAT'S AGE VERSUS HUMAN'S AGE: WHAT IS THE RELATIONSHIP? **ANCD Arq Bras Cir Dig.** v. 25, p. 49 - 51, 2012.
- ARELLANO, J. I.; MUNOZ, A.; BALLESTEROS-YANEZ, I.; SOLA, R. G.; DEFELIPE, J. Histopathology and reorganization of chandelier cells in the human epileptic sclerotic hippocampus. **Brain.** v. 127, p. 45 - 64, 2004.
- BARAN, S.; ARMSTRONG, C.; NIREN, D.; HANNA, J.; CONRAD, C. Chronic stress and sex differences on the recall of fear conditioning and extinction. **Neurobiology of learning and memory.** v. 91, p. 323 - 332, 2009.
- BENARROCH, E. E. Heat shock proteins. **Neurology.** v. 76, p. 660 - 667, 2011.
- BILLARD, J. M. Ageing, hippocampal synaptic activity and magnesium. **Magnes. Res.** v. 19, p. 199 – 215, 2006.
- BORIN, C.; NATALI, M. ESTRESSE: SÍNDROME DOS TEMPOS MODERNOS. **Arq Mudi.** v. 10, p. 5 - 10, 2006.
- BRANDEN, C.; TOOZE, J. Introduction to protein structure. Published.2^a. p. 350 - 368, 1999.
- BRYNSKIKH, A.; WARREN, T.; ZHU, J.; KIPNIS, J. Adaptive immunity affects learning behavior in mice. **Brain Behav Immun.** v. 22, p. 861 - 869, 2008.
- BUCKLEY, T.; SCHATZBERG, A. On the Interactions of the Hypothalamic- Pituitary-Adrenal (HPA) Axis and Sleep: Normal HPA Axis Activity and Circadian Rhythm, Exemplary Sleep Disorders. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 90, p. 3106 - 3114, 2005.
- BURITICA, E.; PIMIENTA, H. J. Corteza frontopolar humana área 10. **Revista Latinoamericana de Psicología.** v. 39, p. 127 - 142, 2007.
- BURKE, S. N.; BARNES, C. A. Neural plasticity in the ageing brain. **Nat. Rev. Neurosci.** v. 7, p. 30 – 40, 2006.
- BUTOVSKY, O.; KORONYO-HAMAOU, M.; KUNIS, G.; OPHIR, E.; LANDA, G.; COHEN, H.; SCHWARTZ, M. Glatiramer acetate fights against Alzheimer's disease by inducing dendritic-like microglia expressing insulin-like growth factor 1. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 103, p. 11784 - 11789, 2006.
- BUTOVSKY, O.; TALPALAR, A.; BEN-YAAKOV, K.; SCHWARTZ, M. Activation of microglia by aggregated beta-amyloid or lipopolysaccharide impairs MHC-II expression and renders them cytotoxic whereas IFN-gamma and IL-4 render them protective. **Mol Cell Neurosci.** v. 29, p. 381 - 393, 2005.
- CAPLAN, A. What is a co-chaperone?. **Cell Stress Chaperones.** v. 8, p. 105 - 107, 2003.

- CÁRDENAS-VILLALVAZO, A.; LÓPEZ-ESPINOZA, A.; MARTÍNEZ, A. G.; FRANCO, K.; DÍAZ, F.; AGUILERA, V.; VALDEZ, E. Consumo de alimento, crecimiento y ansiedad, tras estrés por hacinamiento o aislamiento de ratas. **MEXICAN JOURNAL OF BEHAVIOR ANALYSIS**. v. 36, p. 129 - 142, 2010.
- CONDE, J. R.; STREIT, W. J. Microglia in the aging brain. **J. Neuropathol.** v. 65, p. 199 – 203, 2006.
- CONRAD, C. D. What is the functional significance of chronic stress induced CA3 dendritic retraction within the hippocampus? . **Behav. Cogn. Neurosci. Rev.** v. 5, p. 41 – 60, 2006.
- CURRIE, W.; ELLISON, J. A.; WHITE, R. F.; FAUERSTEIN, G. J.; WANG, X.; BARONE, F. C. Bening focal ischemic preconditioning induces neuronal HSP70 and prolonged astrogliosis with expression of HSP27. **Brain Res.** v. 863, p. 169-181, 2000.
- CZÉH, B.; MÜLLER-KEUKER, J. I.; RYGULA, R.; ABUMARIA, N.; HIEMKE, C.; DOMENICI, E.; FUCHS, E. Chronic social stress inhibits cell proliferation in the adult medial prefrontal cortex: hemispheric asymmetry and reversal by fluoxetine treatment. **Neuropsychopharmacology** v. 32, p. 1490 – 1503, 2007.
