

ANNA PAULA BAPTISTA RIBEIRO FERREIRA

**EFEITOS DO ESTRESSE CRÔNICO SOBRE O TIMO E O HIPOCAMPO DE
RATOS JOVENS E SENIS SUBMETIDOS A DESAFIO IMUNOLÓGICO
E TRATAMENTO COM HORMÔNIO DO CRESCIMENTO
(MODELO EXPERIMENTAL)**

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

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2011

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

T

F383e
2011

Ferreira, Anna Paula Baptista Ribeiro, 1967-

Efeitos do estresse crônico sobre o timo e o hipocampo de ratos jovens e senis submetidos a desafio imunológico e tratamento com hormônio do crescimento (modelo experimental) / Anna Paula Baptista Ribeiro Ferreira.

– Viçosa, MG, 2011.

xxi, 144f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Marlene Isabela Vargas Vilorio.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa.

Inclui bibliografia.

1. Rato como animal de laboratório. 2. Histologia. 3. Timo.
4. Sistema nervoso. 5. Sistema imunológico.
6. Fisiopatologia. 7. Imunohistoquímica. I. Universidade
Federal de Viçosa. II. Título.

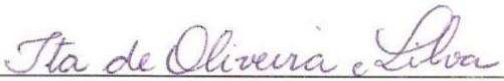
CDD 22. ed. 636.9352

ANNA PAULA BAPTISTA RIBEIRO FERREIRA

**EFEITOS DO ESTRESSE CRÔNICO SOBRE O TIMO E O HIPOCAMPO DE
RATOS JOVENS E SENIS SUBMETIDOS A DESAFIO IMUNOLÓGICO
E TRATAMENTO COM HORMÔNIO DO CRESCIMENTO
(MODELO EXPERIMENTAL)**

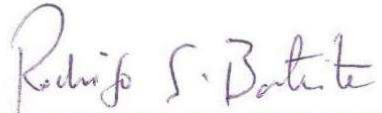
Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

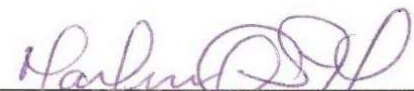
APROVADA: 10 de junho de 2011.


Ita de Oliveira e Silva
(Coorientadora)


Adelina Martha dos Reis


Luiz Alberto Santana


Rodrigo Siqueira Batista


Marlene Isabel Vargas Vilorio
(Orientadora)

A Deus, minha luz e orientação.
Aos meus amados pais, pelo exemplo de amor incondicional.
Aos meus filhos, minha razão de viver.
Ao Adilson, por tudo que vivemos e ainda viveremos.

“Sustento que a religiosidade cósmica é a fonte mais forte e mais nobre da pesquisa científica. Só quem pode avaliar os esforços enormes e, sobretudo, o devotamento, sem o qual as criações científicas que abrem novos caminhos não poderiam ser realizadas, está em condições de apreciar a força do sentimento que, sozinho, pôde dar nascimento a um tal trabalho, desligado da vida prática imediata. Em nossa época materialista, os trabalhadores científicos sérios são os únicos homens que se conservam profundamente religiosos. Não posso conceber um cientista sem uma fé profunda. A ciência sem religião é manca, e religião sem ciência é cega.”

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

Um trabalho científico é acompanhado de episódios de empolgação, sucessos, perspectivas, mas também de decepções, fracassos, desânimo. Tudo é sempre fruto de muito, mas muito esforço e dedicação. Às vezes, nos deixamos ser tomados pela incompreensão e perdemos a noção do todo, nos atendo somente ao negativismo dos resultados.

Mas aí chega o momento de concluir o que foi feito durante muitos anos de dedicação e é então que fazemos uma retrospectiva metodológica e emocional do “experimento de tese”.

Em meio ao cansaço, mágoas, momentos de ira, alegrias imensas e muitas vitórias, o que precisamos mesmo é agradecer. A gente nunca sabe por onde começar e é imediatamente inundado por um turbilhão de emoções. E como tudo tem um início, começo a agradecer pela Fé, esta que me impulsiona a cada dia, seja em Deus, na ciência, na vida, na família, no amor, no trabalho. Devo agradecer até mesmo os momentos em que a perdi e, sinceramente acreditei que era o fim.

Mas sendo privilegiada pela sólida estrutura da minha família, tudo se torna possível. Meus indescritíveis pais, Vera e Roberto, que com um amor imensurável apóiam, estimulam, permitem que eu siga este caminho. Meus filhos, Tiago, Tomaz e Lucas, únicos no amor, nas personalidades firmes, mas acima de tudo capazes de compreender os longos momentos de ausência e acreditar que eu nunca estive longe, nem por um momento. Adilson, meu

“marido-amigo” que com amor e firmeza nunca me deixou desistir e sim me proporciona a possibilidade de sonhar cada vez mais. É para vocês o meu mais profundo amor.

Minha “estrela-guia”, que esteja onde estiver, nunca deixou de me iluminar...

Meus orientadores, professores Marlene e Patarroyo, que vão muito além da orientação acadêmica e me concederam lições de vida, nestes muitos anos de convivência.

À Universidade Federal de Viçosa, casa que me acolhe a sete anos da qual me considero filha. A todos os professores com que tive a oportunidade de conviver e aprender.

À professora Ita Silva, pela competente coorientação. Aos professores Luiz Alberto Santana e Rodrigo Siqueira Batista, pelas valiosas considerações durante a qualificação.

Aos funcionários do Departamento de Veterinária: Sr. Adão, pelos longos meses de cuidados com os animais; Cláudio, Adão, Geraldinho, Beth, Lucinda e tantos outros, não menos importantes e muito queridos. Mas não tão especiais como a Rose, meu anjo da guarda, para quem as palavras ficam aquém da minha gratidão.

Aos colegas com quem convivi durante todos estes anos e àqueles que se fizeram amigos.

Ao Fabrício, com quem dividi o experimento e uma preciosa amizade. Você merece meu respeito.

À Universidade Federal de Minas Gerais, da qual sou filha orgulhosa. À professora Adelina Martha dos Reis, pelo apoio e incentivo, me proporcionando desfrutar um pouco de seu inegável conhecimento. Aos professores Cândido Coimbra e Anílton Vasconcelos, pelos bons conselhos, sempre.

À Luciana Firmes, pela ajuda nas coletas. A Leonardo (“Leo”), pela colaboração nas análises.

À Capes, pelo apoio financeiro e por proporcionar a oportunidade de participar do Programa de Doutorado no País com Estágio no Exterior (PDEE).

Ao Laboratório de Imunologia do Departamento de Patologia Experimental da Università di Bologna – Itália, na figura ímpar do grande

professor Claudio Franceschi – “Il proff”, cujos ensinamentos vão muito além da ciência. Merecedor de todo o respeito como referência mundial de senilidade.

Aos colegas e amigos italianos, que me acolheram com carinho e alegria: Stefano Salvioli, Mirian Capri, Stella Lucca, Maria Conte, Maria Scurti, Catia Lazarini, Laura Bucci, Morena, Paolo Tieri, Elena Bellavista e muito, mas muito especialmente a Aurélia Santoro, minha “irmã italiana”. Todos são exemplos de que a pesquisa deve ser levada com seriedade e prazer. Agradeço os conselhos, as orientações, as ponderações, mas também os passeios, os jantares, a paciência com meu “italianês” inicial e todo o carinho. Esta é “veramente la terra dove si poi mangiare, pregare e amare in abbastanza”!

Ao CNPq, pelo financiamento do projeto científico.

Aos animais do experimento, que deram a vida pela ciência, meu respeito, gratidão e emoção.

À Universidade Federal de Ouro Preto, por ceder alguns animais para o projeto piloto e pelas análises de citometria de fluxo.

Muito especialmente à minha grande amiga Andréa Badaró! Temos dividido nossas vitórias já por muitos anos e ainda seguiremos unidas por este firme laço que atamos.

À minha querida Ita, “amiga-irmã”, como ela mesma se denominou, com quem divido grandes paixões – os cães, a pesquisa, as artes, e agora os filhos!

Ao meu futuro grande pesquisador Tiago que, além de fundamental nas coletas do material da pesquisa, é fundamental na minha vida. Difícil é te descrever, meu filho!

Ao Roniê, pelas análises estatísticas, mas, acima de tudo, pela paciência e pela disponibilidade.

Aos tios e primos, amigos tão preciosos!

Agradeço a todos que passaram pela minha trajetória. Mesmo aqueles, que não acreditaram em mim ou que dificultaram meu caminho. Estejam certos: contribuíram para que eu me tornasse uma pessoa melhor.

Nessas horas é que eu vejo o quanto sou feliz. Agradeço de todo meu coração, mas também peço: que Deus ilumine e pague a todos vocês.

Fé, gratidão e determinação. Estes sim são meus pilares pesquisa e de vida.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	xii
LISTA DE FIGURAS	xiv
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	xvi
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xx
APRESENTAÇÃO.....	1
CAPÍTULO 1	2
1. INTRODUÇÃO	3
2. O ESTRESSE	4
2.1. Fisiopatologia do estresse	4
2.2. O estresse sobre a imunidade	8
3. O SISTEMA NERVOSO.....	10
3.1. Interações entre os sistemas nervoso e imunológico	12
3.2. O estresse sobre o sistema nervoso.....	14
4. O ENVELHECIMENTO	16
4.1. O estresse no indivíduo senil.....	19
4.2. O sistema nervoso do indivíduo senil	21

4.3. O sistema imune do indivíduo senil	22
4.4. Efeitos do estresse sobre o sistema nervoso do indivíduo senil	25
5. O TIMO	27
6. DIFERENÇAS ENTRE GÊNEROS	33
6.1. O dimorfismo sexual no sistema imunológico e na senilidade	33
6.2. O dimorfismo sexual no sistema nervoso e na senilidade	35
7. CONCLUSÃO	36
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
CAPÍTULO 2	47
1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	47
2. OS ANIMAIS	48
3. OS ESTRESSORES	49
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
CAPÍTULO 3	54
1. INTRODUÇÃO	55
2. METODOLOGIA	56
2.1. Os animais	56
2.2. Delineamento experimental	57
2.3. Coleta de material	57
2.4. Análise histológica e morfométrica do timo	58
2.5. Análise estatística	59
3. RESULTADOS	60
3.1. Avaliação histológica do timo	60
3.2. Morfometria do timo	64
4. DISCUSSÃO	69
4.1. Histomorfometria do timo	70
5. CONCLUSÃO	75

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
CAPÍTULO 4	81
1. INTRODUÇÃO	82
2. METODOLOGIA	83
2.1. Os animais	83
2.2. Ensaio hormonal	84
2.3. Análise estatística	84
3. RESULTADOS	85
4. DISCUSSÃO	89
5. CONCLUSÃO	94
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
CAPÍTULO 5	98
1. INTRODUÇÃO	99
2. PROTEASOMA – IMUNOPROTEASOMA.....	100
3. O PROTEASOMA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL E NO ENVELHECIMENTO.....	106
4. CONSIDERAÇÕES.....	109
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109
CAPÍTULO 6	113
1. INTRODUÇÃO	114
2. MATERIAL E MÉTODOS	116
2.1. Os animais	116
2.2. Protocolo experimental	116
2.3. Amostras cerebrais	117
2.4. Análises histológicas do hipocampo	117
2.5. Morfometria do hipocampo	117
2.6. Imunohistoquímica para expressão de imunoproteasomas.....	118
3. RESULTADOS	119

3.1. Peso do encéfalo	119
3.2. Histologia do hipocampo.....	121
3.3. Análise morfométrica	123
3.4. Imunohistoquímica para imunoproteasomas	125
4. DISCUSSÃO	130
4.1. Histomorfometria do hipocampo	131
4.2. Imunoproteasoma	136
5. CONCLUSÃO	138
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	139

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Tabela 1 - Distribuição dos grupos submetidos ao protocolo de estresse crônico moderado	51
---	----

CAPÍTULO 3

Tabela 1 - Nível de significância das camadas tímicas em função das variáveis analisadas e suas interações	65
Tabela 2 - Variações dos níveis das camadas cortical e medular e do tecido não linfóide (TNL) em função dos protocolos	66
Tabela 3 - Variações das percentagens de tecido tímico nas interações idade x protocolo, com influência do sexo	67

CAPÍTULO 4

Tabela 1 - Variações dos níveis de esteróides sexuais em função dos protocolos	87
Tabela 2 - Nível de significância dos esteróides sexuais em função das variáveis analisadas e suas interações	87

CAPÍTULO 6

Tabela 1 - Nível de significância do peso do encéfalo em função das variáveis analisadas e suas interações	119
--	-----

Tabela 2 -	Variações do peso do encéfalo em função dos protocolos .	120
Tabela 3 -	Variações dos pesos do encéfalo nas interações idade x protocolo, com influência do sexo	120
Tabela 4 -	Nível de significância da camada granular e da região CA4 em função das variáveis analisadas e suas interações	124
Tabela 5 -	Variações das percentagens da camada granular e região CA4 nas interações idade x protocolo, com influência do sexo	124
Tabela 6 -	Médias da expressão imunohistoquímica dos imunoproteasomas LMP2 e LMP7 no hipocampo de ratos de acordo com as interações idade x protocolo, com influência do sexo	130

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 - Esquema do corno de Ammon	12
Figura 2 - Desenho esquemático das principais características da remodelagem do sistema imune peculiar da imunossenescência	32

CAPÍTULO 3

Figura 1 - Fotomicrografia do timo de um animal jovem controle, com sobreposição das linhas de grade utilizadas para contagem dos pontos de intersecção entre as camadas cortical e medular	59
Figura 2 - Fotomicrografia do timo. Comparação entre o timo de um animal jovem adulto (6 meses) (A) e de um animal senil (24 meses) (B)	60
Figura 3 - Fotomicrografia dos cortes histológicos dos timos dos animais machos jovens (A, C, E) e senis (B, D, F)	62
Figura 4 - Fotomicrografia dos cortes histológicos dos timos dos animais fêmeas, jovens e senis	63
Figura 5 - Representação gráfica da percentagem da camada medular do timo de fêmeas jovens (rosa escuro) e senis (rosa claro)	68
Figura 6 - Representação gráfica da percentagem da camada medular do timo de machos jovens (azul escuro) e senis (azul claro)	68

CAPÍTULO 4

Figura 1 - Representação gráfica dos níveis de testosterona absolutos nos machos jovens e senis em cada um dos protocolos	85
Figura 2 - Representação gráfica dos níveis de testosterona absolutos nas fêmeas jovens e senis em cada um dos protocolos	86
Figura 3 - Representação gráfica dos níveis de estradiol absolutos nos machos jovens e senis em cada um dos protocolos	88
Figura 4 - Representação gráfica dos níveis de estradiol absolutos nas fêmeas jovens e senis em cada um dos protocolos	89

CAPÍTULO 5

Figura 1 - Processo de ubiquitinação através das enzimas, para reconhecimento do proteasoma 26S	102
Figura 2 - Estrutura do proteasoma	103
Figura 3 - Formação do imunoproteasoma	104

CAPÍTULO 6

Figura 1 - Fotomicrografia do hipocampo	122
Figura 2 - Fotomicrografia do hipocampo de ratos senis	123
Figura 3 - Fotomicrografia do hipocampo	126
Figura 4 - Fotomicrografia do hipocampo de ratos imunomarcados com anticorpo anti-LMP2	127
Figura 5 - Fotomicrografia do hipocampo de ratos imunomarcados com anticorpo anti-LMP2	128
Figura 6 - Fotomicrografia do hipocampo de ratos imunomarcados com anticorpo anti-LMP7	129

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5 α -DHT	5 alfa-dehidrotestosterona
ACTH	Hormônio adrenocorticotrópico
APC	Células apresentadoras de antígeno
APP	Proteína de fase aguda
APR	Resposta inflamatória de fase aguda
C	Grupo controle
CA	Corno de Ammon
CC	Corticosteróide
CC	Corticosterona
CRF	Fator liberador de corticotropina
DC	Células dendríticas
DHEA	Dehidroepiandrosterona
DN	Células T duplo negativos
DNA	Ácido desoxiribonucléico
DP	Células T duplo positivos
DriPs	Produtos ribossomais defeituosos
E	Grupo estressado
E+D	Grupo estressado e desafiado
E+D+GH	Grupo estressado, desafiado e tratado com GH
ER	Receptor de estrógeno

GC	Glicocorticóide
GD	Giro denteado
GH	Hormônio do crescimento
GR	Receptor de glicocorticóide
H&E	Hematoxilina e Eosina
HPA	Hipotálamo-pituitária-adrenal
HPG	Hipotálamo-pituitária-gonadal
HSP	Proteína de choque térmico
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IGF-1	Fator de crescimento como insulina
IL-1	Interleucina 1
INF- γ	Interferon gama
LPS	Lipopolisacáride
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
MR	Receptor de Mineralocorticóide
NA	Noradrenalina
NF- κ B	Fator nuclear κ B
NHRs	Receptores nucleares de hormônios
NK	"Natural killer" ou células matadoras
OMS	Organização Mundial de Saúde
ROS	Espécies oxigênio-reativas
SI	Sistema imune
SNA	Sistema nervoso autônomo
SNC	Sistema nervoso central
SNS	Sistema nervoso simpático
SP	Simplex positivo
TCR	Receptor de células T
TEC	Células epiteliais tímicas
TLR	"Toll-like receptors"
TNC	Células enfermeiras tímicas
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TNL	Tecido não linfóide
UPS	Sistema ubiquitina-proteasoma

RESUMO

FERREIRA, Anna Paula Baptista Ribeiro, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2011. **Efeitos do estresse crônico sobre o timo e o hipocampo de ratos jovens e senis submetidos a desafio imunológico e tratamento com hormônio do crescimento (modelo experimental).** Orientadora: Marlene Isabel Vargas Vilorio. Coorientadores: Joaquin Hernan Patarroyo Salcedo e Ita de Oliveira e Silva.

Para avaliar-se o efeito do estresse crônico moderado sobre o envelhecimento, foi desenvolvido um modelo experimental utilizando-se ratos jovens e senis. Os ratos, machos e fêmeas, num total de 80 animais, foram divididos em quatro tratamentos sendo controle (C), estresse (E), estresse associado a um desafio imunológico (E+D) e E+D com uso de hormônio do crescimento (E+D+GH). O experimento teve a duração de 28 dias, com aplicação de estressores variados em dias alternados. Ao final do 28.º dia os animais foram sacrificados e foi coletado material para análises. O timo, analisado histológica e morfometricamente, apresentou alterações condizentes com o processo de envelhecimento, tendo uma ausência de delimitação das camadas cortical e medular, diminuição da percentagem da medular em relação à cortical, tanto nos animais senis quanto nos jovens submetidos aos protocolos de estresse. O uso do GH promoveu uma hipertrofia tímica nos senis. O sexo não influenciou as

camadas tísticas ($p > 0,005$). A testosterona não sofreu influência dos protocolos, mas foi significativamente alterada em função do sexo e da interação protocolo X sexo ($p < 0,005$), ao contrário dos níveis de estrógeno que sofreram influência do sexo e protocolo ($p < 0,001$), com aumento nos animais dos protocolos E+D e E+D+GH, podendo sugerir uma resposta imunológica ao estresse. O peso do encéfalo sofreu influência do sexo e protocolos, com nível de significância de 0,005. As células da camada granular do giro denteado (GD) e a região CA4 do hipocampo também foram analisadas para verificação de alterações histológicas e morfométricas. Histologicamente os senis do protocolo E+D+GH, de ambos os sexos, apresentaram menor dispersão da camada granular e diminuição do número de neurônios hipercolorados, sugerindo um efeito neuroprotetor para o GH. A expressão imunohistoquímica dos imunoproteasomas LMP2, LMP7, PA28 α e α 7 foram avaliadas no hipocampo. PA28 α e α 7 apresentaram imunomarcacão fortemente positiva em todos os animais. A expressão do anticorpo anti-LMP2 e anti-LMP7 foi verificada nos senis e nos jovens submetidos ao estresse, indicando que o estresse simula o processo de envelhecimento cerebral. O uso do GH diminuiu a expressão de LMP2 nos senis e tornou negativa a imunorreacção para LMP7. Diante destes resultados, pode-se inferir que o estresse crônico promoveu alterações histomorfométricas condizentes com o envelhecimento do timo e do hipocampo de ratos jovens e alterou os níveis de esteróides sexuais nos ratos de ambos os sexos, jovens e senis. O GH modificou o timo dos indivíduos senis, deixando-os com aspecto de timo de animais jovens. O mesmo foi histologicamente observado no hipocampo de ratos senis.

ABSTRACT

FERREIRA, Anna Paula Baptista Ribeiro, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June, 2011. **Effects of chronic stress on the thymus and hippocampus of young and old rats undergoing challenge and treatment with growth hormone (experimental model)**. Adviser: Marlene Isabel Vargas Vilorio. Co-advisers: Joaquin Hernan Patarroyo Salcedo and Ita de Oliveira e Silva.

To evaluate the effect of moderate chronic stress on aging, it had been developed an experimental model using young and old rats. The rats, males and females, in a total of 80 animals, were divided into four treatments being them control (C), stress (E), stress associated with an immune challenge (E+D) and E+D with use of growth hormone (E+D+GH). The experiment lasted 28 days, with application of different stressors on alternate days. At the end of day 28, the animals were sacrificed and material was collected for analysis. The thymus, analyzed histologically and morphometrically showed changes consistent with the aging process, showing a lack of demarcation of cortical and medullary layers, decreasing the percentage of medullary in relation to cortical, both for older as for younger animals subjected to stress protocols. The use of GH promoted a thymus hypertrophy in older rats. However, the sex did not influence the thymus' layers ($p > 0.005$). Testosterone was not influenced by the protocols, but was significantly altered for sex and sex protocol X

interaction ($p < 0.005$), unlike estrogen levels that were influenced by the sex and the protocol ($p < 0.001$) with increase in animals of protocols E+D and E+D+GH, suggesting an immune response to stress. The weight of the brain suffered influence of sex and protocols, with a significance level of 0.005. The granular cell layer of the dentate gyrus (GD) and CA4 region of the hippocampus were also analyzed to verify the histological and morphometric changes. Histologically, the old rats of protocol E+D+GH, of both sexes showed less dispersion of the granular layer and decreased number of hippocampal neurons, suggesting a neuro-protective effect for GH. The immune histochemical expression of immune proteasomes LMP2, LMP7, and $\alpha 7$ PA28 α were assessed in the hippocampus. PA28 α and $\alpha 7$ showed strongly positive immune staining in all animals. The expression of anti-LMP2 and anti-LMP7 was observed in old and young rats subjected to stress; suggesting stress simulates the process of brain aging. The use of GH decreased the expression of LMP2 in old rats and has a negative immunoreaction for LMP7. That's resulted suggesting with the stress is related to the morphologic changes consistent with the aging process in thymus and hippocampus of the young rats and changed the hormonal estradiol levels in males and females, young and old rats. The use of GH promoted changes in thymus and hippocampus of the old rats.

APRESENTAÇÃO

A proposta desta tese é abordar os aspectos neuroendócrino e imunes do estresse e do envelhecimento. Propõe-se um modelo experimental utilizando-se ratos (*Rattus norvegicus*). O trabalho foi dividido em seis capítulos e descrito na forma de artigos científicos, tendo como objetivo geral, avaliar o efeito do estresse crônico moderado sobre a resposta imunológica, hormonal e neurológica, em ratos jovens e senis, machos e fêmeas.

No primeiro capítulo encontra-se uma revisão de literatura sobre os efeitos do estresse sobre os sistemas nervoso e imune do indivíduo senil. Depois se descreve a metodologia adotada para o protocolo experimental utilizado no experimento, que compõe o segundo capítulo.

O terceiro capítulo aborda os efeitos do protocolo de estresse sobre o timo dos ratos jovens e senis imunologicamente desafiados e tratados com hormônio do crescimento. No quarto capítulo, os hormônios sexuais de animais jovens e senis submetidos ao estresse crônico são discutidos. O quinto capítulo traz uma revisão de literatura sobre imunoproteasoma e o envelhecimento do sistema nervoso central. O último capítulo apresenta os efeitos do protocolo de estresse sobre o hipocampo, em uma abordagem histomorfométrica e sobre a expressão dos imunoproteasomas PA28 α , α 7, LMP2 e LMP7.

Foi adotada a formatação padrão, sugerida pela ABNT, uma vez que os artigos aqui apresentados, não serão submetidos a um único periódico científico. Para efeito de padronização interna, cada um dos capítulos contém um resumo em português e inglês, palavras chave, introdução, metodologia, resultados e discussão. Posteriormente, os mesmos serão convertidos, atendendo as normas específicas de cada um dos periódicos aos quais serão submetidos.

CAPÍTULO 1

ESTRESSE, SENILIDADE E SUAS INTERAÇÕES COM OS SISTEMAS IMUNOLÓGICO E NERVOSO

RESUMO: O envelhecimento é associado a mudanças em vários sistemas do organismo. O sistema imunológico sofre alteração no perfil celular, incluindo número, função e estágio de ativação. A involução do timo está diretamente relacionada a este declínio imune, podendo levar a uma inversão do perfil de citocinas e favorecendo a “inflammaging”. O estresse atua sobre o sistema nervoso promovendo lesões neurológicas capazes de evoluírem para doenças características da senilidade. Alterações hormonais decorrentes destes episódios de estresse favorecem respostas diferenciadas entre gêneros.

Palavras-chave: Estresse, senilidade, timo, imunologia, sistema nervoso, dimorfismo sexual.

STRESS, SENILITY AND THEIR INTERACTIONS WITH IMMUNE AND NERVOUS SYSTEMS

ABSTRACT: Aging is associated with changes in various body systems. The immune system undergoes changes in cell profile, including their number, function and activation stage. The involution of the thymus is directly related to this immune decline and may lead to a reversal of the cytokine profile and promoting "inflammaging". Stress acts on the nervous system promoting neurological injuries which can develop into disease characteristics of senility. Hormonal changes resulting from these episodes of stress favor different responses from genders.

Keywords: Chronic stress, senility, immune, thymus, gender differences, nervous system.

1. INTRODUÇÃO

O aumento exponencial da população de idosos traz à tona questões relativas à saúde, bem estar e inserção social deste segmento. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2008), com base no Censo 2000, os idosos são hoje 14,5 milhões de pessoas, 8,6% da população total do país. Em uma década, o número de idosos no Brasil cresceu 17%. Em 1991, ele correspondia a 7,3% da população. Hoje, a população brasileira vive, em média, 68,6 anos, o que representa 2,5 anos a mais em relação ao início da década de 90.

O segmento desta população que mais cresceu foi o de pessoas acima de 75 anos. Estima-se que em 2020 13% da população do Brasil estejam com idade superior a 60 anos e que a esperança de vida chegue aos 70,3 anos (IBGE, 2008), o que, por si só, tem repercussões socioeconômicas importantes.

Nos Estados Unidos, 30% dos 160 bilhões de dólares gastos anualmente com a saúde pública, são direcionados às despesas com idosos (OUSLANDER; BECK, 1982). De acordo com Nass et al. (2009), no ano 2050 estima-se que 25% da população mundial esteja com mais de 60 anos e que 75% deste grupo tenha mais de 80 anos aumentando consideravelmente o risco de mortalidade, as taxas de hospitalização, dependência, imobilidade, gastos com medicamento e diminuindo a capacidade de tolerância ao estresse.

A idade ou senescência é um fenômeno que resulta em uma progressiva perda de função de todos os órgãos, evoluindo para a morte (PARDON, 2007). O envelhecimento vem sendo definido como a incapacidade de manutenção do equilíbrio homeostático em condições de sobrecarga funcional (KABOGLU, 2004).

Os processos degenerativos são uma consequência fisiológica da senilidade, mas a evolução dos mesmos acarreta distúrbios patológicos, com perda de função dos órgãos e doenças crônicas e/ou degenerativas. Indivíduos senis são submetidos a uma carga de estresse crônico no decorrer da vida, levando a uma exposição contínua dos tecidos a níveis elevados de cortisol (BAUER et al., 2009). A ação contínua do cortisol promove mudanças estruturais permanentes no cérebro, contribuindo para patologias relacionadas

ao envelhecimento como demência e Doença de Alzheimer (PARDON, 2007), além de provocar microdanos neuronais (WAGNER-SMITH; MARKOU, 2011).

Alguns autores sugerem o declínio da resposta imune com o avançar da idade (OUSLANDER; BECK, 1982; KABOGLU, 2004; KRABBE et al., 2004). No entanto, Sansoni et al. (2007) sugerem que a imunossenescência não é um declínio progressivo e irreversível das funções imunes, mas um processo de remodelagem contínua, onde várias funções são reduzidas, outras permanecem inalteradas ou até mesmo aumentadas.

Os processos degenerativos que acompanham a senilidade não são exclusivos de humanos, sendo pertinentes a todas as espécies (SHANLEY et al., 2009). A utilização de modelos animais permite melhorar a compreensão do estresse, principalmente com respeito à manipulação dos animais e transposição de respostas clínicas obtidas (CHEN et al., 2010).

De acordo com Franceschi et al. (2000b), modelos murinos são utilizados para analisar respostas imunológicas porque, assim como os humanos, eles possuem um sistema imune (SI) clonotípico. Respeitando as peculiaridades evolucionárias da espécie, ratos e camundogos também têm sido preferidos para o estudo da senilidade, uma vez que qualitativamente o processo de imunossenescência é o mesmo que nos homens.

O aumento da expectativa de vida da população, o crescimento do número de indivíduos acima de 65 anos, o aumento do conhecimento da longevidade através de tecnologias e marcadores epigenéticos e a necessidade de educar a população de forma a promover um envelhecimento mais saudável, justificam o estudo da senilidade. No presente artigo, são apresentados aspectos da fisiopatologia do estresse, suas relações com o envelhecimento, enfatizando-se os eventos pertinentes aos sistemas nervoso e imunológico.

2. O ESTRESSE

2.1. Fisiopatologia do estresse

A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera o estresse como uma das maiores ameaças à saúde humana do século XXI (LEKA et al., 2011).

O estresse tem sido definido como um estado de ameaça à homeostase, provocado por um estressor fisiológico, psicológico ou ambiental. Pode ser também definido como um estímulo, tanto interno quanto externo, que ativa o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e o sistema nervoso simpático (SNS), resultando em uma mudança fisiológica ou em adaptação do organismo, decorrente de uma ameaça (BLACK, 2002).

Desde o pioneiro trabalho de Hans Selye (SELYE, 1938), a palavra estresse passou a ser reconhecida mundialmente. De acordo com este autor, o estresse se inicia com uma resposta adaptativa que defende a estabilidade do ambiente interno para a sobrevivência do organismo.

Marsland et al. (2002) observaram que nem todos os indivíduos estressados respondem de maneira similar ao desenvolvimento de doenças. Algumas variáveis devem ser consideradas, principalmente aquelas relacionadas ao comportamento ou vulnerabilidade biológica.

Embora a reação ao estresse possa ser inicialmente considerada uma estratégia de defesa, segundo a clássica definição de Selye (1938), onde o indivíduo reage com “luta ou fuga”, ela está diretamente relacionada ao desenvolvimento de doenças em função de sua ação sobre o sistema imune. Logo, o estresse psicológico pode afetar a função imune e aumentar a susceptibilidade a processos patológicos.

O equilíbrio orgânico é alterado toda vez que ocorrem alterações no ambiente e no organismo do animal, levando a um desequilíbrio da homeostase, ou seja, da capacidade adaptativa sobre estas alterações. Esta “quebra” da homeostase é o que se pode considerar como metabolismo do estresse. Então, o estresse pode ser explicado como uma resposta fisiológica do organismo, buscando fornecer subsídios ao corpo para responder e/ou adaptar-se às alterações provocadas pelo desequilíbrio da homeostasia (HERMSWORTH et al., 1995; RUIS et al., 2001).

Recentemente um novo conceito de estresse vem sendo considerado: o conceito da “alostasia”, definido como o processo adaptativo para manutenção ativa da estabilidade através da mudança (KORTE et al., 2005).

O estresse inicia com uma resposta adaptativa que defende a estabilidade do ambiente interno para a sobrevivência do organismo. A resposta adaptativa ao estresse caracteriza-se pelos componentes fisiológicos

e comportamentais, sendo determinada por vários fatores como tamanho, severidade e tipo de estressor. Além destes, as diferenças sexuais, genéticas, experiência prévia, fatores cognitivos e ambientais também atuam na resposta do organismo. Uma resposta eficiente ao estresse pode ser determinante para a sobrevivência e esta eficiência pode ser passada a outras gerações através da seleção natural (MOTZER; HERTING, 2004; KORTE et al., 2005).

Os mecanismos de resposta ao estresse têm sido altamente conservados durante o processo evolutivo e mantêm envolvido o mesmo padrão de moléculas mediadoras da resposta, tais como neuropeptídeos, hormônios e citocinas (OTTAVIANI; FRANCESCHI, 1998; LIBERT; PLETCHER, 2007), indicando que existe uma comunicação bidirecional entre os sistemas neuroendócrino e imune. O primeiro respondendo a estímulos cognitivos e o segundo mais voltado a uma resposta a impulsos não cognitivos.

Segundo Carrasco e Van de Kar (2002), algumas mudanças fisiológicas associadas à resposta ao estresse envolvem:

- a) mobilização de energia para manutenção da função cerebral e muscular;
- b) forma de perceber ameaça;
- c) aumento da taxa de perfusão cerebral e utilização de glicose no cérebro;
- d) aumento da demanda cardiovascular e respiratória e redistribuição do fluxo sanguíneo, aumentando a oferta de energia para o cérebro e os músculos;
- e) modulação da função imune;
- f) inibição da função reprodutiva e comportamento sexual;
- g) diminuição da alimentação e do apetite.

Segundo Korte et al. (2005), os indivíduos podem responder neuroendocrinamente ao estresse de duas formas diversas, sendo uma mais ativa e outra mais passiva. O comportamento ativo é caracterizado por uma alta ativação do sistema simpático adrenal-medular que resulta em níveis elevados de epinefrina no sangue, enquanto são liberadas grandes quantidades de norepinefrina nas terminações nervosas. Ocorre também uma ativação do eixo hipotálamo-pituitária-gonadal (HPG), que aumenta a testosterona plasmática.

Já o comportamento passivo é caracterizado pela ativação do eixo HPA, mais especificamente pela produção do fator liberador de corticotropina (CRF), um neuropeptídeo produzido pelo hipotálamo. O CRF estimula a

glândula pituitária a secretar hormônio adrenocorticotrópico (ACTH), estimulando a adrenal a liberar corticosterona (roedores e pássaros) ou cortisol (suínos e humanos). Os altos níveis de CC atuam no hipocampo via receptores de mineralocorticóides (MRs), comprovando sua estreita relação com a resposta adaptativa ao estresse (KORTE et al., 2005).

De acordo com Moberg e Mench (2000), também é importante considerar o conceito do estresse crônico. Sua definição torna-se difícil em função da tendência em tratá-lo como uma constante, ou estado invariável, onde o agente estressor é repetido sucessivamente. No entanto, o organismo que é submetido a um estressor de longo tempo, muda sua resposta ao longo deste período. Algumas são diminuídas em função da capacidade adaptativa em nível cognitivo e outras podem ser suprimidas ou atingem níveis basais, como é o caso do cortisol. Existem ainda respostas que podem ser exacerbadas por um processo denominado sensibilização, como é o caso dos níveis de cortisol após novos estressores. Portanto, o efeito do estressor sobre o organismo é dependente do tipo de estresse, da situação em que ele é aplicado, da espécie animal e de como isso afeta cada indivíduo de maneira particular (MOBERG; MENCH, 2000).

O estresse crônico é utilizado por mimetizar fatores de risco para desordens cerebrais humanas, havendo uma ligação, já bem documentada, deste com psicopatologias como a depressão (GAMARO et al., 2003; HERMAN et al., 2001; JOËLS et al., 2007), utilizando modelos animais.

Os estressores a que são expostos os animais de laboratório, não são sentidos de maneira tão forte quanto aqueles vividos em experiências reais. No entanto, a forma como o estresse é aplicado no laboratório, normalmente impede que o animal tenha a opção de escapar, o que poderia acontecer com os indivíduos na natureza. Assim, torna-se possível um mínimo controle sobre estes animais, compensando a menor intensidade de um estresse real (JOËLS et al., 2007).

Sempre se preconizou que o aumento da incidência de doenças em animais sob estresse crônico estava correlacionado a uma supressão da competência do sistema imune. O SI é modulado por outros sistemas durante a produção da resposta, principalmente pelo eixo HPA, caracterizando o

envolvimento direto do sistema nervoso central (SNC) na regulação do SI durante o estresse (MOBERG; MENCH, 2000).

Webster et al. (2002) comprovam a existência de alterações nos sistemas neuroendócrino e imune, provocadas por agressões físicas, químicas endógenas ou exógenas, com liberação de substâncias endógenas, que contribuem para a manutenção do equilíbrio ou que desestabilizam a homeostase corporal.

Tanto o estresse crônico como lesões em determinadas áreas cerebrais afetam a função imune. O estresse crônico leva a involução tímica e altera os padrões de distribuição de subpopulações de células T, diminuindo a migração de células da medula óssea para o timo (ZIVKOVIC et al., 2005).

2.2. O estresse sobre a imunidade

Existem evidências de que o estresse, sozinho, pode causar uma resposta inflamatória e que episódios repetidos ou crônicos de estresse podem evoluir para um estado inflamatório. As mudanças hormonais características do estresse podem induzir um processo inflamatório e o estímulo inflamatório também pode ativar o eixo HPA, ou seja, a resposta ao estresse está intimamente ligada à resposta inflamatória e também é originada da mesma (BLACK, 2002).

Os principais hormônios do estresse induzem uma resposta inflamatória de fase aguda (APR), similar àquelas elucidadas quando o organismo reage à invasão de microorganismos, trauma ou injúria tecidual. Dentre estes hormônios do estresse, os glicocorticóides (GCs) sempre foram reconhecidos por seus efeitos farmacológicos antiinflamatórios e imunossupressores. Sua participação na resposta inicial ao estresse já é conhecida, induzindo uma reação inflamatória. Há uma interação deste hormônio com os sistemas neuroendócrino e imune, através de uma rede de reações reguladoras que agem, sistemicamente, pela rota hormonal e, localmente, através dos órgãos linfóides, atuando diretamente sobre os sítios inflamatórios (WEBSTER et al., 2002).

Os GCs são reguladores endócrinos essenciais e são membros da família dos hormônios esteróides. São derivados do colesterol, sendo

sintetizados e secretados pela glândula adrenal. Atuam no desenvolvimento embrionário, na regulação da homeostase metabólica, no sistema nervoso central e na modulação da resposta imune. Em humanos o GC funcional é o cortisol, cujo equivalente funcional em roedores é a corticosterona (GEORGE et al., 2009).

Em condições normais, os corticosteróides (CCs) podem ter um efeito e em condições patológicas um efeito oposto, ou seja, efeitos diferentes de acordo com a sua concentração fisiológica ou patológica. É possível que os glicocorticóides possam aumentar as funções imunes e inflamatórias, em uma concentração, e inibir estas mesmas funções, em outra concentração (BLACK, 2002; WEBSTER et al., 2002).

Juntamente com as catecolaminas, os CCs induzem à síntese de uma proteína ligada a lipopolisacáride (LPS) no fígado. Trata-se de um reagente de fase aguda, que se liga ao LPS, limitando sua toxicidade. Complementando este efeito duplo dos corticosteróides, pode ocorrer tanto um aumento da resposta inflamatória do hospedeiro ao LPS, quanto uma maior facilidade de produção de uma proteína neutralizadora, ajudando o hospedeiro a combater a toxicidade dos LPS (BLACK, 2002).

O estresse age como o LPS e as moléculas mediadoras são as citocinas, principalmente interleucina 1 (IL-1) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α). Black (2002) sugere uma hipótese de que o LPS pode mediar e/ou aumentar alguns efeitos do estresse na indução da resposta inflamatória. Acredita-se que os LPS estimulem o eixo HPA através do aumento dos níveis plasmáticos do ACTH, estimulado pela liberação de IL-1 (HADDAD et al., 2002).

A resposta sistêmica à inflamação inclui a rápida e prolongada ativação do sistema imune inato, que reflete na concentração das proteínas de fase aguda (APP), correspondendo a uma resposta de fase aguda. Estas proteínas pró-inflamatórias são importantes na restauração da homeostase, por assumir um papel protetor através da inativação de moléculas citotóxicas e vasoativas liberadas pelo dano tecidual (NYLÉN; ALARIFI, 2001). No entanto, o controle da resposta inflamatória é essencial para o sistema imune estabelecer um balanço entre a destruição do organismo patológico e a manutenção da integridade do tecido hospedeiro (DEVRIES et al., 1999).

Assim como o homem, os animais necessitam suprir suas necessidades fisiológicas, comportamentais e psíquicas para sobreviver num ambiente em constante transformação. A capacidade para interagir e responder a essas alterações é o que possibilita a adaptação e a sobrevivência dos indivíduos (LIBERT; PLETCHER, 2007).

Uma memória molecular, capaz de produzir rápida resposta ao estresse, tem sido o principal avanço evolutivo do sistema imune de vertebrados e do sistema nervoso central (FRANCESCHI et al., 2000a).

3. O SISTEMA NERVOSO

O sistema nervoso (SN) constitui o principal fator de integração das atividades orgânicas, sendo fundamental para a manutenção da homeostase corporal e para a sobrevivência do indivíduo. Entre as suas principais funções, está a de controlar atividades como contração dos músculos esqueléticos e lisos, além da secreção de substâncias químicas pelas glândulas exócrinas e endócrinas por todo o corpo (GUYTON; HALL, 2006).

O conhecimento das diferenças e similaridades anatômicas, celulares e moleculares do sistema nervoso central entre as espécies, desde as extintas até as atuais, permite a reconstituição da seqüência evolutiva do cérebro de vertebrados (DANI et al., 1997). A formação básica do cérebro não sofreu grandes alterações nestas centenas de milhões de anos de evolução, no entanto, durante a transição dos peixes para os répteis é que ocorreu o surgimento do sistema límbico, com a presença do hipocampo. Durante o período Triássico, com a transição dos répteis para os mamíferos correlacionou-se a evolução da consciência e inteligência do cérebro (DANI et al., 1997).

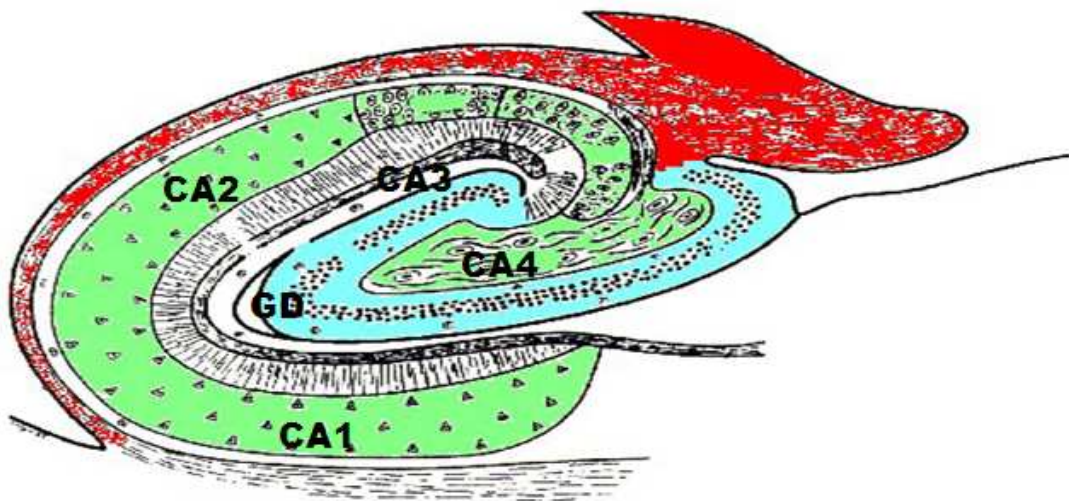
Segundo Buchanan et al. (2009), o hipocampo é conhecido pela sua função no processo de aprendizado e memória, mas também está envolvido nos comportamentos de ansiedade e resposta ao estresse.

A região hipocampal é formada por dois grupos de estruturas corticais, a formação hipocampal de um lado e a região parahipocampal de outro. A diferença entre elas é o número de camadas corticais que as compõem (PAXINOS, 2008).

Macroscopicamente a formação hipocampal é uma unidade funcional complexa, com eixo longo se estendendo em forma de “C”, localizada na porção mesial do ventrículo lateral do lobo temporal, em cada um dos hemisférios cerebrais. Compreende três regiões citoarquiteticamente distintas, que incluem o hipocampo ou corno de Ammon (CA), o giro denteado (GD) e o subículo (SOUZA, 2001; PAXINOS, 2008).

As definições anatômicas do órgão são diversas e variam de acordo com os autores, no entanto, o hipocampo é comumente subdividido nas camadas CA1, CA2, CA3 e CA4, como visto na Figura 1. A camada CA1 contém células piramidais pequenas e frouxamente agrupadas. A camada CA2 contém uma estreita faixa de células piramidais grandes e densamente agrupadas. A camada CA3 é caracterizada por uma grande faixa de neurônios frouxamente agrupados e a camada CA4, ou hilo do GD, é coberta principalmente pelo complexo denteado e possui muitos tipos de neurônios soltos sem nenhuma laminação, como células piramidais, espinhosas, não espinhosas e uma variedade de interneurônios (PAXINOS, 2008).

O GD é uma estreita lâmina dorsalmente côncava, que envelopa parte do hipocampo. Pode ser dividido em a) estrato molecular, que recebe fibras perfurantes, septais e comissurais interna e externamente; b) estrato granuloso, que contém neurônios granulosos, cujos axônios atravessam a camada polimórfica; c) camada polimórfica; d) fímbria, formada pelas fibras do alveus, que irão conectar-se com o fórnix, formando a principal via de eferência do hipocampo (SOUZA, 2001; PAXINOS, 2008).



Citoarquitetura e morfologia hipocampal em secção transversa, mostrando as quatro áreas histológicas do corno de Ammon (CA): CA1, CA2, CA3 e CA4, além do giro denteado (GD).

Fonte: Adaptado de Souza (2001).

Figura 1 - Esquema do corno de Ammon.

As células granulares do hipocampo são das poucas células neuronais que sofrem neurogênese no SNC de um indivíduo adulto saudável. Neurônios imaturos da zona subgranular migram, a uma curta distância, para a camada de células granulares do GD, onde desenvolvem e amadurecem (RON-HAREL; SCHWARTZ, 2009).

3.1. Interações entre os sistemas nervoso e imunológico

As interações entre estes sistemas foram sugeridas aproximadamente no ano 200 AC pelo médico e filósofo grego Galeno, quando afirmava que mulheres melancólicas eram mais susceptíveis ao câncer em relação às mulheres de “sangue quente”.

A base biológica das interações entre os SN e o SI foi descrita por Hans Selye, quando relatou que intervenções do SNC sobre as funções

neuroendócrinas, durante o estresse, seriam capazes de influenciar o sistema imune (SELYE, 1938).

Wagner-Smith e Markou (2011) relataram que o sistema neuroendócrino e o imune compartilham receptores para citocinas, neurotransmissores, hormônio e neuropeptídeos comuns. Além disso, produtos originalmente tidos como específicos de cada um destes sistemas coexistem em tecidos linfóides, endócrino e nervoso.

Uma base anatômica para a interação entre os sistemas nervoso e imune foi descrita por Masek et al. (2003). Eles demonstraram a existência de terminações de fibras nervosas periféricas dentro de órgãos linfóides e sua distribuição em compartimentos celulares específicos, particularmente em zonas de células T e macrófagos.

O mau funcionamento das células T pode ter um efeito devastador sobre a capacidade de memória cognitiva. A população destas células é mantida pela liberação tímica de células T virgens através de um precursor que migra da medula óssea para o timo onde adquire especificidade em função de uma série de eventos de recombinação gênica, resultando em um TCR maduro (RON-HAREL; SCHWARTZ, 2009).

Episódios de estresse podem levar à uma resposta imune deficiente. Neste sentido, mudanças ambientais e pressões de seleção natural atuam como grandes estímulos estressores. Estes estímulos podem ser de natureza psicológica, como medo ou ansiedade; física, como mordida ou infecções; ou ainda fisiológica, como a fome ou privação de água. Cabe ao cérebro perceber o estímulo estressor, avaliar o perigo e capacitar o organismo a lidar com as conseqüências, liberando neurotransmissores e hormônios (DHABHAR et al., 1997).

Ron-Harel e Schwartz (2009), trabalhando com camundongos imunodeficientes, comprovaram não só a incapacidade de recuperação do tecido cerebral como também uma incapacidade de renovação de células neurais. Também houve diminuição de produção de fatores de crescimento, menor habilidade cognitiva e instabilidade mental, caracterizando a interação íntima entre os sistemas nervoso e imune nestes camundongos.

Esta íntima interação é bem ilustrada pelo experimento de Morgulis et al. (2004). Utilizando camundongos, obrigou um animal saudável a conviver durante

11 dias com outro doente em uma mesma gaiola. Este estressor psicológico crônico provocou uma menor resistência ao tumor de Ehrlich no camundogo sadio.

Dois tipos de receptores de corticosteróides são reconhecidos dentro do cérebro: os MRs de alta afinidade, expressos nas áreas límbicas como hipocampo e amígdala central; os GRs que apresentam uma afinidade 10 vezes menor para corticosterona. Estes receptores pertencem à família dos receptores nucleares e quando inativados se ligam a outras moléculas como as proteínas de choque térmico (HSPs) e imunofilinas (JOËLS et al., 2007).

3.2. O estresse sobre o sistema nervoso

O estresse, compreendido como potencial distúrbio de origem interna ou externa pode ativar o SN através do sistema simpático-adrenomedular e o eixo HPA na tentativa de normalizar o desequilíbrio gerado (JOËLS et al., 2007; FERRIS; STOLBERG, 2010).

Segundo Swaab et al. (2005), a resposta ao estresse crônico envolve uma ativação proeminente do eixo HPA e do sistema nervoso autônomo (SNA), com alterações no nível de ansiedade, perda das capacidades cognitivas e afetivas, além da inibição dos processos vegetativos como sono, atividade sexual e programas endócrinos de crescimento e reprodução.

A ativação do eixo HPA e do SNA resulta em aumento da liberação de adrenalina que, através da ativação do nervo vago, indiretamente aumenta a atividade dos neurônios noradrenérgicos nos núcleos *tractus solitarius* e no *locus coeruleus* (KARTZ; JÖELS, 2002). Como consequência, os níveis de noradrenalina (NA) são temporariamente elevados no cérebro, levando a mudanças funcionais nos neurônios que possuem os receptores para NA.