- DÍAZ, Y. EFFECTO PROTECTOR DE LOS ESTEROIDES NEUROACTIVOS PROGESTERONA Y DEHIDROEPIANDROSTERONA EN LA POBLACIÓN NEUROGLIAL DEL HIPOCAMPO DE RATAS MACHO ADULTAS, AFECTADAS POR EL HACINAMIENTO Y EL RUIDO. Doctorado, Universidad de Colima.2006.
- DONAHUE, C. P.; KOSIK, K. S.; SHORS, T. J. Growth hormone is produced within the hippocampus where it responds to age, sex, and stress. **PNAS.** v. 103, p. 6031 - 6036, 2005.
- DONAHUE, C. P.; KOSIK, K. S.; SHORS, T. J. Growth hormone is produced within the hippocampus where it respond to age, sex, and stress. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 103, p. 6031 - 3036, 2006.
- DUVERNOY, H. M. (2005). The Human Hippocampus Functional Anatomy, Vascularization and Serial Sections with MRI. New York, Springer-Verlag: 232.
- FEIGE, U.; POLLA, B. *Hsp70* - a multi-gene, multi-structure, multi-function family with potential clinical applications. **Experientia.** v. 50, p. 979 - 986, 1994.
- FERREIRA, A. P. B. Efeitos do estresse crônico sobre o timo e o hipocampo de ratos jovens e senis submetidos a desafio imunológico e tratamento com hormônios do crescimento (modelo experimental). Doutorado, Universidade Federal de Viçosa.2011.
- FRYDMAN, J. Folding of newly translated proteins in vivo: the role of molecular chaperones. **Annu Rev Biochem.** v. 70, p. 603 - 647, 2001.
- FULLER, K.; ISSELS, R.; SLOSMAN, D.; GUILLET, J.; SOUSSI, T.; POLLA, B. Cancer and the heat shock response. **Eur J Cancer.** v. 30A, p. 1884 - 1891, 1994.
- FUNAHASHI, S. Prefrontal cortex and working memory processes. **Neuroscience.** v. 39, p. 251 - 261, 2006.
- GAMARO, G.; MANOLI, L.; TORRES, I.; SILVEIRA, R.; DALMAZ, C. Effects of chronic variate stress on feeding behavior and on monoamine levels in different rat brain structures. **Neurochemistry International.** v. 42, p. 107 - 114, 2003.
- GARG, S.; BANERJEE, R.; KIPNIS, J. Neuroprotective immunity: T cell-derived glutamate endows astrocytes with a neuroprotective phenotype. **J Immunol.** v. 180, p. 3866 - 3873, 2008.

- GARRIDO, C.; BRUEY, J.; FROMENTIN, A.; HAMMANN, A.; ARRIGO, A.; SOLARY, E. HSP27 inhibits cytochrome c-dependent activation of procaspase-9. **FASEB J.** v. 13, p. 2061 - 2070, 1999.
- GLASPER, E. R.; SHOENFELD, T. J.; GOULD, E. Adult neurogenesis: Optimizing hippocampal function to suit the environment. **Behavioural Brain Research.** v. 227, p. 380 - 383, 2012.
- GOLDING, I.; COX, E. Protein synthesis molecule by molecule. **Genome Biol** v. 7, p. 221,221 - 221,223, 2006.
- GONZALEZ, A.; RAMOS, J.; MARQUEZ, E. La atención y sus alteraciones: del cerebro a la conducta. Published.1ª. p. 24 - 45, 67, 156 - 169, 2006.
- HEIJNEN, C. Who believes in communication. **Brain Behav Imm** v. 14, p. 2 - 9, 2000.
- HENDERSON, B.; NAIR, S.; COATES, A. Molecular chaperones and disease. **Inflamm Res.** v. 45, p. 155 - 158, 1996.
- HERMAN, J.; LARSON, B.; SPEERT, D.; SEASHOLTZ, A. Hypothalamo-pituitary-adrenocortical dysregulation in aging F344/Brown-Norway F1 hybrid rats. **Neurobiology of aging.** v. 22, p. 323 - 332, 2001.
- HOLMES, A.; WELLMAN, C. L. Stress-induced prefrontal reorganization and executive dysfunction in rodents. **Neurosci. Biobehav. Rev.** v. 33, p. 773 - 783, 2009.