Segundo Joëls et al. (2007), a ativação do eixo HPA aumenta a liberação de corticosterona que, em função de sua natureza lipofílica, facilmente penetra no cérebro atuando naqueles locais com maior número de receptores. Este autor ainda sugere que as propriedades elétricas e morfológicas das células cerebrais, bem como a capacidade proliferativa das células progenitoras do GD são afetadas por um estresse crônico de três semanas.

Os GCs liberados das glândulas adrenais, em resposta a experiências emocionais, têm significativos efeitos na neuroplasticidade e promovem mudanças

na memória e aprendizado, gerando atrofia das células piramidais CA3 (KARTZ; JÖELS, 2002). Os neurônios do hipocampo são particularmente sensíveis aos efeitos agudo e crônico de altos níveis circulantes destes CGs (SWAAB et al., 2005; GARCIA-SEGURA et al., 2007; FERRIS; STOLBERG, 2010).

Alterações induzidas por hormônios do estresse nesta área cerebral incluem atrofia neuronal, remodelagem dendrítica, reduzida utilização de glicose, aumento da neurotransmissão de glutamato e reduzida eficácia sináptica. Os mecanismos que contribuem para estas modificações são primariamente genômicos (MIZOGUCHI et al., 2009).

Os glicocorticóides se ligam aos receptores de glicocorticóides (GRs) e MRs no citosol, translocam para o núcleo e atuam como fatores de transcrição alterando a atividade gênica e a síntese de proteínas. As mudanças subsequêntes na neurobiologia mediada por este mecanismo genômico levam horas para ocorrer e têm efeito a longo prazo (FERRIS; STOLBERG, 2010).

Repetidas exposições ao estresse podem mudar gradualmente as características elétricas, morfológicas e a capacidade proliferativa das células do cérebro. A liberação repetida de corticosterona em determinadas áreas do cérebro, principalmente sobre o hipocampo, interfere na proliferação de células progenitoras, nas propriedades neuronais e na apoptose, além de iniciar uma resposta via genômica (JÖELS et al., 2007).

Segundo Sorrels e Sapolsky (2007), as conseqüências de uma prolongada elevação das concentrações de GC são particularmente complexas quando associadas a injúrias neuronais. O estresse crônico associado aos GCs, sinalizados através dos GRs, comprometem a habilidade dos neurônios no hipocampo, córtex e promovem a ocorrência de uma variedade de injúrias neurológicas como hipoxia-isquemia, hipoglicemia, anti-metabólitos, geradores de radicais de oxigênio, entre outros. Essas ações de perigo são exacerbadas pelo fato de que muitos desses insultos neurológicos estimulam uma adicional secreção de GC.

4. O ENVELHECIMENTO

O aumento da taxa de envelhecimento da população é um fenômeno mundial. Na década de 50, os idosos do mundo representavam 204 milhões e este número aumentou para 579 milhões em cinco décadas. Estima-se que em 2050, os idosos somem 1,9 bilhões de pessoas (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE, 2011). O aumento exponencial da expectativa de vida é acompanhado por uma série de problemas de caráter a princípio fisiológico, que se tornam uma condição patológica. Em geral, existe uma correlação entre alterações estruturais e funcionais associadas à idade.

Segundo dados da Adereçam Geriatrias, 79% da população acima de 70 anos sofre de alguma doença crônica tais como artrite, hipertensão arterial sistêmica, *diabetes mellitus*, doenças coronárias, respiratórias ou câncer (BERAN et al., 2007).

O envelhecimento é um processo que contribui para a diminuição da homeostase e aumento da vulnerabilidade do organismo, causando uma redução da resposta ao estímulo ambiental. A progressiva diminuição da capacidade fisiológica e a reduzida habilidade em responder ao estresse levam ao aumento da susceptibilidade e vulnerabilidade a doenças. A mortalidade aumenta exponencialmente em função do avançar da idade (VASTO et al., 2007; NASS et al., 2009).

O processo natural do envelhecimento está associado a uma progressiva modificação e perda de função dos órgãos. Estas mudanças são comuns a todas as espécies. A OMS define a população idosa como aquela a partir dos 60 anos de idade, mas faz uma distinção quanto ao local de residência dos idosos. Este é um limite válido para os países em desenvolvimento, mas esta faixa etária sobe para 65 anos quando se trata de países desenvolvidos (IBGE, 2008).

Em mamíferos, processos degenerativos como arteriosclerose, desenvolvimento de placas senis no cérebro e reposição do parênquima funcional por tecido conjuntivo fibroso em vários órgãos, são considerados manifestações comuns do envelhecimento (FELDER et al., 2002; ZHU et al., 2006; FRANCESCHI et al., 2007).

Alterações cardiovasculares que ocorrem com o envelhecimento são similares àquelas atribuídas ao aumento da pressão, com respeito a propriedades

bioquímicas, mecânicas e eletrofisiológicas no coração e vasos sanguíneos. Em ratos, o envelhecimento e a hipertensão produzem um aumento do peso do ventrículo esquerdo e fibrose do miocárdio. Ocorre também uma diminuição da flexibilidade da aorta, principal causa da hipertrofia ventricular esquerda (FELDER et al., 2002).

Segundo Newton (2004), doenças do trato gastrintestinal superior, como úlcera péptica e câncer gástrico, começam a se tornar mais comuns com o envelhecimento. Em função das mudanças fisiológicas comuns com o avançar da idade, ocorre a indução de alta prevalência de infecções, principalmente por *Helicobacter pylori*. Associado a este processo, uma reduzida capacidade de reparo da mucosa gástrica e o menor fluxo sanguíneo favorecem os processos infecciosos deste sistema.

O envelhecimento é ainda caracterizado pela perda de massa muscular, conhecida por sarcopenia senil e com um progressivo declínio da força muscular que acelera após os 60 anos (REEVES et al., 2006). Estima-se que a perda de massa muscular, a cada década, está entre 1% e 5% a partir dos 40 anos (NASS et al., 2009).

Alterações celulares e fisiológicas, que acompanham o processo de envelhecimento “normal”, parecem ter efeitos pronunciados sobre processos neurodegenerativos. Muitos avanços científicos têm sido alcançados nesta área, mas a interface entre envelhecimento e doenças neurodegenerativas continua não elucidada (SILVA, 2007).

Segundo Coe e Laudenslager (2007), os processos emocionais modificam as atividades das vias endócrinas e neurais, o que, conseqüentemente, altera a resposta imunológica do indivíduo.

Indivíduos deprimidos apresentam níveis aumentados de proteína C-reativa e citocinas inflamatórias, prolongada resposta de neuroepinefrina ao estresse, bem como uma deficiente resposta após vacinação (STEPTOE et al., 2005). No entanto, a vacinação de idosos tem representado uma atividade de grande impacto na saúde da população (PAWELEC; LARBI, 2008), podendo apresentar melhores resultados na população senil com melhor qualidade de vida, tanto emocional, como sócio-econômica.

O processo de envelhecimento também evidencia mudanças comportamentais em ratos velhos. Estes animais tendem a apresentar diminuição

na capacidade de aquisição e retenção de memória, quando comparados a ratos jovens. A atividade locomotora também é significativamente menor em animais idosos. Em geral, a performance comportamental cognitiva e não cognitiva está alterada em ratos senis, com comprometimento da memória espacial associada à degeneração do sistema colinérgico do septo do hipocampo (FELDER et al., 2002).

Um aumento da atividade inflamatória é acompanhado pelo envelhecimento e caracterizado como parte de um processo patológico, envolvendo doença cardiovascular, demência senil, que representam as principais desordens médicas e causam mortalidade nos estágios finais da vida em humanos. Uma alterada resposta de fase aguda pode contribuir para o aumento da susceptibilidade a doenças, apresentação clínica alterada e alta taxa de mortalidade em pacientes geriátricos, portadores de infecção (KRABBE et al., 2004).

As alterações hormonais decorrentes do envelhecimento acometem as mulheres, com diminuição do estrógeno circulante, acompanhada por mudanças nas funções hipotalâmicas e da pituitária (REHMAN; MASSON, 2005). Embora menos pronunciado, em homens, os níveis de testosterona também declinam com a idade, ocorrendo um aumento proporcional da gordura corporal (NASS et al., 2009). Segundo Lee et al. (2004), ocorre uma diminuição da secreção de hormônio do crescimento (GH) em função do declínio da atividade da pituitária. O pico de GH acontece na puberdade e seus níveis decaem até próximo aos 40 anos, quando então ocorre um decréscimo gradual de 14% na taxa de secreção, por década.

Além disso, os processos degenerativos do envelhecimento são equivalentes à deficiência de GH, tais como a perda de massa e força muscular, aumento de adiposidade, tendência a depósito de gordura abdominal e perda de mineralização óssea (BARTKE et al., 1998).

Existe uma contradição entre a relação de GH e a idade, principalmente ao analisar a expectativa de vida de animais associada à deficiência de GH. Há evidência entre a correlação dos benefícios deste hormônio sobre a composição corporal, função cardíaca e bem estar geral, mas o excesso patológico pode levar à diabetes, doença cardiovascular, e envelhecimento acelerado (BROWN-BORG, 2007; BROWN-BORG, 2009). Pesquisas têm demonstrado uma sobrevivência

prolongada de camundongos anões, ou seja, com deficiência de GH e o envelhecimento prematuro de camundongos transgênicos super-expressando GH (BROWN-BORG, 2009; MIZOGUCHI et al., 2009). Isto indica uma correlação negativa de tamanho corporal e expectativa de vida dentro da espécie. Entre os cães domésticos também existe esta evidência de que raças menores têm maior expectativa de vida que as raças maiores (BARTKE et al., 1998).

O GH pode acelerar o processo de envelhecimento pela depressão das defesas antioxidantes, levando ao acúmulo do dano oxidativo e disfunção celular (BROWN-BORG; RAKOCZY, 2003).

Em função destas contradições, o processo de envelhecimento tem gerado uma série de teorias na tentativa de justificar este fenômeno complexo, multifatorial e de natureza multidisciplinar (KRAUSE, 2007; BECKMAN; AMES, 1998; KOWALD, 2001).

Dentre as teorias mais conhecidas, destacam-se as estocásticas e não-estocásticas. As teorias estocásticas são baseadas no acúmulo aleatório de moléculas com alterações estruturais. Dentre elas destacam-se aquelas para os radicais livres, lesões mitocondriais, alteração no colágeno, lesão de membrana, mutação genética e “erro catastrófico” na síntese de proteínas, além das teorias neuroendócrina e imunológica. Já as teorias não-estocásticas baseiam-se nos mecanismos programados no genoma de cada organismo, incluindo apoptose celular e deterioração do programa genético que regula o desenvolvimento celular (SILVA, 2007; KABOGLU, 2004).

4.1. O estresse no indivíduo senil

Por um longo tempo, a gerontologia foi dominada pelo conceito de existência de um relógio biológico que promovia mudanças no organismo, através de um mecanismo de morte celular, geneticamente programado. Nos últimos 20 anos, a influência dos fatores ambientais, como o estresse, passou a ser reconhecida e hoje, considera-se a velhice como uma interação entre ambiente e genótipo (PARDON, 2007).

Franceschi et al. (2000a) sugerem a existência de uma teoria evolutiva da imunossenescência considerando uma notável conservação de moléculas mediadoras de estresse, imunidade inata e inflamação através da evolução desde

os invertebrados até o homem. Estes fenômenos seriam parte integrada de uma rede de defesa adaptativa para sobrevivência e manutenção corporal.

Nos últimos anos as pesquisas têm demonstrado que alterações na resposta imune acontecem após um fato traumático. O número de células “natural killer” (NK) circulantes reduz substancialmente minutos após a ocorrência de uma situação estressante, podendo permanecer diminuído por horas ou dias, dependendo da gravidade deste estresse (COE; LAUDENSLAGER, 2007).

Para De Martinis et al. (2005), o estresse antigênico crônico e a subsequente carga inflamatória têm um forte impacto sobre a sobrevivência ou enfermidade.

Segundo Pardon (2007), evidências tais como mutações genéticas que aumentam a resistência a fatores estressantes como choque térmico, radiação, estresse oxidativo, apontam que os genes que regulam a longevidade são os mesmos envolvidos na resistência ao estresse.

Entretanto, o metabolismo de produtos oxidativos, principalmente as espécies oxigênio reativas (ROS), representam importantes estressores que atuam continuamente sobre o sistema imune (VAN REMMEN; RICHARDSON, 2001), acumulando durante o envelhecimento e induzindo importantes danos celulares (DE MARTINIS et al., 2005).

Como consequência do acúmulo de ROS, as células começam a ficar mais resistentes a apoptose, aumenta o número de linfócitos disfuncionais e a carga antigênica crônica induz ao aumento de células imunes ativadas com hiperprodução de citocinas pró-inflamatórias. Todos estes fatores determinam a remodelagem do SI e a “inflammaging” (DE MARTINIS et al., 2005).

Segundo Pardon (2007), sinais biológicos e emocionais, característicos da senilidade, equivalem a uma reação de estresse crônico e podem ser observados na ausência de qualquer estressor. Além disso, a habilidade de responder a estímulos estressantes diminui com a idade, deixando os indivíduos mais vulneráveis aos efeitos colaterais deste estresse. Isto porque, com o avançar da idade, observa-se um desequilíbrio na atividade do eixo HPA, secundária a uma diminuição do número de receptores de glicocorticóides. O resultado é uma hipersecreção de GCs com aumento gradual da deterioração do hipocampo.

Durante o processo de envelhecimento, tanto os ratos como os humanos apresentam uma progressiva perda do controle do eixo HPA, resultando em

hipersecreção de GC durante episódios de estresse. Esta secreção aumentada de GC está relacionada a muitas doenças da senilidade como depressão, *déficits* cognitivos e Doença de Alzheimer (MIZOGUSHI et al., 2009). Para De Martinis et al. (2005), esta é uma das características da imunossenescência, ou seja, a diminuição da capacidade de responder ao estresse. A inevitável superexposição crônica a estressores determina uma ativação altamente patogênica do sistema estresse-resposta levando a uma redução progressiva da capacidade de recuperação.

4.2. O sistema nervoso do indivíduo senil

No indivíduo senil, de acordo com Ron-Harel e Schwartz (2009), ocorre uma substancial redução da neurogênese, que pode estar relacionada a uma redução da manutenção imune ou a uma superexposição a uma resposta inflamatória local, característica do envelhecimento.

As alterações mais freqüentes do envelhecimento cerebral, que são coincidentes em todos os mamíferos, são a perda celular, a diminuição da densidade dendrítica ou sináptica e a ocorrência de lesões histológicas específicas como formação de placas senis, emaranhado neurofibrilar e degenerações grânulo-vasculares (BARKATS et al., 1996; DANI et al., 1997).

McEwen et al. (1997) apresentaram evidências de que o estresse crônico, com aumento dos níveis de GC, causa perda degenerativa de neurônios piramidais no hipocampo e subseqüentes *déficits* de memória e função cognitiva em ratos. Estes danos hipocampais alteram o *feedback* negativo dos GCs promovendo altos níveis deste hormônio e causando um dano acumulativo conhecido como “hipótese da cascata de GCs”. Em modelos animais e em humanos este é considerado o principal mecanismo patogênico de doenças neurodegenerativas associadas ao eixo HPA (SWAAB, 2005).

O córtex pré-frontal e o hipocampo têm um importante papel na manutenção das funções cognitivas e de memória que são freqüentemente prejudicadas com o envelhecimento. Estudos recentes mostram uma alteração na regulação do eixo HPA associada com o volume diminuído do córtex pré-frontal de humanos idosos. Associado a isso, uma disfunção deste córtex ou atrofia do hipocampo são observados em pacientes depressivos, tanto animais como

humanos e em pacientes com Doença de Alzheimer (PARDON, 2007; FRANCESCHI et al., 2007; MIZOGUCHI et al., 2009).

A ciência e a medicina vêm tentando compreender a patofisiologia de doenças neurodegenerativas que aumentam sua incidência com o processo de envelhecimento, principalmente as de caráter cognitivo que levam a perda de memória (ROSENZWEIG; BARNES, 2003). Baseado nisso o hipocampo tem sido a estrutura mais estudada em modelos animais, devido a sua correlação com aprendizado, memória e déficits cognitivos (BARKATS et al., 1996).

4.3. O sistema imune do indivíduo senil

O termo imunossenescência, usualmente, refere-se à noção de que existe uma correlação entre idade e disfunção do sistema imune (KRABBE et al., 2004). Ele tem sido bem caracterizado pelo declínio do sistema imune adaptativo com troca de função, mudanças clonais e remodelação do perfil celular.

O sistema imune pode ser esquematicamente dividido em uma parte ancestral ou inata, representada, principalmente, por monócitos, células dendríticas (DC) e NK; e em uma parte filogeneticamente jovem, representada pelos linfócitos B e T adaptativos. Durante o decorrer da idade, o sistema imune percorre diferentes caminhos, onde o inato é mais bem preservado e o adaptativo, mais sofisticado e apto a reconhecer antígenos específicos, passa a declinar-se (SANSONI et al., 2007).

A imunidade inata constitui a primeira linha de defesa contra os agentes infecciosos e a identificação não específica destes agentes requer a ligação de padrões moleculares associados a patógenos, via receptores de reconhecimento como os “toll-like receptors” (TLR), expressos em vários leucócitos como macrófagos, neutrófilos, DCs e NKs (BAUER et al., 2009).

De acordo com Malaguarnera et al. (2010), macrófagos e DCs ligam-se especificamente a células apoptóticas através dos TLRs e intervêm na fagocitose de corpos apoptóticos. Os TLRs, expressos nas células apresentadoras de antígenos (APCs) são receptores para HSPs e mediam sua sinalização. Estas HSPs têm sua expressão induzida por diferentes tipos de estresse e funcionam como chaperonas, promovendo o processamento e apresentação de antígenos através da ligação a pequenos peptídeos.

O número de neutrófilos também diminui na velhice, assim como sua capacidade quimiotática e de fagocitose ficam comprometidas. Isso porque o envelhecimento afeta a ativação das vias de transdução envolvidas no resgate dos neutrófilos da apoptose, aumentando sua susceptibilidade a este processo, sendo este um importante contribuinte para a alterada resposta inflamatória senescente (GOMEZ et al., 2008).

Franceschi et al. (2000b) afirmam serem as células NK as principais responsáveis pela atividade citotóxica contra células tumorais, geradas espontaneamente por agressões químicas ou virais e o seu número total circulante é aumentado em indivíduos senis quando comparados aos jovens. O aumento do número de células NK em idosos tem sido visto como um mecanismo compensatório para a diminuição da atividade citotóxica por célula nos senis. Vários fatores podem influenciar a diminuída funcionalidade das NKs como uma menor resposta a citocinas, níveis hormonais reduzidos ou níveis baixos de íon zinco e uma possível mudança, idade relacionada, na via dependente da proteína C quinase (GOMEZ et al., 2008; MALAGUARNERA et al., 2010).

Com o avançar da idade, o sistema imune tende a sofrer uma desestruturação, atribuída, principalmente, a mudanças no funcionamento de células T. Os linfócitos T de humanos e camundongos idosos tornam-se comprometidos e as células de memória falham em proliferar adequadamente e secretar IL-2 sob estímulo de mitógenos, antígenos ou ligação de receptores anticorpo-mediada (MALAGUARNERA et al., 2001; KRICHEVSKY et al., 2004).

As células T podem ser geradas de duas maneiras, ou seja, pelo desenvolvimento de precursores de linfócitos T e células tronco, ou por proliferação homeostática onde as células T virgens funcionam como progenitoras (GORONZY et al., 2007). Na velhice, o acúmulo de células T diferenciadas e não proliferativas compromete o espaço imunológico, diminuindo a resposta de defesa e favorecendo o surgimento de doenças relacionadas à senilidade (SANSONI et al., 2007).

O declínio no influxo de novas células T circulantes resulta também na diminuição do número de células T “virgens” (CD45RA+) e compromete a imunidade célula mediada. Uma das principais características da imunossenescência é o acúmulo da expansão de clones de memória (CD45RO+)

e de células efetoras em consequência da contínua exposição à vários antígenos durante a vida (BAUER et al., 2009).

A relação CD4/CD8 é relativamente afetada em indivíduos senis. A contagem da subpopulação de células T revela um aumento na frequência de células T CD4+ e CD8+ (FRANCESCHI et al., 2000b; SANSONI et al., 2007). As células T CD8+ de pessoas senis apresentam uma resistência a apoptose, perfil alterado de citocinas, alteração de várias funções, encurtamento de telomere, reduzida habilidade em resposta ao estresse e permanente perda de expressão de CD28+ com acúmulo progressivo de CD28- (McELHANEY; EFFROS, 2009; MALAGUARNERA et al., 2010). Segundo De Martinis et al. (2005), uma combinação de altos níveis de células T CD8+ e baixos níveis de CD4+, associados a uma pobre proliferação de células T em resposta a mitógenos pode ser um marcador da morbidade e mortalidade em indivíduos senis.

A fase efetora da resposta imune adaptativa é mediada por citocinas e diferentes subpopulações de células T CD4+ sintetizam citocinas específicas denominadas células Th1 (Interferon gama (INF γ), IL-2, linfotóxina α) ou Th2 (IL-4, IL-10). Tanto em humanos como em modelos murinos, o envelhecimento tem sido associado a uma troca neste perfil de citocinas de Th1 para Th2 acompanhada por um perfil de citocinas pró-inflamatórias e aumento de células NKT (GLOBERSON; EFFROS, 2000; JING et al., 2007).

Danos ao DNA, resultantes de insultos genotóxicos, ou até mesmo espontâneos, também podem levar a uma instabilidade genômica, com declínio de função de células T, morte celular ou desenvolvimento do potencial tumorigênico. Isto pode estar diretamente correlacionado a mutações ocasionadas pelo envelhecimento (KRICHEVSKY et al., 2004; WENG, 2006).

Em nível celular, observa-se uma alteração na geração de imunoglobulinas nas células B, que contribui para o declínio da qualidade da resposta humoral na senilidade. Também há uma associação de aumento de incidência de malignidade de células B em função da expansão oligoclonal nestes indivíduos senis (WENG, 2006).

Segundo Malaguarnera et al. (2010), estudos em modelos murinos têm demonstrado que os anticorpos produzidos em camundongos senis possuem baixa afinidade por seus alvos e são ineficientes na prevenção da infecção. Apesar do significativo declínio na produção de células B em camundongos senis, o

número destas células permanece constante periféricamente. Uma das razões para este fenômeno seria o pool de células B periféricas encontrarem-se saturado de uma maneira similar ao que acontece na homeostase de células T no idoso. Porém, outra possível explicação, é que células B periféricas em camundongos refletem uma diminuição na geração de células B e um aumento na longevidade de células B periféricas. Como consequência da alterada composição do pool de células B, ocorre uma diminuição da duração da resposta humoral em idosos quando comparada a de jovens.

Um estímulo imune contínuo ao longo da vida estabelece um status pró-inflamatório crônico, caracterizado pelo aumento sérico de citocinas e outros fatores pró-inflamatórios (TNF- α , IL-1, IL-6), além de proteínas de fase aguda. Ocorre também um acúmulo de ROS, aumentando a resistência das células à apoptose, favorecendo os linfócitos senescentes e a carga antigênica crônica. Este fenômeno, denominado “inflammaging” foi concebido para explicar estas alterações inflamatórias decorrentes da velhice (FRANCESCHI et al., 2000a) e o desequilíbrio pró-inflamatório torna-se um importante parâmetro nas principais doenças senis, como arteriosclerose, demência, osteoporose e câncer (HOCKING, 2005; SANSONI et al., 2007).

A “inflammaging” parece ser um fenômeno universal que acompanha o processo de envelhecimento e que está relacionada à morbidade e mortalidade. No entanto, indivíduos senis com baixa atividade inflamatória apresentam um envelhecimento saudável, sugerindo que este fenômeno pode estar melhor relacionado ao envelhecimento patológico ou a doenças mais comuns da senilidade como por exemplo, a hipertensão (BAUER et al., 2009). Entretanto, toda ineficiência do sistema imune senil é desencadeada pela atrofia tímica, levando a um declínio na contribuição dos emigrantes tímicos ao repertório de células T virgens (ASPINALL; ANDREW, 2001; MALAGUARNERA et al., 2001).

4.4. Efeitos do estresse sobre o sistema nervoso do indivíduo senil

A atividade neuroendócrina em situações de estresse crônico, nem sempre está aumentada em indivíduos senis. Segundo Pardon (2007), algumas linhagens de ratos Fisher 344 não apresentam mudanças nos níveis plasmáticos de ACTH e CC em idade avançada. Já ratos Sprague-Dawley velhos apresentam

níveis elevados de CC. Ambas as linhagens, porém, apresentaram comprometimento da memória.

Uma baixa neurogênese no hipocampo de animais senis pode estar relacionada à neurotoxicidade dos GCs, uma vez que progenitores neurais do GD expressam GR e MR. Esta hipótese é sustentada por experimentos que mostram que a adrenalectomia em ratos senescentes estimula a proliferação celular no GD. Da mesma forma que a administração de antagonistas de GR, como o RU486, restaura a neurogênese em roedores com altos níveis de GC provenientes do estresse (DE NICOLA et al., 2009).

Alguns hormônios como estradiol e fator de crescimento como insulina I (IGF-I) podem antagonizar os danos dos esteróides da adrenal. O IGF-I atenua o déficit de aprendizagem em ratos senis submetidos a estresse e o estradiol promove a neurogênese no hipocampo. Estes hormônios liberados atuam como neuroprotetores (GARCIA-SEGURA et al., 2007).

Estudos de gerontologia em modelos como no nematóide *Caenorhabditis elegans* ou na mosca da fruta (*Drosophila melanogaster*), têm mostrado que a longevidade é geneticamente determinada pelos mesmos genes envolvidos na resistência ao estresse. Dados epidemiológicos humanos indicam que a longevidade está associada a uma qualidade de vida ruim e redução da função cognitiva (OTTAVIANI; FRANCESCHI, 1998).

Paradoxalmente, Franceschi et al. (2008), estudando uma população de centenários italianos e comparando a indivíduos senis (70 a 80 anos), constataram que os centenários apresentam um melhor *status* de saúde, além de menor incidência de doenças neurodegenerativas. Isto sugere que alguns genes da longevidade estão envolvidos na eficiência do envelhecimento cognitivo (PARDON, 2008) e que alguns determinantes genéticos da longevidade residem no polimorfismo dos genes que regulam a resposta imune (FRANCESCHI et al., 2008), levando à hipótese de que a resposta ao estresse faz parte do mecanismo de envelhecimento.

Os efeitos dos fatores ambientais na reversão do envelhecimento como exercícios, restrição calórica, ambiente enriquecido, têm sido bem documentados em roedores e outras espécies não humanas (MATTSON et al., 2001). Também várias terapias vêm sendo testadas, como dietas, drogas antidepressivas, na tentativa de reverter os danos neurodegenerativos do envelhecimento

(FAROOQUI; FAROOQUI, 2009). Outras possibilidades terapêuticas visando uma neurorecuperação seriam exercícios moderados (RON-HAREL; SCHWARTZ, 2009) e restrição calórica que, comprovadamente retardam o envelhecimento de células T pelo aumento dos níveis de células T virgens e preservação do repertório de TCRs (YANG et al., 2009).

O processo de estresse crônico necessita de informações mais detalhadas sobre marcadores celulares e moleculares, que proporcionem intervenções efetivas sobre seus efeitos neuronais. Neste contexto os roedores oferecem boa oportunidade de responderem, em um curto prazo, as análises neurobiológicas, principalmente pelas similaridades das funções cerebrais, comportamento biológico e social em relação aos humanos (CIRULLI et al., 2009).

Pardon (2007) afirma que o processo de envelhecimento não afeta a capacidade de iniciar uma resposta ao estresse e o grau de ativação do eixo HPA pode aumentar ou diminuir com a senilidade. No entanto, a habilidade em terminar esta resposta é diminuída, assim como a atenuação da resposta neuroprotetora, que está associada a uma reduzida resposta neuroadrenérgica. Esta característica fica bem definida pelo declínio da função motora observada durante o envelhecimento.

5. O TIMO

O timo é um órgão linfóide primário localizado na porção anterior do mediastino e é estruturado em região subcapsular, cortical e medular que geram continuamente células T exportadas para a periferia. O desenvolvimento de células T constitui um processo intrínseco de trocas celulares onde uma rede de tipos de células estromais tímicas promove sinais moleculares requeridos para uma maturação, expansão e seleção apropriada de precursores de células T imunocompetentes, conhecidas como timócitos. Combinadas, estas células estromais promovem o microambiente tímico requerido para o desenvolvimento de células T (PETROVIC-DERGOVIC et al., 2007; SHANLEY et al., 2009; HOLLÄNDER et al., 2010).

O timo sofre uma involução estrutural com a idade, levando a um declínio no número de células T virgens (HIROKAWA et al., 1998; ASPINALL; ANDREW, 2001; SHANKER, 2004; MONTECINO-RODRIGUEZ et al., 2005; CHIDGEY et al.,

2007). Ocorre perda das células epiteliais tímicas e um aumento no espaço perivascular, com infiltrado de adipócitos e células T duplo positivas, bem como o aumento da cavidade cística (QUAGLINO et al., 1998). No entanto, mesmo havendo uma significativa perda de celularidade, tem-se documentado que, independente desta atrofia, o timo permanece parcialmente funcional e seus microambientes são capazes de gerar células T em níveis reduzidos (HICE et al., 2008).

O microambiente tímico compreende diferentes tipos celulares com funções distintas, tais como as células epiteliais tímicas (TEC), células dendríticas, macrófagos e fibroblastos. Uma seleção positiva é orientada pelas TEC e a negativa é secundária a uma interação envolvendo timócitos com DCs ou TECs medulares (SAVINO; DARDENE, 2010).

O processo de maturação e diferenciação de células T envolve a expressão de várias proteínas e rearranjo de genes receptores de células T (TCR). Os timócitos mais imaturos não expressam nem TCR, nem moléculas CD4 ou CD8, sendo denominadas células duplo-negativas (DN). Sua maturação está relacionada a uma organização do locus β TCR (seleção beta) que é acompanhada pela proliferação e expressão de co-receptores de CD4 e CD8, passando para o estágio duplo-positivo (DP) do locus TCR α e resultando na expressão de TCR $\alpha\beta$ na membrana celular (PESIC et al., 2009).

Os timócitos que não são submetidos ao rearranjo produtivo do gene TCR $\alpha\beta$ morrem por negligência e aqueles submetidos interagem com peptídeos apresentados pelas moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC). Esta interação determina os eventos de seleções negativa e positiva, essenciais para diferenciação e maturação dos timócitos formando o futuro repertório de células T que sai do timo para a periferia (MIOSGE; ZAMOYA, 2007; PESIC et al., 2009).

A principal função dos macrófagos tímicos é a fagocitose de timócitos apoptóticos e a dos fibroblastos é atuar na progressão de TCR-CD4-CD8- para TCR+CD4+CD8+. No córtex as TCRs adquirem uma forma linfopitelia denominadas células enfermeiras tímicas (TNC) onde uma simples célula epitelial tem a capacidade de cuidar de vários timócitos (PHEE et al., 2010; SAVINO; DARDENE, 2010).

A tolerância de células B é primariamente originada em função da ausência de células T auxiliares, tendo o timo e os linfócitos T um papel predominante no estabelecimento da tolerância e desenvolvimento da auto-imunidade. Associado a isso, muitos dados experimentais evidenciam que o rompimento da via tolerogênica ocorrida durante a diferenciação celular intra-tímica constitui o principal evento para desencadear doenças auto-imunes (CHIDGEY et al., 2007; GEENEN, 2010).

O timo é inervado pelas fibras simpáticas que usam a NA como principal neurotransmissor. Não só os linfócitos do sangue periférico, mas também os timócitos e as células tímicas não linfóides sintetizam catecolaminas, demonstrando que a NA age como neurotransmissor entre os nervos simpáticos e as células tímicas, atuando também como imunotransmissor. De acordo com Pesic *et al.* (2009), isso comprova a existência de uma rede endócrina dentro do sistema imune. Desordens hormonais podem acelerar a involução fisiológica do timo, que também sofre influência de outros fatores exógenos como estresse, dieta, radiação ionizante e endotoxinas bacterianas (QUAGLINO et al., 1998).

A obesidade também induz uma aceleração da involução tímica e restrição da diversidade do repertório de células T, representando uma modificação dos mecanismos de imunossenescência que podem aumentar os riscos e severidade de infecções. Yang et al. (2008) sugerem que a restrição calórica previne a perda de células TECs durante o envelhecimento e o aumento nos fibroblastos com redução na transição de reguladores epitelial-mesenquimal no timo.

Já a involução tímica relativa ao envelhecimento é acompanhada da redução da vigilância imune aumentando o risco e severidade de infecções, certos tipos de câncer, falhas vacinais e reconstituição tardia de células T em pacientes submetidos a transplante de células tronco hematopoiéticas, levando ao declínio da imunidade adaptativa (DIXIT, 2010).

As três principais causas desta involução senil são: a) redução do número e aumento de defeito das células tronco hematopoiéticas; b) perda de células epiteliais tímicas e deterioração do estroma; c) fatores circulantes extrínsecos afetando o microambiente como aumento da produção de esteróides sexuais, perda de citocinas e fatores de crescimento como IL-7 e GH (CHIDGEY et al., 2007; DIXIT, 2010).

O envelhecimento é caracterizado pela grande redução no número de timócitos e marcante perturbação no microambiente das células estromais tímicas (DOUEK; KOUP, 2000). Ao contrário do timo jovem, onde os timócitos são os principais constituintes do microambiente, os adipócitos constituem a maioria do espaço celular do timo envelhecido. A transformação adipogênica do timo com o avançar da idade é uma incógnita, especialmente porque para o propósito de produção de células T virgens, os adipócitos não têm papel direto no desenvolvimento de células T (DIXIT, 2010; PERISIC et al., 2010).

A perda de timócitos precede a formação de adipócitos. Já foi demonstrado que adipócitos e timócitos têm contato célula-célula no timo durante o envelhecimento, caracterizando que os primeiros não são células inertes e secretam citocinas e hormônios. Estes influenciam o ambiente local e sistêmico da função imune (DIXIT, 2010).

De acordo com Hsu e Mountz (2010), a leptina pode ter uma associação com a timopoiese, uma vez que seus receptores são expressos na medula tímica e ela atua na proteção contra a atrofia induzida pelo estresse deste órgão. Este hormônio é derivado do tecido adiposo e age em regiões específicas do cérebro regulando a ingestão de alimentos, o desprendimento energético e está estruturalmente relacionada às citocinas, agindo em receptores similares aos da superfamília das citocinas.

Indivíduos nonagenários que exibem altos níveis circulantes de leptina também apresentam alta porcentagem de células T virgens TREC⁺ CD28⁺ CD95⁻ CD8 nas células mononucleares de sangue periférico, o que sugere que este hormônio pode ter um efeito benéfico sobre a timopoiese e manutenção das células T virgens, interferindo na expectativa de vida do indivíduo. Contraditoriamente, altos índices de gordura corporal, principalmente visceral ou mesentérica, estão diretamente correlacionados a síndrome metabólica e uma forte resposta inflamatória, uma vez que o tecido adiposo promove também a secreção e liberação de altos níveis de IL-6, TNF- α e proteína C-reativa (HSU; MOUNTZ, 2010).

Recentemente, a Universidade de Stanford divulgou um estudo clínico do uso de GH revelando que a administração deste hormônio em idosos saudáveis aumentou a massa muscular em aproximadamente 2 kg e diminuiu a gordura corporal, além de promover a perda da gordura tímica (TAUB et al., 2010).

Os benefícios terapêuticos do GH como imunomodulador foram demonstrados em estudos onde o aumento da celularidade tímica elevou os números de emigrantes tímicos e aumentou o repertório TCR nas células periféricas. Este hormônio também acelera recuperação de timócitos e a reconstituição de compartimentos periféricos de células T. No entanto, GH por si não é requerido para uma timopoiese normal, visto que camundongos deficientes de GH, isentos de condições de estresse, apresentam um desenvolvimento linfóide regular (DIXIT, 2010; HOLLÄNDER et al., 2010).

Em humanos, a administração de GH exógeno aumenta a celularidade tímica, mas não regenera a atrofia do timo nem o transforma em um timo jovem. No entanto, sob o ponto de vista clínico, é uma terapia suficiente para recuperação da produção de células T (CHIDGEY et al., 2007).

A involução tímica que se inicia na puberdade coincide com o aumento da produção de esteróides gonadais. Segundo Perisic et al. (2010), a elevação dos níveis destes hormônios em roedores de ambos os sexos induz a uma atrofia tímica similar a observada em ratos idosos. Recentes pesquisas têm demonstrado que o efeito da gonadectomia peripuberal na celularidade tímica pode ser transitório, uma vez que após 20 semanas, pacientes gonadectomizados apresentaram ambiente tímico semelhante aos controles não operados. Sugere-se que modificações peripuberais nas glândulas gonadais e involução tímica são dois eventos com causas não diretamente associadas (MONTECINO-RODRIQUEZ, 2005; PERISIC et al., 2010).

De acordo com Perisic et al. (2010), os esteróides gonadais podem iniciar ou contribuir substancialmente para a involução tímica onde defeitos associados ao envelhecimento hematopoiéticos intrínsecos ou estromais extrínsecos aumentam a progressão da involução tímica. Outra possibilidade é que a duração limitada do rejuvenescimento gonadectomia-induzido pode levar a uma produção compensatória de andrógenos pelas células tímicas e de estrógenos pela adrenal e tecido adiposo.

Segundo Montecino-Rodriquez et al. (2005), ratas de dois meses de idade ovariectomizadas, quando avaliadas aos 20 meses, demonstraram um processo contínuo de involução tímica, sugerindo que este é um processo resultante da interrupção do feedback endócrino que aumenta o tamanho do timo inicialmente.

No entanto, o organismo eventualmente se adapta a esta alteração endócrina e o timo retorna ao tamanho normal.

Independentemente das terapias de reversão da atrofia tímica, vários marcadores celulares, sorológicos e genéticos são reconhecidos para caracterizar a imunossenescência. O elemento principal na pesquisa de biomarcadores do envelhecimento é o entendimento das alterações básicas do processo biológico da velhice, capaz mensurar de forma mais eficiente a taxa de envelhecimento do que a idade cronológica (SPROTT, 2010). Um esquema das alterações imunológicas no decorrer da vida é apresentado na Figura 2.



Fonte: Adaptado de Montecino-Rodriguez et al. (2005).

Figura 2 - Desenho esquemático das principais características da remodelagem do sistema imune peculiar da imunossenescência.

Este esquema pode ser interpretado como o resultado da perda antigênica ao longo da vida e pela habilidade do SI em adaptar-se e combater os efeitos dos estímulos antigênicos repetidos e crônicos, assim como o acúmulo de produtos do metabolismo oxidativo. De certa forma, é a função fisiológica de defesa do SI que determina a imunossenescência e, paradoxalmente, representa o principal determinante da incidência de doenças relacionadas ao envelhecimento (MONTECINO-RODRIGUEZ et al., 2005).

6. DIFERENÇAS ENTRE GÊNEROS

6.1. O dimorfismo sexual no sistema imunológico e na senilidade

O dimorfismo sexual varia amplamente entre as espécies, sendo que em roedores, o hipotálamo pode chegar a ser até cinco vezes maior nos machos. Já na espécie humana onde o estilo comportamental é muito semelhante entre homens e mulheres, o dimorfismo é praticamente indetectável (BEAR et al., 2008).

Nas diferentes espécies, ele é demonstrado nos índices funcionais tímicos e também nas taxas de maturação de timócitos. Esta dicotomia é responsável por traçar uma rota para estas diferenças na resposta imune (LEPOSAVIC et al., 2009).

A prevalente hipótese para diferenças imunológicas entre sexos é que os esteróides sexuais, particularmente a testosterona, 17β - estradiol e progesterona influenciam o funcionamento de células imunes por ligar a receptores específicos que são expressos em vários tecidos linfóides, macrófagos e células dendríticas. A ligação dos esteróides sexuais aos seus respectivos receptores esteróides influencia diretamente as vias de sinalização celulares, incluindo o fator nuclear κ B (NF- κ B), cJUN e fator regulador de interferon, resultando na produção de diferentes citocinas e quimiocinas (KLEIN et al., 2010).

Numerosos aspectos da resposta imune diferem entre machos e fêmeas, sendo esta observação verdadeira para muitas espécies e aplicada tanto à resposta humoral quanto a celular. Este dimorfismo é, provavelmente, mediado pelos esteróides sexuais circulantes, uma vez que análises entre a relação de CD4+ e CD8+ em homens senis e mulheres pós-menopausa, não apresentaram diferenças (SELI; ARACI, 2002).

Fatores genéticos também interferem nestas diferenças sexuais sobre a função imune. Dos mais de 1.100 genes identificados no cromossomo X, muitos estão correlacionados ao dimorfismo imune, incluindo receptores protéicos, efetores transcricionais e translacionais. Da mesma forma, o estrógeno e a progesterona atuam na imuno-regulação e receptores de estrógeno (ER α e ER β) são expressos nas células B, T, DC e NK (DARNALL; SUAREZ, 2009).

Altas concentrações de estrógeno causam involução tímica pelo aumento da apoptose de timócitos e inibição da proliferação dos mesmos. Em um experimento injetando testosterona em fêmeas de rato no período perinatal, verificou-se o aumento na porcentagem de linfócitos CD8+ acompanhado de um proporcional decréscimo de CD4+, além de um fenótipo de timócitos imaturos (LEPOSAVIC et al., 2009).

Estrógenos e andrógenos têm efeitos similares na celularidade tímica, mas efeitos diferentes na taxa de maturação de timócitos simples positivo (SP): os estrógenos aumentam as células CD4+CD8- e a privação de andrógenos causa um aumento das células CD4-CD8+ (LEPOSAVIC et al., 2009).

Por outro lado, andrógenos, incluindo dihidrotestosterona e testosterona, podem suprimir a atividade de células imunes, mas também aumentam a síntese de citocinas anti-inflamatórias como IL10. Comparando homens saudáveis e aqueles com deficiência de andrógenos, estes últimos apresentam maiores concentrações de citocinas inflamatórias (IL1 β , IL2 e TNF α), maiores títulos de anticorpos e uma maior relação de células T CD4 comparadas a CD8 (KLEIN et al., 2010; DARNALL; SUAREZ, 2009).

Machos de diversas espécies, desde nematóides, insetos, peixes, répteis, aves e mamíferos, incluindo o homem, têm uma menor expectativa de vida em relação às fêmeas. Várias são as hipóteses para explicar esta diferença, incluindo o comportamento do macho de enfrentar riscos até uma maior vulnerabilidade às infecções (SELI; ARICI, 2002).

A administração de testosterona aumenta a susceptibilidade a infecções ao passo que machos castrados, ou que receberam administração de estrógeno, apresentam um efeito contrário. Um exemplo disso é a resistência a infecção por micobactérias, onde a castração causa um aumento na resistência ao hospedeiro e a administração de testosterona reverte o tratamento. Da mesma forma que o uso de testosterona em fêmeas diminui a resposta a este microorganismo

(LEPOSAVIC et al., 2009). Em contrapartida há o aumento da incidência de doenças autoimunes nas fêmeas (HINCE et al., 2008).

Uma das prováveis explicações para este dimorfismo sexual na resposta imune é um mecanismo compensatório para o estresse fisiológico que acompanha a gestação (SELI; ARICI, 2002).

6.2. O dimorfismo sexual no sistema nervoso e na senilidade

O envelhecimento saudável humano é acompanhado por mudanças na estrutura cerebral com variações entre sexos. Um aumento precipitado no volume ventricular começa a ser evidente em homens com mais de cinquenta anos, mas só aparece em mulheres após os sessenta anos, sugerindo que a atrofia cerebral começa mais cedo nos homens (JOËLS et al., 2007). No entanto, a velocidade do processo de atrofia do envelhecimento é maior na mulher. As perdas de tecido cerebral são maiores em machos, nos lobos temporal e frontal, e são maiores em fêmeas no hipocampo e lobo parietal. Justificando assim que as fêmeas são mais susceptíveis a doenças neurodegenerativas como a Doença de Alzheimer (WRONA, 2006).

Outro exemplo das variações das respostas entre gêneros é que machos submetidos a um modelo de estresse crônico com imobilidade, apresentaram perda na performance nos testes de memória. Neste mesmo teste, as fêmeas, também submetidas ao mesmo estressor crônico, apresentaram melhora na memória espacial além de não modificarem a resposta em reconhecer objetos (JOËLS et al., 2007).

Existe uma estreita sincronia entre a organização/desenvolvimento dos centros hipotalâmicos e a regulação da função gonadal na geração de células imuno-competentes. O que evidencia uma interdependência entre o desenvolvimento do eixo HPG e o eixo timo-linfático (LEPOSAVIC et al., 2009; KUDIELKA; KIRSHBAUN, 2005).

A diferenciação sexual do sistema nervoso central está relacionada à produção de hormônios sexuais, ou seja, os androgênios geram um sinal para masculinização do SN, enquanto os esteróides podem atuar de duas maneiras: alterando a excitabilidade da membrana dos neurônios ou ligando-se a receptores de esteróides e interferindo na transcrição gênica (BEAR et al., 2008).

O cérebro de roedores, e provavelmente de todos os mamíferos, é, inerentemente, feminino ou bipotencial. Na ausência de andrógenos testiculares durante o final do período pré-natal e nos primeiros 10 dias após o nascimento, as regiões cerebrais que controlam a função reprodutiva, desenvolvem-se de maneira passiva. Na presença deste hormônio ocorre a defeminização ou masculinização, levando a remodelagem fenotípica dos compartimentos periféricos de células T e comprovando o papel dos hormônios sexuais, que atuam a nível tímico, estabelecendo o dimorfismo sexual na resposta imune (LEPOSAVIC et al., 2009).

Entre os sexos, diferenças estruturais no cérebro têm sido identificadas por meio de análises morfométricas e recursos de imagens (COHEN, 1995). Em detrimento do maior volume cerebral no sexo masculino, devido a um maior volume da substância branca, o cérebro feminino possui maior quantidade de substância cinzenta além de uma maior complexidade nas regiões do córtex frontal e parietal. Hormônios corticais sexuais podem ser os responsáveis por estas diferenças específicas de habilidades ou comportamento (DARNALL; SUAREZ, 2009).

7. CONCLUSÃO

O estresse crônico aumenta a exposição dos tecidos ao cortisol, tornando o organismo mais susceptível ao desenvolvimento de doenças relacionadas ao estresse. O processo de envelhecimento se assemelha a uma reação inflamatória em função do perfil imunológico adquirido pelo indivíduo senil. Estas alterações imunológicas são coincidentes com a involução e atrofia tímica, cuja compreensão está diretamente relacionada ao entendimento da imunossenescência. Indivíduos submetidos a uma carga de estresse crônico podem apresentar envelhecimento prematuro, com prejuízo dos sistemas imunológico e nervoso, mas a resposta aos estressores pode ser diferente entre gêneros. Desta forma, o estresse associado ao envelhecimento aumenta a susceptibilidade a doenças neurodegenerativas e seu adequado manejo pode melhorar a qualidade de vida na senilidade. O uso de modelos animais agiliza a obtenção de respostas clínicas e é favorecido pela equivalência da imunossenescência entre homens e murinos.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASPINALL, R.; ANDREW, D. Age-associated thymic atrophy is not associated with a deficiency in the CD44⁺CD25⁺CD32⁺CD42⁺CD82⁺ thymocyte population. **Cellular Immunology**, v. 212, p. 150-157, 2001.

BARKATS, M.; BERTHOLET, J.Y.; COHEN-SALMON, C. Age-related morphological changes in the hippocampus in two mouse strains. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 87, p. 155-164, 1996.

BARTKE, A.; BROWN-BORG, H.M.; BODE, A.M.; CARLSON, J.; HUNTER, W.S.; BRONSON, R.T. Does growth hormone prevent or accelerate aging? **Experimental Gerontology**, v. 1, n. 7/8, p. 675-687, 1998.

BAUER, M.E.; JECKEL, C.M.M.; LUZ, C. The role of stress factors during aging of the immune system. **Neuroimmunomodulation**, v. 1153, p. 139-152, 2009.

BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso**. 3.ed. São Paulo: Artmed, 2008. 896 p.

BECKMAN, K.B.; AMES, B.N. The free radical theory of aging matures. **Physiology Review**, v. 78, p. 547-581, 1998.

BERAN, M.S.; LAOURI, M.; SUTTORP, M.; BROOK, R. Medication costs: the role physicians play with their senior patients. **Journal American Geriatric Society**, v. 55, p. 102-107, 2007.

BLACK, P.H. Stress and the inflammatory response: A review of neurogenic inflammation. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 16, p. 622-653, 2002.

BERAN, M.S.; LAOURI, M.; SUTTORP, M.; BROOK, R. Medication costs: the role physicians play with their senior patients. **Journal American Geriatric Society**, v. 55, p. 102-107, 2007.

BROWN-BORG, H.M. Hormonal control of aging in rodents: the somatotrophic axis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 299, p. 64-71, 2009.

BROWN-BORG, H.M. Hormonal regulation of longevity in mammals. **Ageing Research Reviews**, v. 6, p. 28-45, 2007.

BROWN-BORG, H.M.; RAKOCZY, S.G. Growth hormone administration to long-living dwarf mice alters multiple components of the antioxidative defense system. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 124, p. 1013-1024, 2003.

BUCHANAN, T.W.; TRANEL, D.; KIRSCHBAUM, C. Hippocampal damage abolishes the cortisol response to psychosocial stress in humans. **Hormones and Behavior**, v. 56, p.44-50, 2009.

CARRASCO, G.A.; VAN DE KAR, L.D. Neuroendocrine pharmacology of stress. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p. 235-272, 2002.

CHEN, Y.; WU, C.; KAO, C.; TSAI, T. Longevity and lifespan control in mammals: lessons from the mouse. **Ageing Research Reviews**, v. 9, p. S28-S35, 2010.

CHIDGEY, A.; DUDAKOV, J.; SEACH, N.; BOYD, R. Impact of niche aging on thymic regeneration and immune reconstitution. **Seminars in Immunology**, v. 19, p. 331-340, 2007.

CIRULLI, F.; FRANZIA, N.; BERRY, A.; ALOE, L.; ALLEVA, E.; SUOMI, S.J. Early life stress as a risk factor for mental health: Role of neurotrophins from rodents to non-human primate. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 33, p. 573-585, 2009.

COE, C.L.; LAUDENSLAGER, M.L. Psychosocial influences on immunity, including effects on immune maturation and senescence. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 21, p. 1000-1008, 2007.

COHEN, G.D. **O cérebro no envelhecimento humano**. São Paulo: Organização Andrei, 1995. 291 p.