- HÜBSCHLE, T.; MATHAI, M. L.; MCALLEN, R. M.; MCKINLEY, M. J.; OLDFIELD, B. J. Central efferent pathways controlling evaporative heat loss in the rat. **Proc. APPS.** v. 32, p. Suppl.1:61, 2001.
- HUNT, C.; MORIMOTO, R. Conserved features of eukaryotic *hsp70* genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human *hsp70*. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 82, p. 455 - 459, 1985.
- JOSEPH-BRAVO, P.; DE GORTARI, P. El estrés y sus efectos en el metabolismo y el aprendizaje. **Biotechnologia.** v. 14, p. 65 - 76, 2007.
- KALMAR, B.; GREENSMITH, L. Induction of heat shock proteins for protection against oxidative stress. **Advanced Drug Delivery Reviews.** v. 61, p. 310 - 318, 2009.
- KANG, S.; BROWN, D.; WHITEMAN, M.; LI, R.; PAN, T.; PERRY, G.; WISNIEWSKI, T.; SY, M.; WONG, B. Prion protein is ubiquitinated after developing protease resistance in the brains of scrapie-infected mice. **J Pathol.** v. 203, p. 603 - 608, 2004.
- KIM, H.; MORSE, D.; CHOI, A. Heat-shock proteins: new keys to the development of cytoprotective therapies. **Expert Opin Ther Targets.** v. 10, p. 759 - 769, 2006.
- KIPNIS, J.; MIZRAHI, T.; YOLEN, E.; BEN-NUN, A.; SCHWARTZ, M. Myelin specific Th1 cells are necessary for posttraumatic protective autoimmunity. **J. Neuroimmunol.** v. 130, p. 78 - 85, 2002.
- KORNITZER, D.; CIECHANOVER, A. Modes of regulation of ubiquitin-mediated protein degradation. **J Cell Physiol.** v. 182, p. 1 - 11, 2000.
- KRUEGER-NAUG, A. M.; HOPKINS, D. A.; ARMSTRONG, J. N.; PLUMIER, J. C.; CURRIE, R. W. Hyperthermic induction of the 27-kDa heat shock protein (Hsp27) in neuroglia and neurons of the rat central nervous system. **J Comp Neurol.** v. 428, p., 2000.

- LANDFIELD, P. W.; BLALOCK, E. M.; CHEN, K. C.; PORTER, N. M. A new glucocorticoid hypothesis of brain aging: implications for Alzheimer's disease. **Curr. Alzheimer Res.** v. 4, p. 205 – 212 2007.
- LATCHMAN, D. Hsp27 and cell survival in neurons. **Int J Hyperthermia.** v. 21, p. 393-402, 2005.
- LI, X. F.; MITCHELL, J. C.; WOOD, S.; COEN, C. W.; LIGHTMAN, S. L.; O'BYRNE, K. T. The effect of oestradiol and progesterone on hypoglycaemic stress-induced suppression of pulsatile luteinizing hormone release and corticotrophin-releasing hormone mRNA expression in the rat. **J. Neuroendocrinology.** v. 15, p. 468 - 476, 2003.
- LUCCA, G.; COMIM, C.; VALVASSORI, S.; RÉUS, G.; VUOLO, F.; PETRONILHO, F.; DAL-PIZZOL, F.; GAVIOLI, E.; QUEVEDO, J. Effects of chronic mild stress on the parameters in the rat brain. **Neurochemistry International.** v. 52, p. 358 - 362, 2009.
- LUNGA, P.; HERBERT, J. 17 β -oestradiol modulates glucocorticoid, neural and behavioural adaptations to repeated restraint stress in female rats. **J. Neuroendocrinology.** v. 16, p. 776 - 785, 2004.
- McGAUGH, J. L. Memory-a century of consolidation. **Neuroscience.** v. 287, p. 248-251, 2000.
- MERAZ, T.; BAÑUELOS, J. Efecto del Estrés crónico sobre la remodelación dendrítica en la región CA3 del hipocampo. **eGnosis.** v. 7, p., 2009.
- MERAZ, T.; BAÑUELOS, J. Efecto del Estrés crónico sobre la remodelación dendrítica en la región CA3 del hipocampo. **e-Gnosis.** v. 7, p., 2009.
- MINOWADA, G.; WELCH, W. Clinical implications of the stress response. **J Clin Invest.** v. 95, p. 3 - 12, 1995.
- MITCHELL, J. C.; LI, X. F.; BREEN, L.; THALABARD, J. C.; O'BYRNE, K. T. The role of the locus coeruleus in corticotropin- releasing hormone and stress-induced suppression of pulsatile luteinizing hormone secretion in the female rat. **Endocrinology.** v. 146, p. 323 - 331, 2005.