DANI, S.U.; HORI, A.; WALTER, G.F. **Principles of neural aging**. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Science, 1997. 461 p.

DARNALL, B.D.; SUAREZ, E.C. Sex and gender in psychoneuroimmunology research: past, present and future. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 23, p. 595-604, 2009.

DE MARTINIS, M.; FRANCESCHI, C.; MONTI, D.; GRINALDI, L. Inflamm-aging and lifelong antigenic load as major determinants of ageing rate and longevity. **FEBS Letters**, v. 579, p. 2035-2039, 2005.

DE NICOLA, A.F.; PIETRANERA, L.; BEAUQUIS, J.; FERRINI, M.G.; SARAIVA, F.E. steroid protection in aging and age-associated diseases. **Experimental Gerontology**, v. 44, p. 34-40, 2009.

DEVRIES, E.M.; RAN, L.; KELVIN, D.J. On the edge: the physiological and pathophysiological role of chemokines during inflammatory and immunological responses. **Seminars in Immunology**, v. 11, p. 95-104, 1999.

DHABHAR, F.S.; McEWEN, B.S.; SPENCER, R.L. Adaptation to prolonged or repeated stress-comparison between rat strains showing intrinsic differences in reactivity to acute stress. **Neuroendocrinology**, v. 65, p.360-368, 1997.

DIXIT, V.D. Thymic fatness and approaches to enhance thymopoietic fitness in aging. **Current Opinion in Immunology**, v. 22, p. 521-528, 2010.

DOUEK, D.C.; KOUP, R.A. Evidence for thymic function in the elderly. **Vaccine**, v. 18, p. 1638-1641, 2000.

FAROOQUI, T.; FAROOQUI, A.A. Aging: an important factor for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 130, p. 203-215, 2009.

FELDER, L.F.; INSERRA, F.; BASSO, N. Advances in our understanding of aging: role of the renin-angiotensin system. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 2, p. 189-194, 2002.

FERRIS, C.F.; STOLBERG, T. Imaging the immediate non-genomic effects of stress hormone on brain activity. **Psychoneuroendocrinology**, v. 35, p. 5-14, 2010.

FRANCESCHI, C.; BONAFÉ, M.; VALENSIN, S. Human immunosenescence: the prevailing of innate immunity the failing of clonotypic immunity, and the filling of immunological space. **Vaccine**, v. 18, p. 1717-1720, 2000a.

FRANCESCHI, C.; VALENSIN, S.; BONAFÉ, M.; PAOLISSO, G.; YASHIN, A.I.; MONTI, D.; DE BENEDICTIS, G. The network and the remodeling theories of aging: historical background and new perspectives. **Experimental Gerontology**, v. 35, p. 879-896, 2000b.

FRANCESCHI, C.; CAPRI, M.; MONTI, D.; GUINTA, S.; OLIVIERI, F.; SEVINI, F.; PANCURGIA, M.P.; INDIVIA, L.; CELANI, L.; SCURTI, M.; CEVENINI, E.; CASTELLANI, G.C.; SALVIOLI, S. Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 128, p. 92-105, 2007.

FRANCESCHI, C.; MOTTA, L.; MOTTA, M.; MALAGUARNERA, M.; CAPRI, M.; VASTO, S.; CANDORE, G. The extreme longevity: the state of art in Italy. **Experimental Gerontology**, v. 23, p. 45-52, 2008.

GAMARO, G.D.; MANOLI, L.P.; TORRES, I.L.S.; SILVEIRA, R.; DALMAZ, C. Effects of chronic variate stress on feeding behavior and n monoamine levels in different rat brain structures. **Neurochemistry International**, v. 42, p. 107-114, 2003.

GARCIA-SEGURA, L.M.; DIZ-CHAVES, Y.; PEREZ-MARTIN, M.; DARNAUDERY, M. Estradiol, insulin-like growth factor-I and brain aging. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, p. S57-S61, 2007.

GEENEN, V. The thymus as an obligatory intersection between the immune and neuroendocrine system: Pharmacological implications. **Current opinion in Pharmacology**, v. 10, p. 405-407, 2010.

GEORGE, A.A.; SCHILTZ, R.L.; HAGER, G.L. Dynamic access of the glucocorticoid receptor to response elements in chromatin. **The International Journal of Biochemical & Cell Biology**, v. 41, p. 214-224, 2009.

GLOBERSON, A.; EFFROS, R. Ageing of lymphocytes and lymphocytes in the aged. **Immunology Today**, v. 21, p. 515-521, 2000.

GOMEZ, C.R.; NOMELLINI, V.; FAUNCE, D.E.; KOVACS, E.J. Innate immunity and aging. **Experimental Gerontology**, v. 43, p. 718-728, 2008.

GORONZY, J.J.; LEE, W.; WEYAND, C.M. Aging and T-cell diversity. **Experimental Gerontology**, v. 24, p. 400-4006, 2007.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica**. 11.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 1115 p.

HADDAD, J.J.; SAADÉ, N.E.; SAFIEH-GARABEDIAN, B. Cytokines and neuro-immune-endocrine interactions: a role for hypothalamic-pituitary-adrenal revolving axis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 133, p. 1-19, 2002.

HERMAN, J.P.; LARSON, B.R.L.; SPEERT, D.B.; SEASHOLTZ, A.F. Hypothalamo-pituitary-adrenocortical dysregulation in aging F344/Brown-Norway F1 hybrid rats. **Neurobiology of Aging**, v. 22, p. 323-332, 2001.

HEMSWORTH, P.H.; BARNETT, J.L.; BEVERIDGE, L.; MATTHEWS, L.R. The welfare of extensively managed dairy cattle: a review. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 42, p. 161-182, 1995.

HINCE, M.; SAKKAL, S.; VLAHOS, K.; DUDAKOV, J.; BOYD, R.; CHIDGEY, A. The role of sex steroids and gonadectomy in the control of thymic involution. **Cellular Immunology**, v. 252, p. 122-138, 2008.

HIROKAWA, K.; UTSUYAMA, M.; KOBAYASHI, S. Hypothalamic control of development and aging of thymus. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 100, p. 177-185, 1998.

HOCKING, T.D. **The physiology of human aging**. Berkeley: University Berkeley, 2005. 74 p.

HOLLÄNDER, G.A.; KRENGER, K.; BLAZAR, B.R.. Emerging strategies to boost thymic function. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 10, p. 1-11, 2010.

HSU, H.; MOUNTZ, J.D. Metabolic syndrome, hormones and maintenance of T cells during aging. **Current Opinion in Immunology**, v. 22, p. 1-8, 2010.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Projeção da População do Brasil por Sexo e Idade – 1980-2050**. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em: 31 maio 2011.

JING, Y.; GRAVENSTEIN, S.; CHAGANTY, N.R.; CHEN, N.; LYERLS, K.H.; JOYCE, S.; DENG, Y. Aging is associated with a rapid decline in frequency, alterations in subset composition, and enhanced Th2 response in CD1d-restricted NKT cells from human peripheral blood. **Experimental Gerontology**, v. 42, p. 719-732, 2007.

JOËLS, M.; KARST, H.; KRUGERS, H.J.; LUCASSEN, P.J. Chronic stress: Implications for neuronal morphology, function and neurogenesis. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 28, p. 72-96, 2007.

KABOGLU, A. A short evaluation of aging theories and focal points of aging studies. **Bratislava Biologia**, v. 59, n. 3, p. 303-308, 2004.

KARTZ, H.; JÖELS, M. Effect of chronic stress on synaptic currents in rat hippocampal dentate gyrus neurons. **Neurophysiology**, v. 89, p. 625-633, 2002.

KLEIN, S.L.; JEDLJCKA, A.; PEKOSZ, A. The Xs and Y of immune responses to viral vaccines. **Lancet Infectious Diseases**, v. 10, p. 338-349, 2010.

KORTE, S.M.; KOOLHAAS, J.M.; WINGFIELD, J.C.; McEWEND, B.S. The Darwinian concept of stress: benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, p. 3-38, 2005.

KOWALD, A. The mitochondrial theory of aging. **Biological Signals Receptors**, v. 10, p. 162-175, 2001.

KRABBE, K.S.; PEDERSEN, M.; BRUUNSGAARD, H. Inflammatory mediators in the elderly. **Experimental Gerontology**, v. 39, p. 687-699, 2004.

KRAUSE, K.H. Aging: a revisited theory based on free radicals generated by NOX family NADPH oxidases. **Experimental Gerontology**, v. 42, p. 256-262, 2007.

KRICHEVSKY, S.; PAWELEC, G.; GURAL, A.; EFFROS, R.B.; GLOBERSON, A.; YEHUDA, D.B.; YEHUDA, A.B. Age related microsatellite instability in T cells from healthy individuals. **Experimental Gerontology**, v. 39, p. 507-515, 2004.

KUDIELKA, B.M.; KIRSCHBAUM, C. Sex differences in HPA axis responses to stress: a review. **Biological Psychology**, v. 69, p. 113-132, 2005.

LEPOSAVIC, G.; PERISIC, M.; KOSEC, D.; ARSENOVIC-RANIN, N.; RADOJEVIC, K.; STOJIC-VUKANIC, Z.; PILIPOVIC, I. Neonatal testosterone imprinting affects thymus development and leads to phenotypic rejuvenation and masculinization of the peripheral blood T-cell compartment in adult female rats. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 23, p. 294-304, 2009.

LEE, K.O.; LIAO, L.; MUKHERJEE, J.J. Does growth hormone prevent aging in the healthy elderly with low serum insulin-like growth factor-I? **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 125, p. 291-295, 2004.

LEKA, S.; GRIFFITHS, A.; COX, T. **Work organisation & stress**. Disponível em: <www.who.int/occupational_health/publications/en/oehstress.pdf>. Acesso em: 30 maio 2011.

LIBERT, S.; PLETCHER, S.D. Modulation of longevity by environmental sensing. **Cell**, v. 131, p. 1231-1234, 2007.

MALAGUARNERA, L.; CRISTALDI, E.; MALAGUARNERA, M. The role of immunity in elderly cancer. **Oncology/Hematology**, v. 74, p. 40-60, 2010.

MALAGUARNERA, L.; FERLITO, L.; IMBESI, R.M.; GULIZIA, G.S.; MAURO, S.D.; MAUGERI, D.; MALAGUARNERA, M.; MESSINA, A. Immunosenescence: a review. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 32, p. 1-14, 2001.

MARSLAND, A.L.; BACHEN, E.A.; COHEN, S.; RABIN, B.; MANUCK, S.B. Stress, immune reactivity and susceptibility to infectious disease. **Physiology & Behavior**, v. 77, p. 711-716, 2002.

MASEK, K.; SLÁNSKY, J.; PETROVICKY, P.; HADDEN, J.W. Neuroendocrine immune interactions' in health and disease. **International Immunopharmacology**, v. 3, p. 1235-1246, 2003.

MATTSON, M.P.; DUAN, W.; LEE, J.; GUO, Z. Suppression of brain aging and neurodegenerative disorders by dietary restriction and environmental enrichment: molecular mechanisms. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 122, p. 757-778, 2001.

McELHANEY, J.E.; EFFROS, R.B. Immunosenescence: what does it mean to health outcomes in older adults? **Current Opinion in Immunology**, v. 21, p. 418-424, 2009.

McEWEN, B.S.; CONRAD, C.D.; KURODA, Y.; FRANKFURT, M.; MAGARINOS, A.M.; McKITTRICK, C. Prevention of stress-induced morphological and cognitive consequences. **European Neuropsychopharmacology**, v. 7, p. S323-S328, 1997.

MIOSGE, L.; ZAMOYKA, R. Signalling in T-cell development: is it all location, location, location? **Current Opinion in Immunology**, v. 19, p. 194-199, 2007.

MIZOGUCHI, K.; IKEDA, R.; SHOJI, H.; TANAKA, Y.; MARUYAMA, W.; TABIRA, T. Aging attenuates glucocorticoid negative feedback in rat brain. **Neuroscience**, v. 159, p. 259-270, 2009.

MONTECINO-RODRIGUEZ, E.; MIN, H.; DORSHKIND, K. Reevaluating current models of thymic involution. **Seminars in Immunology**, v. 17, p. 356-361, 2005.

MOBERG, G.P.; MENCH, J.A. **The biology of animal stress: basic principles and implications for animal welfare**. New York. NY: CAB International, 2000. 377 p.

MORGULIS, M.S.; STANKEVICIUS, O.; SA-ROCHA, L.C.; PALERMO-NETO, J. Cohabitation with asickcage mate: consequences on behavior and n Ehrlich tumor growth. **Neuroimmunomodulation**, v. 11, p. 49-57, 2004.

MOTZER, S.A.; HERTING, V. Stress, stress response, and health. **The Nursing Clinics of North America**, v. 39, p. 1-17, 2004.

NASS, R.; JOHANNSSON, G.; CHRISTIANSEN, J.S.; KOPCHICK, J.J.; THORNER, M.O. The aging population – is there a role for endocrine interventions? **Growth Hormones & IGF Research**, v. 19, p. 89-100, 2009.

NEWTON, J.L. Changes in upper gastrointestinal physiology with age. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 125, p. 867-870, 2004.

NYLÉN, E.S.; ALARIFI, A.A. Humoral markers of severity and prognoses of critical illness. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 15, p. 553-573, 2001.

OTTAVIANI, E.; FRANCESCHI, C. A new theory on the common evolutionary origin of natural immunity, inflammation and stress response: the invertebrate phagocytic immunocyte as an eye-witness. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 15, n. 5, p. 291-296, 1998.

OUSLANDER, J.G.; BECK, J.C. Defining the health problems of the elderly. **Annual Revist Public Health**, v. 3, p. 55-83, 1982.

PARDON, M. Stress and ageing interactions: a paradox in the context of shared etiological and physiopathological processes. **Brain Research Reviews**, v. 54, p. 251-273, 2007.

PAXINOS, G. **The rat nervous system**. 3.ed. New York: Elsevier Academic, 2008. 1309 p.

PAWELEC, G.; LARBI, A. Immunity and ageing in man: annual review 2006/2007. **Experimental Gerontology**, v. 43, p. 34-38, 2008.

PESIC, V.; KOSEC, D.; RADOJEVIC, K.; PILIPOVIC, I.; PERISIC, M.; VIDIC-DANKOVIC, B.; LEPOSAVIC, G. Expression of α 1-adrenoceptors on thymic cells and their role in fine tuning of thymopoiesis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 214, p. 55-56, 2009.

PETROVIC-DERGOVIC, D.M.; RAKIN, A.K.; DIMITRIJEVIC, L.A.; RISTOVSKI, J.S.; KUSTRIMOVIC, N.Z.; MICIC, M.V. Changes in thymus size, cellularity and relation between thymocyte subpopulations in young adult rats induced by Somatostatin-14. **Neuropeptides**, v. 41, p. 485-493, 2007.

PERISIC, M.; ARSENOVIC-RAMIN, N.; PILIPOVIC, I.; KOSEC, D.; PESIC, V.; RADOJEVIC, K.; LEPOSAVIC, G.. Role of ovarian hormones in aged-associated thymic involution revisited. **Immunobiology**, v. 215, p. 275-293, 2010.

PHEE, H.; DZHAGALOV, I.; MOLLENAUER, M.; WANG, Y.; IRVINE, D.J.; ROBEY, E.; WEISS, A. Regulation of thymocyte positive selection and motility by GIT2. **Nature Immunology**, v. 11, p. 503-512, 2010.

QUAGLINO, D.; CAPRI, M.; BERGAMINI, G.; EUCLIDI, E.; ZECCA, L.; FRANCESCHI, C.; RONCHETTI, I.P. Age-dependent remodeling of rat thymus. Morphological and cytofluorimetric analysis from birth up to one year of age. **European Journal of Cell Biology**, v. 76, p. 156-166, 1998.

REEVES, N.D.; NARICI, M.V.; MAGANARIS, C.N. Musculoskeletal adaptations to resistance training in old age. **Manual Therapy**, v. 11, p. 192-196, 2006.

REHMAN, H.U.; MASSON, E.A. Neuroendocrinology of female aging. **Gender Medicine**, v. 2, p. 41-56, 2005.

RON-HAREL, N.; SCHWARTZ, M. Immune senescence and brain aging: can rejuvenation of immunity reverse memory loss? **Trends in Neurosciences**, v. 32, n. 7, p. 367-375, 2009.

ROSENZWEIG, E.S.; BARNES, C.A. Impact of aging on hippocampal function: plasticity, network dynamics, and cognition. **Progress in Neurobiology**, v. 69, p. 143-179, 2003.

RUIS, M.A.W.; GROOT, J.; BRAKE, T. et al. Behavioural and physiological consequences of acute defeat in growing gilts: effects of the social environment. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 70, p. 201-225, 2001.

SANSONI, P.; VESCOVINI, R.; FAGNONI, F.; BIASINI, C.; ZANNI, F.; ZANLARI, L.; TELERA, A.; LUCCHINI, C.; PASSERI, G.; MONTI, D.; FRANCESCHI, C.; PASSERI, M. The immune system in extreme longevity. **Experimental Gerontology**, p. 1-5, 2007.

SAVINO, W.; DARDENNE, M. Pleiotropic modulation of thymic functions by growth hormone: from physiology to therapy. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 10, p. 1-9, 2010.

SELI, E.; ARICI, A. Sex steroids and the immune system. **Immunology Allergy Clinical National American**, v. 22, p. 407-433, 2002.

SELYE, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. **Nature**, v. 138, p. 1-32, 1938.

SHANKER, A. Is thymus redundant after adulthood? **Immunology Letters**, v. 91, p. 79-86, 2004.

SHANLEY, D.P.; AW, D.; MANLEY, N.R.; PALMER, D.B. An evolutionary perspective on the mechanisms of immunosenescence. **Trends in Immunology**, v. 30, p. 374-381, 2009.

SILVA, I.F.O. **Aspectos do envelhecimento cerebral e função cognitiva em modelo experimental animal e estudo de mecanismos de neurodegeneração em cultura celular**. 2007. 183 f. Tese (Doutorado em Medicina) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

SORRELLS, S.F.; SAPOLSKY, R.M. An inflammatory review of glucocorticoid actions in the CNS. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 21, p. 259-272, 2007.

SOUZA, D.S. **Parâmetros anatomopatológicos como fatores prognósticos em esclerose hipocampal**. 2001. 90 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR.

SPROTT, R.L. Biomarkers of aging and disease: Introduction and definitions. **Experimental Gerontology**, v. 45, p. 2-4, 2010.

STEPTOE, A.; WARDLE, J.; MARMOT, M. Positive affect and health-related neuroendocrine, cardiovascular, and inflammatory processes. **PNAS**, v. 18, p. 6508-6512, 2005.

SWAAB, D.F.; BAO, A.; LUCASSE, P.J. The stress system in human brain in depression and neurodegeneration. **Ageing Research Reviews**, v. 4, p. 141-194, 2005.

TAUB, D.D.; MURPHY, W.J.; LONGO, D.L. Rejuvenation of the aging thymus: growth hormone-mediated and ghrelin-mediated signaling pathways. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 10, p. 1-17, 2010.

VAN REMMEN, H.; RICHARDSON, A. Oxidative damage to mitochondria and aging. **Experimental Gerontology**, v. 36, p. 879-896, 2001.

VASTO, S.; CANDORE, G.; BALISTRERI, C.R.; CARUSO, M.; COLONNA-ROMANO, G.; GRIMALDI, M.P.; LISTI, F.; NUZZO, D.; LIO, D.; CARUSO, C. Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 128, p. 83-91, 2007.

WAGNER-SMITH, K.; MARKOU, A. Depression: a repair response to stress-induced neuronal microdamage that can grade into a chronic neuroinflammatory condition? **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 35, p. 742-764, 2011.

WEBSTER, J.I.; TONELLI, L.; STERNBERG, E.M. Neuroendocrine regulation of immunity. **Annual Review of Immunology**, v. 20, p. 125-163, 2002.

WENG, N. Aging of the immune system: how much can the adaptive immune system adapt? **Immunity**, v. 24, p. 495-499, 2006.

WRONA, D. Neural-immune interactions: an integrative view of the bidirectional relationship between the brain and immune systems. **Journal of Neuroimmunology**, v. 172, p. 38-58, 2006.

YANG, H.; YOUM, Y.; VANDANMAGSAR, B.; ROOD, J.; KUMAR, G.; ANDREW, A. **Obesity accelerates thymic aging**. *Blood*. Disponível em: <www.bloodjournal.org>. Acesso em: 09 set. 2009.

ZHU, Q.; QIAN, X.; WANG, S.; YIN, T.; YANG, J.; XUE, Q.; XU, B. A comparison of elderly and adult multiple organ dysfunction syndrome in the rat model. **Experimental Gerontology**, v. 41, p. 771-777, 2006.

ZIVKOVIC, I.; RAKIN, A.; PETROVIC-DJERGOVIC, D.; MILTKOVIC, B.; MICI, M. The effect of chronic stress on thymus innervations in the adult rat. **Acta Histochemica**, v. 106, p. 449-458, 2005.

CAPÍTULO 2

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

1. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O presente experimento foi desenhado visando minimizar o número de animais utilizados, conforme Chigr et al. (2009). Para tanto, seguiram-se as normas do Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa, sendo o projeto aprovado sob o protocolo (52/2009).

O número de animais utilizados, bem como a quantidade por grupo foi estimado de acordo com cálculos de amostragem, utilizando-se para tal o grau de liberdade igual a 64.

O tamanho da amostra foi definido de forma que o erro de estimação $[p - p_0]$ fosse, no máximo, igual a d com nível de confiança, no mínimo $1 - \alpha$, em que p é proporção na amostra; p_0 , proporção na população (parâmetro); $1 - \alpha = 0,95$ (95% confiança ou $\alpha = 0,05$); e d = erro desejado.

$$n = \frac{p(1 - p_0)}{\alpha \times d^2}$$

em que $p[(p - p_0) \leq d] \geq 1 - \alpha$.

Na prática, p é desconhecido, logo, usou-se p (aproximado) ou $p = \frac{1}{2}$ em casos mais extremos, $p = 0,1 = p_0$.

$$n = \frac{0,1 \times 0,9}{0,05 \times 0,03} = 60$$

Considerou-se, frequência das variáveis (FV) e grau de liberdade (GL) dos tratamentos:

FV	GL
Tratamentos (T)	3
Idade (senis/ jovens) (I)	1
Sexo (machos/ fêmeas) S	1
T x I	3
T x S	3
I x S	1
T x S x I	3
Total	(16n - 1)

O erro ou resíduo foi de $(16n - 1) - 15 = 16n - 16 = GL$, em que

$$n = \frac{GL + 16}{16}$$

O grau de liberdade (GL) foi fixado em 64.

$$n = \frac{64 + 16}{16} = 5$$

Portanto, o **n** encontrado foi de 5, que equivale ao tamanho da amostra.

Conforme definidos nos cálculos, atendendo ao Comitê de Ética, ao início do experimento, foram utilizados 40 ratos (*Rattus norvegicus*) com idade entre 23 e 24 meses, o que em humanos é equivalente a um indivíduo entre 70 e 80 anos (FRANCESCHI et al., 2000) e 40 ratos jovens adultos, com idade de 5 meses, que foram denominados somente de ratos jovens, sendo 20 machos velhos, 20 machos jovens, 20 fêmeas velhas e 20 fêmeas jovens.

2. OS ANIMAIS

Os animais considerados velhos foram adquiridos do Biotério Central da Universidade Federal de Viçosa, com idade entre 11 e 12 meses. Todos foram mantidos agrupados em gaiolas coletivas, sendo que cinco machos por

gaiola e cinco fêmeas por gaiola, até atingir a idade de 22 a 23 meses, para o início do experimento. O ambiente foi controlado à temperatura de 24 graus (± 2) e períodos de luz de 12 horas. Água e comida *ad libitum*. Já os animais jovens forma adquiridos ao nascimento e mantidos no próprio Biotério Central da UFV até o momento de serem incluídos no experimento.

Durante o período em que os animais mantiveram-se alojados para que acontecesse o envelhecimento fisiológico, dois ratos senis vieram a óbito, o que fez com que os tratamentos controle (C) senil macho e fêmea, fossem compostos por apenas quatro ratos.

Os grupos, compostos de cinco machos velhos e o mesmo número de fêmeas velhas e o equivalente em animais jovens, tiveram distribuição aleatória dos componentes. Uma semana antes do início do experimento os animais foram transferidos para o local definitivo, onde foi realizado o protocolo experimental. O experimento teve a duração de 28 dias, onde os animais foram submetidos a um protocolo de estresse crônico moderado, adaptado de Lucca et al. (2009), Jayatissa et al. (2008) e Gamaro et al. (2003), com agentes estressores variados.

3. OS ESTRESSORES

Para evitar a adaptação dos animais, os agentes, considerados estressores, foram aplicados em diferentes tempos e dias. As adequações feitas no protocolo visaram a preservação da higidez dos animais, principalmente os senis. Optou-se por retirar estressores como ruídos elevados, contenções em ambientes restritos, natação forçada e flashes de luz, que são usados para animais jovens (BARAN et al., 2009; LUCCA et al., 2009; GAMARO et al., 2003; HERMAN et al., 2001; STEFANSKI, 2000).

Os estressores adotados foram: (a) 12 horas de privação de água; (b) 12 horas de privação de alimento, durante a noite; (c) 20 minutos de imobilização; (d) inclinação da gaiola em um ângulo de 45 graus por 2 horas; (f) diminuição da temperatura ambiente a 8° a 10°C por 2 horas; (g) aumento da temperatura ambiente a 38° a 40°C por 2 horas; (h) manutenção da luminosidade por 24 horas; e (i) período de isolamento por 24 horas.

O isolamento foi feito mantendo os animais em gaiolas individuais, sem acesso visual entre os mesmos. Durante os períodos de luz contínua, os animais foram mantidos com a luz acesa durante 24 horas, em uma sala isolada dos demais animais, visando a não interferência da luminosidade nos demais grupos.

Nos períodos de contenção, os animais foram envolvidos em capa de tecido de algodão presa rente ao corpo por meio de velcros, de forma que eles se mantiveram imóveis, por vinte minutos. Esta capa continha uma abertura, confeccionada em tela, permitindo que a cabeça do animal se mantivesse exposta, com campo de visualização do ambiente, impedindo a fuga da capa.

As alterações de temperatura, como aumento ou diminuição foram monitoradas por termômetro digital em intervalos de 5 minutos, durante todo o período de aplicação deste estressor. O frio foi obtido através da sobreposição das gaiolas, sem maravalha, em placas de gelo. Para aumentar a temperatura foi adaptado um aquecedor de ambiente em um compartimento fechado, medindo 90 x 90 x 90 centímetros.

Associado ao estresse crônico moderado, de acordo com o grupo experimental, os animais receberam um desafio imunológico e alguns tiveram o timo estimulado com GH, sendo os grupos assim divididos:

- Grupo 1: machos jovens e velhos controles (sem estresse), denominado C;
- Grupo 2: fêmeas jovens e velhas controles (sem estresse), denominado C;
- Grupo 3: machos jovens e velhos submetidos ao protocolo de estresse crônico, denominado E;
- Grupo 4: fêmeas jovens e velhas submetidas ao protocolo de estresse crônico, denominado E;
- Grupo 5: machos jovens e velhos submetidos a estresse crônico associado a desafio imunológico, denominado E+D;
- Grupo 6: fêmeas jovens e velhas submetidas a estresse crônico associado a desafio imunológico, denominado E+D;
- Grupo 7: machos jovens e velhos submetidos a estresse crônico, desafio imunológico e estimulação do timo, denominado E+D+GH;
- Grupo 8: fêmeas jovens e velhas submetidas a estresse crônico, desafio imunológico e estimulação do timo, denominado E+D+GH.

Cada um dos grupos recebeu um tratamento, respeitando o protocolo de estresse crônico moderado, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1 - Distribuição dos grupos submetidos ao protocolo de estresse crônico moderado

Dia	Frio	Calor	Isolamento	Inclinação	Água	Comida	Imobilização	Luz
1	Grupo 3							
2	Grupo 4	Grupo 3						
3	Grupo 5	Grupo 4	Grupo 3					
4	Grupo 6	Grupo 5	Grupo 4	Grupo 3				
5	Grupo 7	Grupo 6	Grupo 5	Grupo 4	Grupo 3			
6	Grupo 8	Grupo 7	Grupo 6	Grupo 5	Grupo 4	Grupo 3		
7		Grupo 8	Grupo 7	Grupo 6	Grupo 5	Grupo 4	Grupo 3	
8	Grupo 3		Grupo 8	Grupo 7	Grupo 6	Grupo 5	Grupo 4	Grupo 3
9	Grupo 4	Grupo 3		Grupo 8	Grupo 7	Grupo 6	Grupo 5	Grupo 4
10	Grupo 5	Grupo 4	Grupo 3		Grupo 8	Grupo 7	Grupo 6	Grupo 5
11	Grupo 6	Grupo 5	Grupo 4	Grupo 3		Grupo 8	Grupo 7	Grupo 6
12	Grupo 7	Grupo 6	Grupo 5	Grupo 4	Grupo 3		Grupo 8	Grupo 7
13	Grupo 8	Grupo 7	Grupo 6	Grupo 5	Grupo 4	Grupo 3		Grupo 8
14		Grupo 8	Grupo 7	Grupo 6	Grupo 5	Grupo 4	Grupo 3	
15	Grupo 3		Grupo 8	Grupo 7	Grupo 6	Grupo 5	Grupo 4	Grupo 3
16	Grupo 4	Grupo 3		Grupo 8	Grupo 7	Grupo 6	Grupo 5	Grupo 4
17	Grupo 5	Grupo 4	Grupo 3		Grupo 8	Grupo 7	Grupo 6	Grupo 5
18	Grupo 6	Grupo 5	Grupo 4	Grupo 3		Grupo 8	Grupo 7	Grupo 6
19	Grupo 7	Grupo 6	Grupo 5	Grupo 4	Grupo 3		Grupo 8	Grupo 7
20	Grupo 8	Grupo 7	Grupo 6	Grupo 5	Grupo 4	Grupo 3		Grupo 8
21		Grupo 8	Grupo 7	Grupo 6	Grupo 5	Grupo 4	Grupo 3	
22	Grupo 3		Grupo 8	Grupo 7	Grupo 6	Grupo 5	Grupo 4	Grupo 3
23	Grupo 4	Grupo 3		Grupo 8	Grupo 7	Grupo 6	Grupo 5	Grupo 4
24	Grupo 5	Grupo 4	Grupo 3		Grupo 8	Grupo 7	Grupo 6	Grupo 5
25	Grupo 6	Grupo 5	Grupo 4	Grupo 3		Grupo 8	Grupo 7	Grupo 6
26	Grupo 7	Grupo 6	Grupo 5	Grupo 4	Grupo 3		Grupo 8	Grupo 7
27	Grupo 8	Grupo 7	Grupo 6	Grupo 5	Grupo 4	Grupo 3		Grupo 8
28		Grupo 8	Grupo 7	Grupo 6	Grupo 5	Grupo 4	Grupo 3	
29			Grupo 8	Grupo 7	Grupo 6	Grupo 5	Grupo 4	Grupo 3
30				Grupo 8	Grupo 7	Grupo 6	Grupo 5	Grupo 4
31					Grupo 8	Grupo 7	Grupo 6	Grupo 5
32						Grupo 8	Grupo 7	Grupo 6
33							Grupo 8	Grupo 7
34								Grupo 8

Fonte: Dados da pesquisa.

Os animais dos grupos 5 e 6 (E+D), além do cronograma de estresse já descrito, receberam um tratamento para desafio imunológico inespecífico com uma substância adjuvante de vacinas, a Saponina®, no dia 26 do protocolo.

Além dos tratamentos de estresse e desafio imunológico, os animais dos grupos 7 e 8 (E+D+GH) receberam a administração de hormônio do crescimento Somatotropina®, com o objetivo de avaliar a modulação da resposta imunológica e a proliferação celular tímica. Foram administradas doses diárias durante os 28 dias do experimento na dose de 25 µg/kg p.v. por via subcutânea (FRENCH et al., 2002; BROWN-BORG; RAKOCZY, 2003; TRESGUERRES et al., 2008).

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARAN, S.E.; ARMSTRONG, C.E.; NIREN, D.C.; HANNA, J.J.; CONRAD, C.D. Chronic stress and sex differences on the recall of fear conditioning and extinction. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 91, p. 323-332, 2009.

BROWN-BORG, H.M.; RAKOCZY, S.G. Growth hormone administration to long-living dwarf mice alters multiple components of the antioxidative defense system. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 124, p. 1013-1024, 2003.

CHIGR, F.; RACHID, F.; SEGURA, S.; MAHAUT, S.; TARDIVEL, C.; JEAN, A.; NAJIMI, M.; MOYSE, E. Neurogenesis inhibition in the orsal vagal complex by chronic immobilization stress in the adult rats. **Neuroscience**, v. 158, p. 524-536, 2009.

FRANCESCHI, C.; BONAFÉ, M.; VALENSIN, S. Human immunosenescence: the prevailing of innate immunity the failing of clonotypic immunity, and the filling of immunological space. **Vaccine**, v. 18, p. 1717-1720, 2000.

FRENCH, R.A.; BROUSSRD, S.R.; MEIER, W.A.; MINSHALL, C.; ARKINS, S.; ZACHARD, J.F.; DANTZER, R.; KELLEY, K.W. Age-associated loss of bone marrow hematopoietic cells is reversed by GH and accompanies thymic reconstitution. **Endocrinology**, v. 143, n. 2, p. 690-699, 2002.

GAMARO, G.D.; MANOLI, L.P.; TORRES, I.L.S.; 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.

HERMAN, J.P.; LARSON, B.R.L.; SPEERT, D.B.; SEASHOLTZ, A.F. Hypothalamo-pituitary-adrenocortical dysregulation in aging F344/Brown-Norway F1 hybrid rats. **Neurobiology of Aging**, v. 22, p. 323-332, 2001.

JAYTISSA, M.N.; BISGAARD, C.F.; WEST, M.J.; WIBORG, O. The number of granule cells in rat hippocampus is reduced after chronic mild stress and re-established after chronic escitalopram treatment. **Neuropharmacology**, v. 54, p. 530-541, 2008.

LUCCA, G.; COMIM, C.M.; VALVASSORI, S.S.; RÉUS, G.Z.; 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.

STEFANSKI, V. Social stress in laboratory rats: hormonal responses and immune cell distribution. **Psychoneuroendocrinology**, v. 25, p. 389-406, 2000.

TRESGUERRES, J.A.F.; KIREEN, R.; TRESGUERRES, A.F.; BORRAS, C.; VARA, E.; ARIZNAVARRETA, C. Molecular mechanisms involved in the hormonal prevention of aging in the rat. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 108, p. 318-326, 2008.

CAPÍTULO 3

EFEITOS DO PROTOCOLO DE ESTRESSE CRÔNICO MODERADO SOBRE A HISTOMORFOMETRIA DO TIMO DE RATOS JOVENS E SENIS

RESUMO: O timo sofre mudanças estruturais desde o nascimento até o envelhecimento do indivíduo. Fatores como o estresse podem contribuir para uma atrofia deste órgão que está diretamente relacionado à produção de uma resposta imunológica, podendo comprometê-la. Entretanto, a terapia com hormônio do crescimento (GH), tem-se mostrado eficiente na regeneração tímica em detrimento dos efeitos colaterais que a acompanham. Neste trabalho, os timos de ratos jovens (5 a 6 meses) e senis (23 a 24 meses) foram analisados histomorfometricamente, demonstrando sofrer os efeitos do envelhecimento, do protocolo de estresse crônico moderado e sendo responsivo à terapia com GH, principalmente nos ratos velhos.

Palavras-chave: Timo, rato, estresse, histomorfometria, GH, senil.

EFFECTS OF CHRONIC MILD STRESS PROTOCOL ON HISTOMORPHOMETRY OF THE THYMUS OF YOUNG AND OLD RATS

ABSTRACT: The thymus undergoes structural changes from birth to the individual. Factors such as stress can contribute to an atrophy of this organ which is directly related to the production of an immune response and may compromise it. However, therapy with growth hormone (GH) has been shown to be effective in regenerating the thymus at the expense of side effects that accompany it. In this study, the thymus of young (5-6 months) and old (23-24 months) rats were analyzed histologically and morphometrically demonstrating suffer the effects of aging, chronic mild stress protocol and being responsive to therapy with GH, particularly in old rats.

Keywords: Thymus, rats, stress, histomorphometry, GH, senile.

1. INTRODUÇÃO

O estresse crônico é freqüentemente correlacionado a uma redução da competência do sistema imune e ao aumento da incidência de doenças. No entanto, o sistema imune (SI) é modulado por outros sistemas durante a produção da resposta, principalmente pelo eixo hipófise-pituitária-adrenal (HPA), caracterizando um envolvimento direto do sistema nervoso central (SNC) na regulação do SI durante o estresse (MOBERG; MENCH, 2000). Segundo Black (2002), existe evidências de que alterações hormonais decorrentes do estresse podem causar uma resposta inflamatória e que episódios repetidos ou crônicos de estresse podem evoluir para uma doença inflamatória através da ativação do eixo HPA.

Sinais biológicos e emocionais, característicos da senilidade, equivalem a uma reação de estresse crônico e podem ser observados na ausência de qualquer estressor. No entanto, a habilidade de responder a estímulos estressantes, diminui com a idade, deixando os indivíduos mais vulneráveis aos efeitos colaterais deste estresse. Isto porque, com o avançar da idade, observa-se um desequilíbrio na atividade do eixo HPA, secundária a uma diminuição do número de receptores de glicocorticóides. O resultado é uma hipersecreção de glicocorticóides (GCs) com aumento gradual da deterioração do hipocampo (PARDON, 2007).

Um estímulo imune contínuo ao longo da vida estabelece um status pró-inflamatório crônico, caracterizado pelo aumento sérico de citocinas e outros fatores pró-inflamatórios. Este fenômeno foi denominado “inflammaging” por Franceschi et al. (2000). O desequilíbrio pró-inflamatório na velhice torna-se um importante parâmetro nas principais doenças senis, como arterioesclerose, demência, osteoporose e câncer (HOCKING, 2005; SANSONI et al., 2007).

No decorrer da vida o timo sofre uma involução fisiológica que pode ser acelerada por fatores endógenos ou exógenos como desordens hormonais, estresse, dieta, radiação ionizante e endotoxinas bacterianas (QUAGLINO et al., 1998). Já a involução tímica relativa ao envelhecimento é acompanhada da redução da vigilância imune aumentando o risco e severidade de infecções, certos tipos de câncer, falhas vacinais e reconstituição tardia de células T em

pacientes submetidos a transplante de células tronco hematopoiéticas. Esta progressiva perda da função tímica leva ao declínio da imunidade adaptativa (DIXIT, 2010).

De acordo com Perisic et al. (2010), o início da involução tímica coincide com o aumento da produção de esteróides gonadais e conseqüente diminuição dos níveis de hormônio do crescimento (GH). O GH também influencia o tamanho do timo como fator de crescimento, uma vez que camundongos Snell-Bagg sob estresse e ratos hipofisectomizados apresentam uma progressiva involução tímica (HOLLÄNDER et al., 2010).

Os benefícios terapêuticos do GH como imunomodulador foi demonstrado em estudos onde o aumento da celularidade tímica elevou os números de emigrantes tímicos e aumentou o repertório TCR nas células periféricas (NAPOLITANO et al., 2008). O GH também acelera recuperação de tímócitos e a reconstituição de compartimentos periféricos de células T e a reconstituição de células T do compartimento periférico em camundongos irradiados letalmente e enxertados com células T alogênicas retiradas da medula óssea (HOLLÄNDER et al., 2010).

O crescente aumento da expectativa de vida da população mundial torna explícita a necessidade de promover uma melhor qualidade de vida a indivíduos acima de 60 anos. Objetivou-se com este trabalho avaliar o efeito da estimulação tímica com GH em ratos senis submetidos a um protocolo de estresse crônico moderado e imunologicamente desafiados.

2. METODOLOGIA

2.1. Os animais

Foram utilizados 40 ratos (*Rattus norvegicus*) velhos, com idade entre 20 e 24 meses e 40 ratos jovens adultos, com idade entre 5 e 6 meses. Sendo 20 machos velhos, 20 machos jovens, 20 fêmeas velhas e 20 fêmeas jovens. O presente experimento foi desenhado visando minimizar o número de animais utilizados, conforme Chigr et al. (2009). Para tanto, seguimos as normas do Comitê de Ética para Uso de Animais da Universidade Federal de Viçosa, sendo o projeto aprovado sob o protocolo (52/2009).

Os animais foram mantidos agrupados em gaiolas coletivas, tendo o ambiente com temperatura controlada a 24 graus (± 2) e períodos de luz de 12 horas, além de água e comida *ad libitum*. Os grupos, compostos de cinco machos e cinco fêmeas velhos e o equivalente em animais jovens, tiveram distribuição aleatória dos componentes.

2.2. Delineamento experimental

O experimento teve a duração de 28 dias, onde os animais foram submetidos a um protocolo de estresse crônico moderado, adaptado de Gamaro et al. (2003) e Herman et al. (2001), com agentes estressores variados como privação de água e comida, imobilização, inclinação da gaiola, frio, calor e isolamento. Para evitar a adaptação dos animais, os agentes considerados estressores foram aplicados em diferentes tempos e dias.

Foram adotados quatro tratamentos, incluindo o protocolo de estresse (E), o estresse associado a um desafio imunológico (E+D), o estresse associado ao desafio e aplicação de GH (E+D+GH), além do controle (C) que não recebeu nenhum tratamento. O desafio imunológico consistiu da aplicação de Saponina® no dia 26 do protocolo. Nos animais tratados com GH foram administradas doses diárias de Somatotropina®, durante os 28 dias do experimento, na dose de 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ p.v. por via subcutânea (FRENCH et al., 2002; BROWN-BORG; RAKOCZY, 2003; TRESGUERRES et al., 2008).

Ao final dos 28 dias os animais foram sacrificados por decapitação com guilhotina, sob mínimas condições de estresse, respeitando as normas internacionais (NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC, 1985) e do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

2.3. Coleta de material

A coleta do timo foi realizada segundo orientação anátomo-cirúrgica de Fossun et al. (2002). Após exposição do órgão e realizada sua dissecação, o timo foi imerso imediatamente em solução de paraformaldeído tamponado 10% por 48 horas, sendo então transferido para uma solução de paraformaldeído

tamponado a 4% por mais 24 horas e depois para álcool 70%. Posteriormente este tecido foi incluído em Paraplast®.

2.4. Análise histológica e morfométrica do timo

Os blocos seccionados em fragmentos de 4 µm de espessura foram corados com hematoxilina-eosina (H&E) para visualização de córtex, medula e corpúsculos tímicos. As análises histológicas do órgão não sofreram tratamentos estatísticos, sendo analisadas somente de forma descritiva. De cada animal, obtiveram-se dois cortes histológicos analisados por microscopia de luz em aumentos de 40, 100 e 200X.

Para realização das análises morfométricas, as imagens foram capturadas por uma câmera digital modelo Feldmann Wild Leitz Digi-Pro 5.0M e trabalhadas no software Micrometrics SE Premium®. Foi feita uma correlação de córtex, medula e tecido não linfóide (STRÖBEL et al., 2008). As fotomicrografias foram analisadas em aumento de 40x.

Utilizou-se uma grade com 192 pontos com 100 µm² cada, sendo composta de 12 linhas e 16 colunas. Esta grade foi sobreposta sobre o corte histológico, e os pontos de intersecção entre os tecidos foram contabilizados. Em alguns casos, para facilitar a visualização da delimitação das áreas cortical/medular, as fotografias receberam o tratamento de campo escuro aumentando o contraste da coloração. Um exemplo da contagem de pontos sobre a camada medular pode ser visto na Figura 1.

Buscando minimizar as diferenças de tamanho do órgão dos diferentes animais, para se obter uma medida mais objetiva entre as camadas cortical, medular e tecidos não linfóides, realizou-se um tratamento no número de pontos contados. O primeiro passo foi contar a quantidade de pontos das respectivas camadas encontradas dentro da grade, indicando o tamanho do órgão. Em seguida, dividiu-se o número de ponto de cada camada pelo número total, obtendo-se, então, um número relativo (%) daquela camada sobre o órgão considerado, conforme proposto por Jayatissa et al. (2008) e Baptista (2008).



Nesta imagem, os pontos brancos representam os pontos relativos à camada medular do corte histológico. Coloração H&E, 40X.

Figura 1 - Fotomicrografia do timo de um animal jovem controle, com sobreposição das linhas de grade utilizadas para contagem dos pontos de intersecção entre as camadas cortical e medular.

2.5. Análise estatística

Os resultados morfométricos obtidos, após serem tabulados, tiveram suas estatísticas descritivas analisadas através do software Sistema para Análises Estatísticas (SAEG® 9.1). Em função da pequena amostra, utilizou-se a estatística t, teste t de student, admitindo a normalidade da mesma. O delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (2 x 2 x 4), sendo SEXO x IDADE x PROTOCOLOS, com cinco repetições foi tabulado e avaliado para as variáveis % das camadas cortical e medular do timo.

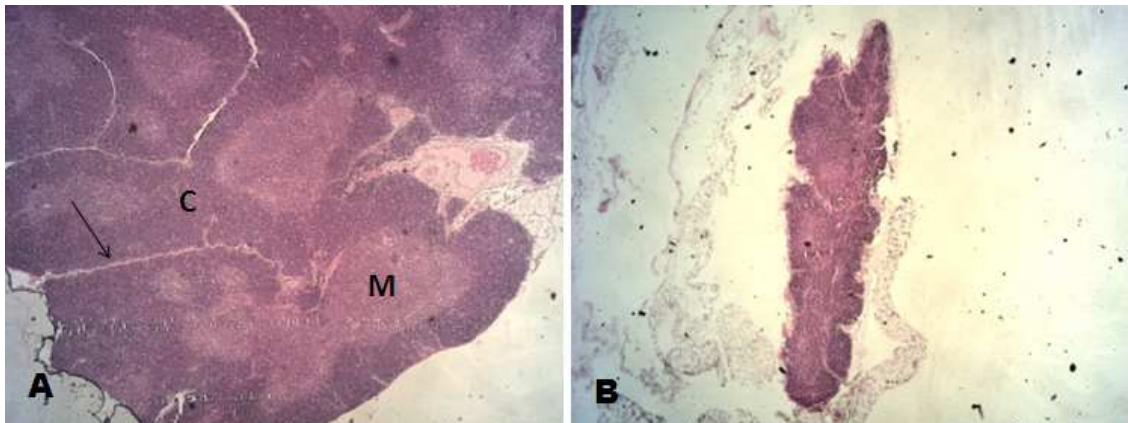
3. RESULTADOS

3.1. Avaliação histológica do timo

Em todos os grupos, os animais jovens apresentaram a cápsula tímica envolvendo o órgão, invaginando entre os lóbulos para formar os septos interlobulares. Nos animais senis, a espessura desta cápsula era maior em relação aos animais jovens e em alguns animais esta cápsula estava envolta em tecido adiposo intenso, dificultando a identificação.

Foram observadas características de um processo de regressão tímica, com diminuição do aspecto enrugado da cápsula tímica e menor definição de limites entre as camadas cortical e medular em todos os animais, inclusive nos considerados jovens.

Os animais jovens apresentaram uma melhor definição de lóbulos, o que não foi verificado nos animais senis, como pode ser visto na Figura 2.



Notar a diferença de tamanho e delimitação entre as camadas cortical (C) e medular (M), além da presença de septos interlobulares no rato macho jovem. Em B notar o tamanho reduzido do timo, ausência de delimitação entre as camadas C e M, ausência de limites entre septos e presença de tecido adiposo na periferia do órgão. H&E. 40X.

Figura 2 - Fotomicrografia do timo. Comparação entre o timo de um animal jovem adulto (6 meses) (A) e de um animal senil (24 meses) (B).

Os septos interlobulares, dispostos no parênquima tímico, dividem os lóbulos adjacentes, proporcionando a passagem de vasos para o interior da glândula. O tamanho destes vasos também variou de acordo com a idade dos animais, sendo menores nos animais senis.

Os timos dos animais senis apresentaram intensa depleção do córtex tímico e desorganização no limite córtex-medula, não sendo bem esclarecida a sua demarcação. Observou-se a presença de timócitos ou linfócitos T em morfologia sugestiva de um processo de apoptose.

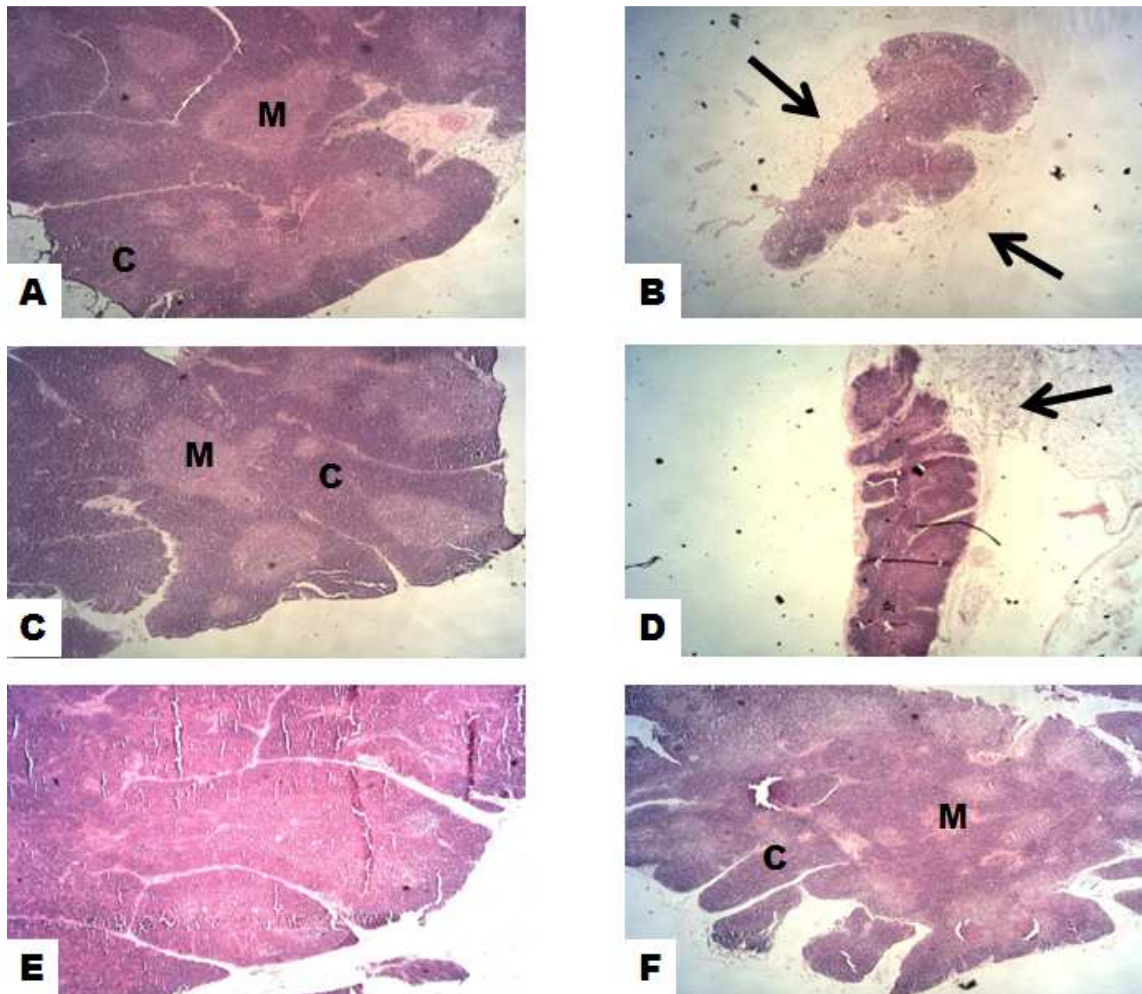
Não se observaram diferenças entre os órgãos dos animais do grupo controle quando consideramos gênero, no entanto, é visível a diferença entre os animais jovens e senis quanto à proporção de camadas cortical e medular. Os animais jovens apresentam maior relação de camadas medulares em relação à cortical quando comparados aos animais senis, quando se avaliou a delimitação entre estas camadas.