- MOLINA, T.; GUTIÉRREZ, A.; HERNÁNDEZ, L.; CONTRERAS, C. Estrés psicosocial: Algunos aspectos clínicos y experimentales. **Anales de psicología.** v. 24, p. 353 - 360, 2008.
- MORAN, D.; ELI-BERCHOER, L.; HELED, Y.; MENDEL, L.; SCHOCINA, M.; HOROWITZ, M. Heat intolerance: does gene transcription contribute?. **J Appl Physiol.** v. 100, p. 1370 - 1376, 2005.
- MURPHY, E. K.; SPENCER, R. L.; SIPE, K. J.; HERMAN, J. P. Decrements in nuclear glucocorticoid receptor (GR) protein levels and DNA binding in aged rat hippocampus. **Endocrinology** v. 143, p. 1362–1370, 2002.
- ONO, T.; ZAHM, D. S.; ROBINSON, F. R. (2009). Entorhinal Area (Cortex). Encyclopedia of Neuroscience. M. D. BINDER, H. NOBUTAKA and U. WINDHORST. German, Springer: 1194.
- PANDEY, P.; SALEH, A.; NAKAZAWA, A.; KUMAR, S.; SRINIVASULA, S.; KUMAR, V.; WEICHSELBAUM, R.; NALIN, C.; ALNEMRI, E.; KUFE, D.; KHARBANDA, S. Negative regulation of cytochrome c-mediated oligomerization of Apaf-1 and activation of procaspase-9 by heat shock protein 90. **EMBO J.** v. 19, p. 4310 - 4322, 2000.
- Paus, R.; Theoharides, T.; Arck, P. Neuroimmunoendocrine circuitry of the 'brain-skin connection'. **TRENDS in Immunology.** v. 27, p. 32 - 39, 2006.

- PAVÓN, L.; HERNÁNDEZ, M. E.; SALINAS, F. L.; SANDOVAL, G. INTERACCIONES NEUROENDOCRINOINMUNOLÓGICAS. **Salud Mental**. v. 27, p. 19 - 25, 2004.
- PRODROMOU, C.; SILIGARDI, G.; O'BRIEN, R.; WOOLFSON, D.; REGAN, L.; PANARETOU, B.; LADBURY, J.; PIPER, P.; PEARL, L. Regulation of Hsp90 ATPase activity by tetratricopeptide repeat (TPR)-domain cochaperones. **EMBO J**. v. 18, p. 754 - 762, 1999.
- PRUSINER, S. Prions. **Proc Natl Acad Sci USA**. v. 95, p. 13363 - 13383, 1998.
- PUIG, M. V.; ARTIGAS, F.; CELADA, P. Modulation of the activity of pyramidal neurons in rat prefrontal cortex by raphe stimulation in vivo: involvement of serotonin and GABA. **Cereb Cortex**. v. 15, p. 1 - 14, 2005.
- RAISON, C. L.; MILLER, A. H. The neuroimmunology of stress and depression. **Semin Clin Neuropsychiatry**. v. 6, p. 277 - 294, 2001.
- RAJAPANDI, T.; GREENE, L. E.; EISENBERG, E. The molecular chaperones Hsp90 and Hsc70 are both necessary and sufficient to activate hormone binding by glucocorticoid receptor. **J Biol Chem**. v. 275, p. 22597 - 22604, 2000.
- RON-HAREL, N.; SEGEV, Y.; LEWITUS, G. M.; CARDON, M.; ZIV, Y.; NETANELY, D.; JACOB-HIRSCH, J.; AMARIGLIO, N.; RECHAVI, G.; DOMANY, E.; SCHWARTZ, M. Age-dependent spatial memory loss can be partially restored by immune activation. **Rejuvenation Res**. v. 11, p. 903 - 913, 2008.
- SCHWARTZ, M.; ZIV, Y. Immunity to self and selfmaintenance: a unified theory of brain pathologies. **Trends Immunol**. v. 29, p. 211 - 219, 2008.
- SHARP, P. E.; LA REGINA, M. C. (1998). The laboratory rat. New York: CRC Press.
- SHECHTER, R.; al., e. Myeloid derived cells in the recovery from spinal cord injury. **Annual meeting Society For Neuroscience**. v., p., 2008.
- SHOENFELD, T. J.; GOULD, E. Stress, stress hormones, and adult neurogenesis. **Experimental Neurology**. v. 233, p. 12 - 21, 2012.
- SIMARD, A.; SOULET, D.; GOWING, G.; JULIEN, J.; RIVEST, S. Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. **Neuron**. v. 49, p. 489 - 502, 2006.