Os efeitos dos protocolos de estresse e desafio imunológico levaram a uma diminuição da celularidade tímica na maioria dos animais, com redução generalizada na camada medular e presença de células com morfologia apoptótica. Ocorreram também respostas individuais tanto nos protocolos estresse como no estresse e desafio, relativos aos animais senis.

No grupo estresse, um macho e uma fêmea senis apresentaram o timo de tamanho equivalente aos controles jovens, sendo que na fêmea observou-se uma evidente delimitação entre as camadas cortical e medular.

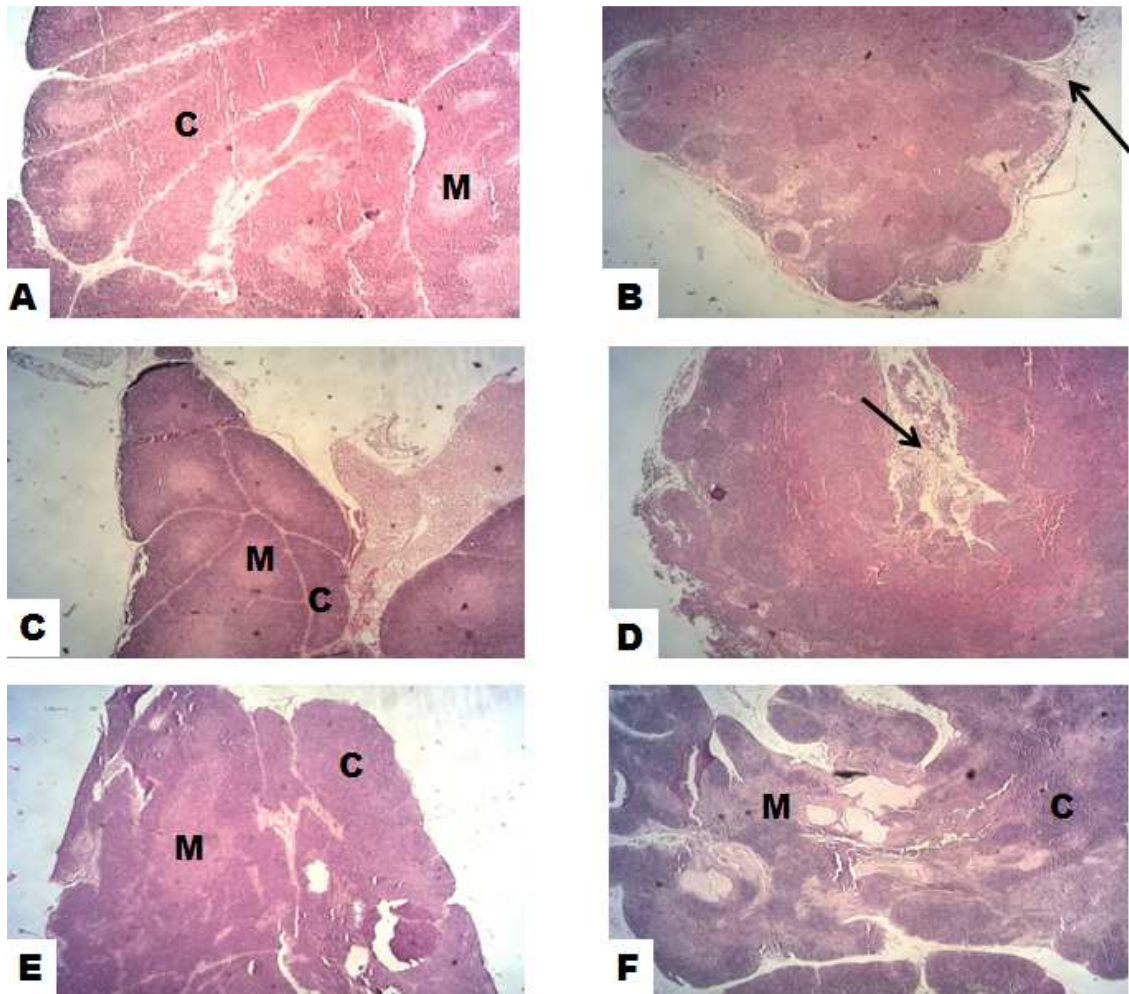
Já no grupo estresse e desafio, uma única fêmea senil apresentou o órgão aumentado em relação às demais do mesmo grupo. No entanto, assim como nas demais senis, não havia uma definição de limites entre as camadas.

Os animais jovens, tanto machos quanto as fêmeas dos grupos estresse e estresse e desafio tiveram respostas mais homogêneas e equivalentes aos controles jovens. No entanto, os animais tratados com GH apresentaram uma melhor conformação do timo, o que foi mais evidente nos animais senis e principalmente nas fêmeas, com maior proporção também de vasos entremeando o órgão, como pode ser visto nas Figuras 3 e 4.



Notar a diferença entre a definição de limites C e M. Os animais senis também apresentam maior camada de tecido adiposo envolvendo o órgão (setas largas). Observar a melhora no tamanho e definição de limites C e M no animal tratado com GH (F). O macho jovem tratado com GH (E) já não apresenta limites tão definidos como o senil tratado. (Coloração H&E).

Figura 3 - Fotomicrografia dos cortes histológicos dos timos dos animais machos jovens (A, C, E) e senis (B, D, F).



Assim como os machos, as fêmeas jovens também apresentam melhor arquitetura do órgão com limites bem definidos entre as camadas C e M (A, C, E), em comparação aos animais senis (B, D, F). Exceção também para a fêmea senil tratada com GH que apresenta um melhor aspecto o timo, com definição entre as camadas e presença de lóbulos (F). Notar também que as fêmeas senis, controle (B) e estressada (D), apresentam menor deposição adiposa em relação aos animais machos senis da Figura 2 (setas). H&E. 40X.

Figura 4 - Fotomicrografia dos cortes histológicos dos timos dos animais fêmeas, jovens e senis.

Nos animais senis e em alguns estressados, notou-se a presença de formações vacuolares entre os septos lobulares, no entanto, a maioria dos animais senis não apresentava arquitetura condizente com uma formação lobular.

Todos os timos analisados apresentavam as células do parênquima hiperconcoradas. A coloração era mais evidente nos animais senis, onde não se faziam distinções de limites de camadas e as células apresentavam-se menores em relação aos animais jovens.

Em alguns animais jovens, independente do sexo e tratamento, foram observados pontos de necrose esparsos, principalmente na camada cortical. Já nos animais senis, também independente do sexo, estes pontos necróticos foram mais evidentes em vários pontos do timo.

Os corpúsculos tímicos, presentes na camada medular, foram raros em todos os animais. Apenas poucos foram observados no timo dos animais jovens pertencentes aos grupos controles.

Comparações entre os animais dos diferentes protocolos podem ser observadas nas Figuras 3 e 4.

3.2. Morfometria do timo

Consideraram-se as medidas morfométricas das camadas cortical e medular do timo, que são complementares, conforme metodologia utilizada para análise do plano de corte. A camada cortical aumentou proporcionalmente ao decréscimo da medular, bem como o efeito inverso.

Ao se avaliar isoladamente as respostas animais dos diferentes protocolos para as camadas cortical, medular e tecido não linfóide (TNL), observa-se que a variável sexo não foi capaz de influenciar nenhuma das camadas ao nível de significância $p < 0,05$. A idade foi capaz de modificar significativamente as camadas cortical e medular, mas não influenciou a percentagem de tecidos não linfóides. Os efeitos dos protocolos se mostraram altamente significativo para as três camadas, indicando que os timos dos animais foram modificados após os estímulos. Estes achados encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Nível de significância das camadas tímicas em função das variáveis analisadas e suas interações

Parâmetro/Variável	% Cortical	% Medular	% TNL
Idade	0.000*	0.000*	
Sexo	0.079	0.132	0.280
Protocolo	0.000*	0.000*	0.000*
Protocolo x idade	0.003*	0.000*	0.005*
Protocolo x sexo	0.015*	0.011*	0.343

* Significativo ($p < 0,05$).

Entre as interações dos protocolos com as variáveis sexo e idade, somente uma das seis observações não apresentou significância ao nível de 5% para todas as camadas. Esta foi a percentagem de tecidos não linfóides. Observa-se que para as demais, todas são significativas se fosse considerado o nível de significância de 2%, mostrando que realmente as camadas cortical e medular responderam aos protocolos utilizados.

Quando se analisaram as médias encontradas para cada uma das camadas tímicas em relação ao controle (C), estresse (E), estresse+desafio (E+D) e estresse+desafio+GH (E+D+GH), observou-se que estatisticamente a média da percentagem da cortical foi igual para o C e E, porém foram diferentes para E+D, E+D+GH, conforme apresentado na Tabela 2. A cortical abrangeu a maior área do timo nos indivíduos estressados e desafiados imunologicamente. A menor área foi encontrada entre os animais tratados com o hormônio do crescimento.

A camada medular apresentou médias estatisticamente iguais para os indivíduos controle, estressados e os estressados e desafiados imunologicamente. Os tratados com GH apresentaram média maior e estatisticamente diferente dos demais.

Tabela 2 - Variações dos níveis das camadas cortical e medular e do tecido não linfóide (TNL) em função dos protocolos

Protocolo/Variável	% Cortical	% Medular	% TNL
Controle	0.7566 ^B	0.1603 ^B	0.0831 ^A
Estresse	0.7705 ^B	0.1826 ^B	0.0468 ^B
Estresse + Desafio	0.8261 ^A	0.1539 ^B	0.0200 ^C
Estresse + Desafio + GH	0.7087 ^C	0.2496 ^A	0.0417 ^B

Letras diferentes na coluna indicam médias estatisticamente diferentes.

Os tecidos não linfóides, que complementam a área tímica avaliada pelos 108 pontos de 100 µm, apresentaram diferenças entre suas médias analisadas. Observa-se que a maior média encontrada foi a dos animais C, seguida dos E e E+D+GH, que apresentaram estatisticamente a mesma média e, por fim, a menor que se encontrou, que é a dos animais estressados cronicamente e estimulados imunologicamente. Estatisticamente, os animais controles e os estressados e desafiados apresentam as percentagem de camada de TNL diferentes.

As interações entre protocolo x idade x sexo são mostradas na Tabela 3. Ao se analisarem as médias percentuais das camadas tímicas nos indivíduos jovens de sexos diferentes se percebem as interações das variáveis. Porém não é distinguível a diferença estatística entre as médias, observadas pelas coincidências das letras que acompanham os resultados dentro de cada linha da Tabela 3.

Observação semelhante é constatada nos animais senis. Porém é possível verificar que para os indivíduos dos grupos MEDGH e FEDGH em relação aos outros três, estatisticamente, as médias são diferentes. Entretanto, são iguais dentro do grupo quando comparado os sexos.

Tabela 3 - Variações das percentagens de tecido tímico nas interações idade x protocolo, com influência do sexo

	Idade x protocolo	MC	FC	ME	FE	MED	FED	MEDGH	FEDGH
%Cortical	Jovem	0.71 ^{cd}	0.69 ^d	0.75 ^{bcd}	0.7 ^{cd}	0.82 ^{ab}	0.78 ^{abcd}	0.73 ^{bcd}	0.71 ^{cd}
	Senil	0.83 ^{ab}	0.8 ^b	0.84 ^{ab}	0.79 ^b	0.88 ^{ab}	0.84 ^{ab}	0.71 ^c	0.69 ^c
	Diferença	-0.12	-0.11	-0.09	-0.09	-0.06	-0.06	0.02	0.02
% Medular	Jovem	0.25 ^{abc}	0.20 ^{bcde}	0.24 ^{abcd}	0.19 ^{cde}	0.19 ^{de}	0.16 ^e	0.25 ^{abc}	0.23 ^{abcde}
	Senil	0.12 ^c	0.07 ^d	0.17 ^{bc}	0.13 ^{cde}	0.15 ^{bc}	0.12 ^c	0.27 ^a	0.25 ^a
	Diferença	0.13	0.13	0.07	0.06	0.04	0.04	-0.02	-0.02
% TNL	Jovem	0.09 ^{abc}	0.07 ^{abc}	0.06 ^{abcd}	0.06 ^{abcd}	0.04 ^{cd}	0.03 ^d	0.04 ^{bdc}	0.04 ^{cd}
	Senil	0.10 ^{abc}	0.08 ^a	0.03 ^{bcd}	0.03 ^{bcd}	0.01 ^{cd}	0.00 ^d	0.05 ^{bcd}	0.04 ^{bdc}
	Diferença	-0.01	-0.01	0.03	0.03	0.03	0.03	-0.01	0

Letras diferentes na mesma linha indicam médias estatisticamente diferentes.

MC =machos controle; FC = fêmeas controle; ME = machos estressados; FE = fêmeas estressadas; MED = machos estressados e desafiados; FED = fêmeas estressadas e desafiadas; MEDGH = machos estressados, desafiados e tratados com GH; FEDGH = fêmeas estressadas, desafiadas e tratadas com GH.

Não obstante a relevância estatística é evidente a tendência apresentada pelos números constatados pela linha da diferença ao se comparar jovens e senis frente aos protocolos. A camada cortical é menor nos indivíduos jovens para os protocolos C, E e E+D em relação aos senis dos respectivos grupos. O tratamento com o hormônio do crescimento provocou uma mudança nesta camada diminuindo-a, deixando-a semelhante ao grupo controle.

Quando os resultados são avaliados em valores absolutos, os efeitos dos protocolos aplicados ficam ainda mais evidentes, como pode ser conferido nas Figuras 5 e 6, que indicam a representação gráfica dos valores da camada medular de cada um dos animais.

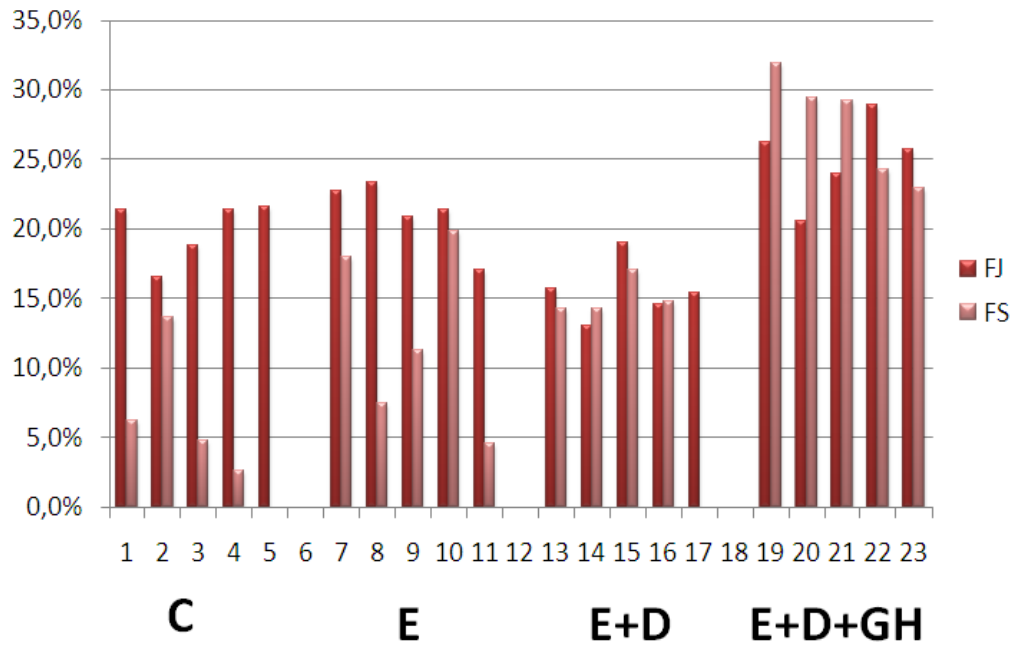


Figura 5 - Representação gráfica da percentagem da camada medular do timo de fêmeas jovens (rosa escuro) e senis (rosa claro).

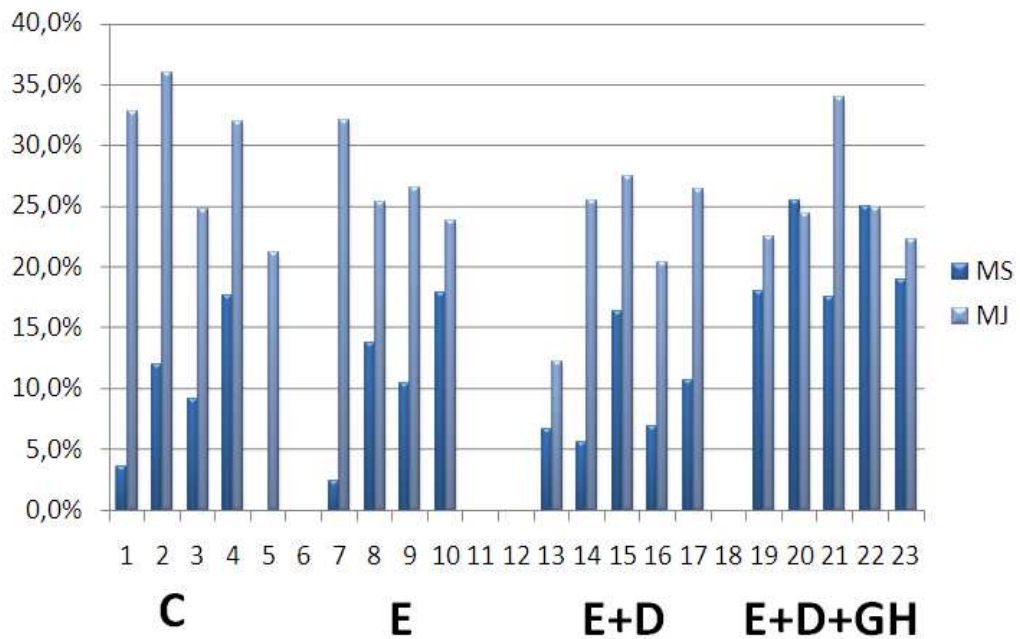


Figura 6 - Representação gráfica da percentagem da camada medular do timo de machos jovens (azul escuro) e senis (azul claro).

A percentagem de tecidos não linfóides tem um comportamento ambíguo se comparado os indivíduos jovens e senis. O grupo controle apresentou maior proporção de TNL para ambas as idades, sendo superior aos demais grupos. Entre os grupos estressados, a percentagem de camada de TNL é superior entre os jovens, exceto no grupo tratado com GH. Embora seja observada esta maior proporção de TNL nos indivíduos senis tratados com GH, não se observa um crescimento deste grupo de tecidos na proporção ocorrida na camada cortical, quando os grupos MEDGH e FEDGH atingiram a mesma proporcionalidade dos controles.

A interação da camada medular com os protocolos, sexo e idade, tem o comportamento no sentido oposto do observado pela cortical. Isto pode ser constatado devido à pequena influência física observada na percentagem de TNL sobre o órgão, deixando evidente que o que se perdeu de cortical, ganhou-se de medular.

A camada medular nos protocolos C, E e E+D dos indivíduos senis foram estatisticamente iguais e tiveram participação relativa no órgão sempre menor que os indivíduos jovens. Em contrapartida, os grupos MEDGH e FEDGH apresentaram camadas medulares semelhantes, independente de sexo ou idade, indicando um efeito do tratamento com GH nos senis, sem influenciar a quantidade nos jovens.

4. DISCUSSÃO

O protocolo de estresse crônico moderado desenvolvido objetivou resguardar a higidez de todos os animais, principalmente os senis, devido à debilidade de algumas fêmeas que apresentavam escore corporal baixo, áreas extensas de alopecia, além de comportamento mais sedentário. Este tratamento mostrou-se eficiente, uma vez que somente uma fêmea veio a óbito durante a aplicação dos estressores, ao longo do experimento. Clinicamente nenhum animal apresentou sinais de doenças.

O timo foi analisado morfometricamente buscando uma interação entre o estresse, atrofia tímica e senilidade.

4.1. Histomorfometria do timo

Histologicamente o timo dos animais dos diferentes grupos apresentaram-se desuniformes tanto macro como microscopicamente.

Macroscopicamente, o tamanho do órgão sofreu influência visível em relação à idade dos animais, com substituição do tecido tímico por um infiltrado de tecido adiposo nos ratos senis. Estes resultados obtidos estão de acordo com os achados de Douek e Koup, (2000), Romanyukha e Yashin (2003) e Hince et al. (2008). O tecido adiposo envolvia praticamente os timos de todos os grupos senis, dificultando a coleta do órgão.

Observou-se ausência de uma delimitação definida entre o córtex e a medula dos ratos senis neste trabalho, confirmando Quaglino et al. (1998), que afirmam que já aos seis meses de vida os timócitos de ratos apresentam dimensões heterogêneas e cromatina condensada, sendo menos aderidos em relação aos timócitos de ratos muito jovens. Importante ressaltar que esta indefinição de limites das camadas tímicas também foi encontrada em alguns animais jovens submetidos aos protocolos E e E+D, sugerindo que o protocolo de estresse adotado promoveu efeito sobre o processo de degeneração tímica. Estes achados corroboram aos de Hoffman-Goetz et al. (2000), quando estressaram filhotes de ratos através de gastrectomia e alimentação artificial e relataram uma involução do timo nestes animais, além de uma redução na celularidade do órgão, com presença de áreas de necrose e diminuição de linfócitos circulantes.

Segundo Hoffman-Goetz et al. (2000), uma diminuição da celularidade tímica é atribuída a apoptose celular provocada pela ativação do eixo HPA e liberação de CC. Neste trabalho, os animais apresentaram um decréscimo progressivo da camada medular após os protocolos estressantes, sendo que, nos senis esta diminuição foi mais evidente. Estes achados também vão de encontro aos de Trubiani et al. (2002), que também observaram uma atrofia medular maior em ratos senis submetidos a um estresse crônico por hipóxia durante 12 dias.

Os animais senis deste trabalho, de ambos os sexos, apresentaram uma diminuição do tamanho dos vasos sanguíneos e conseqüente aumento do espaço perivascular, o que confirma os achados de Hince et al. (2008), quando

afirma que a atrofia tímica é caracterizada pela perda de células tímicas epiteliais, aumento no espaço perivascular, que é invadido por um infiltrado de adipócitos e células T maduras simples positivas, além do aumento da cavidade cística.

O número de células T ou timócitos hipercolorados também foi muito mais evidente na camada cortical do timo dos animais senis deste trabalho, sugerido que estas células poderiam estar em processo de apoptose. Bar-Daylan et al. (1999) também verificaram um aumento no número de células hipercoloradas mais evidenciado na camada cortical de camundongos já aos seis meses de idade. É nesta camada que acontece o balanço entre proliferação celular e apoptose, o que, segundo Pesic et al. (2009), está relacionado ao processo natural de seleção de células T. Esta pode ser uma explicação para este achado histológico ser uma constante até mesmo no timo de animais jovens analisados neste trabalho.

Outra provável causa do elevado número de células hipercoloradas nos animais submetidos aos protocolos de estresse, neste trabalho, pode ser a influência dos GCs sobre o timo. De acordo com Jondal et al. (2004), este hormônio, em condições de homeostasia, limita o número de timócitos por apoptose e induz a sobrevivência e proliferação destas células em camundongos jovens. No entanto, sob a influência de episódios de estresse, pode apresentar efeito inverso.

Optou-se por não mensurar os níveis de CC dos animais deste experimento, em função da já elucidada ação deste hormônio em episódios de estresse (HOFFMAN-GOETZ et al., 2000; JONDAL et al., 2004; SHANKER, 2004; QIAO et al., 2008), além da tendência ao retorno dos seus níveis à normalidade após aplicação de um estressor crônico. De acordo com Dhabhar et al. (1997) e Varriano (2008), o feedback negativo do eixo HPA faz com que os níveis de CC não se elevem mais após três semanas de estresse crônico.

Neste trabalho, buscou-se avaliar o efeito do estresse sobre o timo de indivíduos senis submetidos a estresse crônico. Segundo Franceschi et al. (2007), o processo de envelhecimento ou “inflammaging”, envolve uma rede de respostas aos níveis sistêmico, celular e molecular semelhante a uma resposta ao estresse. Ocorre uma constante ativação do eixo HPA por

citocinas pró-inflamatórias, levando a produção de GC que é um hormônio potencialmente anti-inflamatório.