- SNYDER, J. S.; KEE, N.; WOJTOWICZ, J. M. Effects of adult neurogenesis on synaptic plasticity in the rat dentate gyrus. **J Neurophysiol**. v. 85, p. 2423 - 2431, 2001.
- SOLOMON, G. Psiconeuroinmunología: sinopsis de su historia, evidencias y consecuencias. **Segundo congreso virtual de psiquiatría, Interpsiquis** v. Mesa Redonda: Psicósomática, p. 1 Fevereiro - 7 Março, 2001.
- SPARG, S. G.; LIGTH, M. E.; VAN STADEN, J. Biological activities and distribution of plants saponins. **J Ethnopharmacology**. v., p. 219 - 243, 2004.
- SQUIRE, L. R.; SCHACTER, D. L. (2002). The Neuropsychology of Memory. L. R. SQUIRE and D. L. SCHACTER. New York, Guilford Press: 6 - 10.
- STEFANSKI, V. Social stress in laboratory rats: hormonal responses and immune cell distribution. **Psychoneuroendocrinology**. v. 25, p. 389 - 406, 2000.

- STETLER, R.; SIGNORE, A.; GAO, Y.; CAO, G.; CHEN, J. HSP27: Mechanisms of Cellular Protection Against Neuronal Injury. **Curr Mol Med.** v. 9, p. 863 - 872, 2009.
- STETLER, R. A.; SIGNORE, A. P.; GAO, Y.; CAO, G.; CHEN, J. HSP27: Mechanisms of Cellular Protection Against Neuronal Injury. **Curr Mol Med.** v. 9, p. 863 - 872, 2009.
- VAN PRAAG, H.; SCHINDER, A. F.; CHISTIE, B.; TONI, N.; PALMER, T. D.; GAGE, F. H. Functional neurogenesis in the adult hippocampus. **Nature** v. 415, p. 1030 - 1035, 2002.
- VEGA, N. M.; FERNÁNDEZ, J. A.; RAMÍREZ, G. B.; CASTRO, M.; ESTRADA, E. Regulación de la neurogénesis hipocámpica por los estrógenos: su relación con la depresión. v. 35, p. 527 - 533, 2012.
- VIENGCHAREUN, S.; LE MENUET, D.; MARTINERIE, L.; MUNIER, M.; PASCUAL-LE TALLEC, L.; LOMBÈS, M. The mineralocorticoid receptor: insights into its molecular and (patho) physiological biology. **Nucl Recept Signal.** v. 5, p. 1 - 16, 2007.
- VILLANUEVA, L. E.; HERNÁNDEZ, M. E.; GRANADOS, I.; ÁLVAREZ, L.; PÉREZ, S. M.; PAVÓN, L. Los efectos conductuales modulados por las citocinas. **Salud Mental.** v. 35, p. 411 - 418, 2012.
- WAPPLER, E.; SZILÁGYI, G.; GÁL, A.; SKOPÁL, J.; NYAKAS, C.; NAGY, Z.; FELSZEGHY, K. Adopted cognitive test for gerbils: Validation by studying ageing and ischemia. **Physiology and Behavior.** v. 97, p. 107 - 114, 2009.
- WELLMAN, C. L. Dendritic Reorganization in Pyramidal Neurons in Medial Prefrontal Cortex after Chronic Corticosterone Administration. **J Neurobiol.** v. 49, p. 245 – 253 2001.
- WOSISKI-KUHH, M.; STRANAHAN, A. M. Opposing effects of positive and negative stress on hippocampal plasticity over the lifespan. **Ageing Research Reviews.** v. 11, p. 399 - 403, 2012.
- WYNN, R.; DAVIE, J.; COX, R.; CHUANG, D. Molecular chaperones: heat-shock proteins, foldases and matchmakers. **J Lab Clin Med.** v. 124, p. 31 - 36, 1994.
- YON, J. Protein folding: concepts and perspectives. . **Cell Mol Life Sci.** v. 53, p. 557 - 567, 1997.
- ZHANG, X.; BEURON, F.; FREEMONT, P. Machinery of protein folding and unfolding. **Curr Opin Struct Biol.** v. 12, p. 231 - 238, 2002.
- ZIV, Y.; RON, N.; BUTOVSKY, O.; LANDA, G.; SUDAI, E.; GREENBERG, N.; COHEN, H.; KIPNIS, J.; SCHWARTZ, M. Immune cells contribute to the maintenance of neurogenesis and spatial learning abilities in adulthood. . **Nat. Neurosci.** v. 9, p. 268 – 275, 2006.