O aumento relativo do timo foi observado em dois animais senis estressados e de uma fêmea senil do protocolo E+D. No entanto, estatisticamente, a camada cortical não acompanhou o crescimento relativo do órgão, quando analisadas as médias dos protocolos C, E e E+D, que são iguais. Esta hipertrofia do órgão pode ser uma forma de resposta individual, na tentativa de controlar um insulto externo, proveniente dos protocolos e sob influência da liberação de GCs, conforme Franceschi et al. (2007).

Qiao et al. (2008) propuseram que o processo de involução tímica pode ser influenciado tanto negativamente como positivamente pelos GCs e que esta variação é dependente dos níveis deste hormônio, de respostas individuais e do *status* imunológico do indivíduo. É interessante ressaltar que as respostas individuais, encontradas histologicamente neste trabalho, aconteceram nos animais senis, onde já era esperada uma atrofia fisiológica do timo.

Segundo Rezzani et al. (2008), a atrofia tímica devido ao envelhecimento é um processo irreversível, ao contrário daquela relacionada a insultos ambientais e episódios prolongados de estresse, onde uma perda de celularidade tímica é observada, porém, restaurada depois de cessado o estímulo.

Os achados histológicos e morfométricos contradizem estas informações, quando se verificou uma regressão da atrofia tímica nos animais senis após o tratamento com GH. O efeito reversível desta atrofia em animais jovens não foi verificado, uma vez que o timo foi coletado enquanto ainda prevaleciam os efeitos dos protocolos de estresse crônico moderado.

Höllander et al. (2008) consideram que a perda de uma clara demarcação morfológica entre o córtex e medula, além de uma menor expressão de moléculas MHC II constituem a principal característica da senescência do timo, o que coincide com as características histológicas dos timos dos animais senis neste experimento.

A depleção da camada medular nos animais submetidos aos protocolos de estresse (E e E+D) foi progressiva e independente do sexo, sugerindo uma perda de celularidade, como pode ser conferido na Tabela 3.

De acordo com Berzins et al. (2002), que estudou a atrofia tímica em modelos murinos, isto compromete imunologicamente um indivíduo.

Segundo Lynch et al. (2009), a timopoiese só acontece no verdadeiro espaço epitelial (córtex/medula), que contém queratina, responsável por nutrir os timócitos. O espaço perivascular não realiza a timopoiese. Neste estudo, os animais controle apresentaram a maior percentagem de TNL, sendo que os protocolos E e E+D promoveram uma diminuição da mesma. No entanto, pode ser esta uma observação irreal, uma vez que a quantidade de vasos, tecido adiposo é dependente do tamanho do órgão, que nestes animais foi atrofiado. Lynch et al. (2009) apresentaram uma relação inversa entre as proporções do córtex/medula e do TNL.

Lynch et al. (2009) também descreveu um aumento do TNL durante o processo de envelhecimento. O autor faz uma analogia do que aconteceria no timo humano, que reduz cerca de 3% ao ano do nascimento até os 40-45 anos e depois disso reduz 1% ao ano até o fim da vida. Em torno de 70 anos, um humano teria apenas 10% do verdadeiro espaço epitelial, ocasionando uma perda significativa de timócitos DP, comprometendo substancialmente o SI do senil. Sendo esta uma progressão aritmética, um indivíduo de 105 anos não produziria mais novos linfócitos.

Macroscopicamente, o timo dos animais senis foi muitas vezes menor que o dos jovens, sugerindo uma diminuição de funcionalidade (LYNCH et al., 2009). Mas Taub et al. (2010), ao analisarem microscopicamente o timo de uma mulher de 78 anos, relataram a presença de ilhotas de cortical e medular em meio ao abundante tecido adiposo, após coloração com H&E. O que também coincide com os achados deste trabalho, que pode ser confirmado através da análise da Figura 2B.

Como já citado anteriormente, déficits fisiológicos ou patológicos do timo incidem em uma série de situações clínicas, em função do comprometimento do sistema imune adaptativo e da vigilância imunológica (HÖLLANDER et al., 2010). Isto tem levado a uma incessante busca de terapias eficazes na reversão da atrofia tímica. Dentre as diversas terapias para reversão da atrofia tímica, o GH é uma das mais utilizadas. Segundo este mesmo autor, este hormônio acelera a recuperação de timócitos, além de reconstituir o compartimento de células T periféricas.

O fato de que o GH aumenta a timopoiese pode ser certificado pelos altos números de timócitos em camundongos GH transgênicos, quando comparados aos animais de mesma idade (SAVINO; DARDENE, 2010). Mas não é suficiente para uma timopoiese normal, visto que camundongos GH-deficientes, em condições livres de estresse, não apresentam um desenvolvimento linfóide normal (HÖLLANDER et al., 2010).

A opção pelo uso do GH como estimulante do timo neste experimento deve-se ao seu efeito já elucidado sobre a reversão da atrofia tímica (BARTKE et al., 1998; ARIZNAVARRETA et al., 2003; DORSHKINO et al., 2003; ASPINALL; MITCHELL, 2008; BROWN-BORG, 2009; HATORI, 2009).

Seu uso pode aumentar em até duas vezes a celularidade tímica. Em ratos jovens o número de células passou de $100-150 \times 10^6$ para 200×10^6 . O aumento também é observado em ratos de 18 meses de idade, porém, os números são menos significativos apesar de haver uma alteração de $10-15 \times 10^6$ para $25-30 \times 10^6$ após o uso de IGF-1 (MONTECINO-RODRIGUEZ et al., 2005).

Mesmo com o significativo aumento do órgão e restabelecimento de sua arquitetura, observada nos animais de ambos os sexos do protocolo E, E+D, E+D+GH, sua funcionalidade não foi avaliada neste primeiro momento, no presente estudo. Admite-se que, acompanhada da hipertrofia, tenha ocorrido um aumento da celularidade, já que, segundo Hatori (2009), receptores de GH são expressos em subpopulações de CD4-, CD8-, CD4+CD8+ e CD8+ no timo, sugerindo seu efeito imunomodulador.

Em relatos de Taub et al. (2010), indivíduos senis saudáveis, tratados com GH, tiveram ganho de aproximadamente 2 kg de massa muscular e a mesma quantidade de perda de gordura corporal. Efeitos sobre a densidade mineral óssea, força muscular, colesterol, consumo de oxigênio também foram relatados. Entretanto, os efeitos colaterais incluíram dores articulares, retenção de líquido, compressão nervosa e aumento do risco de diabetes e câncer. O efeito cancerígeno pode ser devido a sua ação anti-apoptótica (HATTORI, 2009; NASS et al., 2009). Além disso, a ativação do eixo GH-IGF-1 também aumenta substancialmente o risco de lesões cancerígenas (DIXIT, 2010; GEENEN, 2010; TAUB et al., 2010; SAVINO; DARDENE, 2010).

Neste estudo, o estado geral dos animais senis do grupo tratados com GH foi melhor em relação aos demais. Nas fêmeas, fenotipicamente, isto foi mais evidente. Elas se assemelharam às jovens tratadas e apresentaram comportamento menos sedentário em relação às demais senis. Entretanto, para Franceschi et al. (2000), um envelhecimento bem sucedido não está necessariamente relacionado a uma estrutura física mais robusta e sim a uma melhor capacidade de produzir uma resposta efetiva ao estresse.

5. CONCLUSÃO

Em detrimento de todos os possíveis efeitos colaterais do uso do GH como modulador imune, ficou evidente seu efeito na hiperplasia do timo dos animais senis deste experimento. Neste trabalho, confirmaram-se os efeitos do envelhecimento na atrofia tímica e demonstrou-se que o estresse crônico moderado também pode levar a regressão do timo, mesmo em indivíduos jovens. O desafio imunológico não foi capaz de provocar mudanças estruturais no timo, porém, a terapia com GH levou a hipertrofia do órgão, que foi mais evidente nos animais senis.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARIZNAVARRETA, C.; CASTILLO, C.; SEGOVIA, G.; MORA, F.; AZCIITIA, I.; TRESGUERRES, J.A.F. Growth hormone and aging. **HOMO**, v. 52, n. 2, p. 132-141, 2003.

ASPINALL, R.; MITCHELL, W. Reversal of age-associated thymic atrophy: Treatments, delivery, and side effects. **Experimental Gerontology**, v. 43, p. 700-705, 2008.

BAPTISTA, J.S. **Repercussões morfológicas no timo de ratos jovens submetidos à desnutrição protéica e à renutrição precocemente corrigida**. 2008. 108 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

BAR-DAYLAN, Y.; AFEK, A.; BAR-DAYLAN, Y.; GOLOBERG, I.; KOPOLOVIC, J. Proliferation, apoptosis and thymic involution. **Tissue & Cell**, v. 31, p. 391-396, 1999.

BARTKE, A.; BROWN-BORG, H.M.; BODE, A.M.; CARLSON, J.; HUNTER, W.S.; BRONSON, R.T. Does growth hormone prevent or accelerate aging? **Experimental Gerontology**, v. 1, n. 7/8, p. 675-687, 1998.

BERZINS, S.P.; ULDRICH, A.P.; SUTHERLAND, J.S.; GILL, J.; MILLER, J.F.A.P.; GODFREY, D.I.; BOYD, R.L. Thymic regeneration: teaching an old immune system new tricks. **TRENDS in Molecular Medicine**, v. 8, p. 469-476, 2002.

BLACK, P.H. Stress and the inflammatory response: A review of neurogenic inflammation. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 16, p. 622-653, 2002.

BROWN-BORG, H.M. Hormonal control of aging in rodents: the somatotropic axis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 299, p. 64-71, 2009.

BROWN-BORG, H.M.; RAKOCZY, S.G. Growth hormone administration to long-living dwarf mice alters multiple components of the antioxidative defense system. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 124, p. 1013-1024, 2003.

CHIGR, F.; RACHID, F.; SEGURA, S.; MAHAUT, S.; TARDIVEL, C.; JEAN, A.; NAJIMI, M.; MOYSE, E. Neurogenesis inhibition in the orsal vagal complex by chronic immobilization stress in the adult rats. **Neuroscience**, v. 158, p. 524-536, 2009.

DHABHAR, F.S.; McEWEN, B.S.; SPENCER, R.L. Adaptation to prolonged or repeated stress-comparison between rat strains showing intrinsic differences in reactivity to acute stress. **Neuroendocrinology**, v. 65, p. 360-368, 1997.

DIXIT, V.D.. Thymic fatness and approaches to enhance thymopoietic fitness in aging. **Current Opinion in Immunology**, v. 22, p. 521-528, 2010.

DORSHKINO, K.; WELNIAK, L.; GAULT, R.A.; HIXON, J.; MONTECINO-RODRIGUEZ, E.; HORSEMAN, N.D.; GERTNER, J.M.; MURPHY, W.J. Effects of housing on the thymic deficiency in dwarf mice and its reversal by growth hormone administration. **Clinical Immunology**, v. 109, p. 197-202, 2003.

DOUEK, D.C.; KOUP, R.A. Evidence for thymic function in the elderly. **Vaccine**, v. 18, p. 1638-1641, 2000.

FOSSUN, T.W.; HEDLUND, C.S.; HULSE, D.A.; JOUNSON, A.; SEIM III, H.; WILLARD, M.; CARROL, G. **Cirurgia de pequenos animais**. São Paulo: Roca, 2002. 1335 p.

FRANCESCHI, C.; VALENSIN, S.; BONAFÉ, M.; PAOLISSO, G.; YASHIN, A.I.; MONTI, D.; DE BENEDICTIS, G. The network and the remodeling theories of aging: historical background and new perspectives. **Experimental Gerontology**, v. 35, p. 879-896, 2000.

FRANCESCHI, C.; CAPRI, M.; MONTI, D.; GUINTA, S.; OLIVIERI, F.; SEVINI, F.; PANCURGIA, M.P.; INDIVIA, L.; CELANI, L.; SCURTI, M.; CEVENINI, E.; CASTELLANI, G.C.; SALVIOLI, S. Inflammaging and anti-inflammaging: A systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 128, p. 92-105, 2007.

FRENCH, R.A.; BROUSSARD, S.R.; MEIER, W.A.; MINSHALL, C.; ARKINS, S.; ZACHARD, J.F.; DANTZER, R.; KELLEY, K.W. Age-associated loss of bone marrow hematopoietic cells is reversed by GH and accompanies thymic reconstitution. **Endocrinology**, v. 143, n. 2, p. 690-699, 2002.

GAMARO, G.D.; MANOLI, L.P.; TORRES, I.L.S.; SILVEIRA, R.; DALMAZ, C. Effects of chronic variate stress on feeding behavior and n monoamine levels in different rat brain structures. **Neurochemistry International**, v. 42, p. 107-114, 2003.

GEENEN, V. The thymus as an obligatory intersection between the immune and neuroendocrine system: Pharmacological implications. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 10, p. 405-407, 2010.

HATTORI, N. Expression, regulation and biological actions of growth hormone (GH) and ghrelin in the immune system. **Growth Hormone & IGF Research**, v. 19, p. 187-197, 2009.

HERMAN, J.P.; LARSON, B.R.L.; SPEERT, D.B.; SEASHOLTZ, A.F. Hypothalamo-pituitary-adrenocortical dysregulation in aging F344/Brown-Norway F1 hybrid rats. **Neurobiology of Aging**, v. 22, p. 323-332, 2001.

HINCE, M.; SAKKAL, S.; VLAHOS, K.; DUDAKOV, J.; BOYD, R.; CHIDGEY, A. The role of sex steroids and gonadectomy in the control of thymic involution. **Cellular Immunology**, v. 252, p. 122-138, 2008.

HOCKING, T.D. **The physiology of human aging**. Berkeley: University Berkeley, 2005. 74 p.

HOFFMAN-GOETZ, L.; SLIVACHAK, J.; KONYER, J.; WARD, G. Thymic stress in artificially reared and maternally reared rat pups. **Physiology & Behavior**, v. 70, p. 489-494, 2000.

HOLLÄNDER, G.A.; KRENGER, K.; BLAZAR, B.R. Emerging strategies to boost thymic function. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 10, p. 1-11, 2010.

JAYTISSA, M.N.; BISGAARD, C.F.; WEST, M.J.; WIBORG, O. The number of granule cells in rat hippocampus is reduced after chronic mild stress and re-established after chronic escitalopram treatment. **Neuropharmacology**, v. 54, p. 530-541, 2008.

JONDAL, M.; PAZIRANDEH, A.; OKRET, S. Different roles for glucocorticoids in thymocyte homeostasis? **Trends in Immunology**, v. 25, p. 595-600, 2004.

LYNCH, H.E.; GOLDBERG, G.L.; CHIDGEY, A.; VAN DEN BRINK, M.R.M.; BOYD, R.; SEMPOWSKI, G.D. Thymic involution and immune reconstitution. **Trends in Immunology**, v. 30, p. 366-373, 2009.

MOBERG, G.P.; MENCH, J.A. **The biology of animal stress**: basic principles and implications for animal welfare. New York, NY: CAB International, 2000. 377 p.

MONTECINO-RODRIQUEZ, E.; MIN, H.; DORSHKIND, K. Reevaluating current models of thymic involution. **Seminars in Immunology**, v. 17, p. 356-361, 2005.

NAPOLITANO, L.A.; SCHIMIDT, D.; GOTWAY, M.B.; AMELI, N.; FILBERT, E.L.; NG, M.M.; CLOR, J.L.; EPLING, L.; SINCLAIR, E.; BAUM, P.D.; KILLIAN, M.L.; BACCHETTI, P.; McCUNE, J.M. Growth hormone enhances thymic function in HIV-1–infected adults. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 118, p. 1085-1098, 2008.

NASS, R.; JOHANNSSON, G.; CHRISTIANSEN, J.S.; KOPCHICK, J.J.; THORNER, M.O. The aging population – is there a role for endocrine interventions? **Growth Hormones & IGF Research**, v. 19, p. 89-100, 2009.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Guide for care and use of laboratory animals**: a report of the Institute of Laboratory Animal Resources Committee on Care and Use of Laboratory Animals. 1985.

PARDON, M. Stress and ageing interactions: a paradox in the context of shared etiological and physiopathological processes. **Brain Research Reviews**, v.54, p. 251-273, 2007.

PAXINOS, G. **The rat nervous system**. 3.ed. New York: Elsevier Academic, 2008. 1309 p.

PERISIC, M.; ARSENOVIC-RAMIN, N.; PILIPOVIC, I.; KOSEC, D.; PESIC, V.; RADOJEVIC, K.; LEPOSAVIC, G. Role of ovarian hormones in aged-associated thymic involution revisited. **Immunobiology**, v. 215, p. 275-293, 2010.

PESIC, V.; KOSEC, D.; RADOJEVIC, K.; PILIPOVIC, I.; PERISIC, M.; VIDIC-DANKOVIC, B.; LEPOSAVIC, G. Expression of α 1-adrenoceptors on thymic cells and their role in fine tuning of thymopoiesis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 214, p.55-56, 2009.

QIAO, S.; CHEN, L.; OKRET, S.; JONDAL, M. Age-related synthesis of glucocorticoids in thymocytes. **Experimental Cell Research**, v. 314, p. 3037-3035, 2008.

QUAGLINO, D.; CAPRI, M.; BERGAMINI, G.; EUCLIDI, E.; ZECCA, L.; FRANCESCHI, C.; RONCHETTI, I.P. Age-dependent remodeling of rat thymus. Morphological and cytofluorimetric analysis from birth up to one year of age. **European Journal of Cell Biology**, v. 76, p. 156-166, 1998.

REZZANI, R.; BONOMINI, F.; RODELLA, L.F. Histochemical and molecular overview of the thymus as site for T-cells development. **Progress in Histochemistry and Cytochemistry**, v. 43, p. 73-120, 2008.

ROMANYUKHA, A.A.; YASHIN, A.I. Age related changes in population of peripheral T cells: Towards a model of immunosenescence. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 127, p. 433-443, 2003.

SANSONI, P.; VESCOVINI, R.; FAGNONI, F.; BIASINI, C.; ZANNI, F.; ZANLARI, L.; TELERA, A.; LUCCHINI, C.; PASSERI, G.; MONTI, D.; FRANCESCHI, C.; PASSERI, M. The immune system in extreme longevity. **Experimental Gerontology**, p. 1-5, 2007.

SAVINO, W.; DARDENNE, M. Pleiotropic modulation of thymic functions by growth hormone: from physiology to therapy. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 10, p. 1-9, 2010.

SHANKER, A. Is thymus redundant after adulthood? **Immunology Letters**, v. 91, p. 79-86, 2004.

STRÖBEL, P.; MORITZ, R.; LEITE, M.I.; WILLCOX, N.; CHUANG, W.; GOLD, R.; NIX, W.; SCHALKE, B.; KIEFER, R.; MÜLLER-HERMELINK, M.; JARETZKI III, A.; NEWSOM-DAVIS, J.; MARX, A. The ageing and myasthenic thymus: A morphometric study validating a standard procedure in the histological workup of thymic specimens. **Journal of Neuroimmunology**, v. 201-202, p. 64-73, 2008.

TAUB, D.D.; MURPHY, W.J.; LONGO, D.L. Rejuvenation of the aging thymus: growth hormone-mediated and ghrelin-mediated signaling pathways. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 10, p. 1-17, 2010.

TRESGUERRES, J.A.F.; KIREEN, R.; TRESGUERRES, A.F.; BORRAS, C.; VARA, E.; ARIZNAVARRETA, C. Molecular mechanisms involved in the hormonal prevention of aging in the rat. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 108, p. 318-326, 2008.

TRUBIANI, O.; DI GIULIO, C.; TRIPODI, D.; BIANCHI, G.; PAGANELLI, R.; DI PRIMO, R. Thymic sensitivity to hypoxic condition in young and old rats. Age-dependent expression of NF-kB. **Experimental Gerontology**, v. 37, p. 1077-1088, 2002.

VARRIANO, A.A. **Alterações clínicas e bioquímicas decorrentes do estresse crônico imprevisível e do estresse oxidativo em ratos**. 2008. 146 f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

CAPÍTULO 4

INFLUÊNCIA DO PROTOCOLO DE ESTRESSE CRÔNICO MODERADO NOS NÍVEIS SÉRICOS DE HORMÔNIOS SEXUAIS EM RATOS

RESUMO: A senilidade é acompanhada por alterações em vários sistemas do organismo, inclusive o endócrino, sendo os hormônios sexuais influenciados pelo processo de envelhecimento. Neste trabalho, analisaram-se os níveis séricos de estradiol e testosterona em ratos jovens (5 a 6 meses) e velhos (23 a 24 meses) submetidos a um protocolo de estresse crônico. Os animais foram divididos em estressados (E), estressados e imunologicamente desafiados (E+D), estressados, desafiados e tratados com GH (E+D+GH) e comparados com os controles (C). Os níveis de testosterona sofreram um decréscimo nos machos tanto em relação à idade quanto aos tratamentos. Nas fêmeas observou-se aumento deste hormônio nas senis E+D. Já o estradiol aumentou nos animais de ambos os sexos e idades E+D e E+D+GH, sugerindo uma possível resposta imunológica do organismo aos efeitos do estresse.

Palavras-chave: Ratos, estrógeno, testosterona, estresse, senilidade.

INFLUENCE OF CHRONIC MILD STRESS PROTOCOL SERUM LEVELS OF SEX HORMONES IN RATS

ABSTRACT: Aging is accompanied by changes in various organ systems, including endocrine and sex hormones influenced by the aging process. In this work, there had been analyzed the serum levels of estradiol and testosterone in young (5-6 months) and old (23 to 24 months) rats undergone a protocol of chronic stress. The animals were divided into stressed (E), stressed and immunologically challenged (E+D), stressed, challenged and treated with (E+D+GH) and compared with controls (C). Testosterone levels in males suffered a decrease in relation both to age and to treatments. In females there has been observed an increase of this hormone in old E+D. For the estradiol, there has been noted an increased in animals of both sexes and ages, and E+D and E+D+GH, suggesting a possible body's immune response to the effects of stress.

Keywords: Rats, estrogen, testosterone, stress, senility.

1. INTRODUÇÃO

Os processos degenerativos são uma consequência fisiológica da senilidade, mas a evolução dos mesmos acarreta distúrbios patológicos, com perda de função dos órgãos e doenças crônicas e/ou degenerativas (VASTO et al., 2007; NASS et al., 2009). Indivíduos senis são submetidos a uma carga de estresse crônico no decorrer da vida, levando a uma exposição contínua dos tecidos a níveis elevados de cortisol (BAUER et al., 2009). A ação contínua do cortisol promove mudanças estruturais permanentes no cérebro, contribuindo para condições mórbidas relacionadas ao envelhecimento (PARDON, 2007), além de provocar microdanos neuronais (WAGNER-SMITH; MARKOU, 2011).

Os hormônios estão envolvidos no processo de envelhecimento e os níveis de muitos deles modificam durante o envelhecimento. Vários hormônios como o hormônio do crescimento (GH), fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I), dehidroepiandrosterona (DHEA) e os sexuais sofrem um decréscimo durante a senilidade, na maioria dos mamíferos (GARCIA-SEGURA et al., 2007).

Assim como o envelhecimento, o estresse crônico leva a um decréscimo dos níveis de IGF-1, GH, DHEA e testosterona. O estresse crônico tem efeitos interativos e independentes na supressão destes hormônios bem como na interrupção do eixo gonadal e função reprodutiva (EPEL, 2008).

Durante o processo senil os níveis de testosterona declinam gradualmente e estão correlacionados à perda da memória espacial e o aumento da incidência de desordens depressivas e ansiedade, além da diminuição da libido, problemas de ereção, irritabilidade, fadiga e perda do apetite (BUDDENBERG et al., 2009).

Segundo Herrera-Pérez et al. (2008), baixos níveis de hormônios sexuais em animais senis podem estar relacionados a uma menor resistência ao estresse e, conseqüentemente, a uma resposta neuronal comprometida, que favoreceria o surgimento de desordens depressivas.

Fêmeas, particularmente mulheres na menopausa, têm uma alta incidência de depressão e outras desordens relacionadas ao estresse. Estudos neuroendócrinos sugerem que o estrógeno tem um impacto sobre o eixo HPA,

desempenhando seu papel nestas doenças (CARRASCO; VAN DE KAR, 2002).

De acordo com Chen et al. (2010), a utilização de modelos animais permite melhorar a compreensão do estresse, principalmente com respeito à manipulação dos animais e transposição de respostas clínicas obtidas. Respeitando as peculiaridades evolutivas da espécie, ratos e camundongos também têm sido preferidos para o estudo da senilidade, uma vez que qualitativamente o processo de imunossenescência é o mesmo que nos humanos (FRANCESCHI et al., 2000). Da mesma forma, modelos murinos são utilizados para estudos comparativos hormonais (BAEZA et al., 2010).

A compreensão dos efeitos do estresse crônico sobre os hormônios sexuais durante a senilidade é o objeto de estudo deste trabalho, podendo contribuir para o controle de enfermidades relacionadas ao envelhecimento de indivíduos de ambos os sexos.

2. METODOLOGIA

2.1. Os animais

Neste trabalho foram utilizados ratos jovens (5 a 6 meses) e senis (23 a 24 meses), sendo 40 machos e o equivalente em fêmeas. Todos os animais receberam dieta *ad libitum* e foram submetidos a um protocolo de estresse crônico moderado, com estressores variados como restrição de ração e de água, calor, frio, imobilização, isolamento, luz intermitente e inclinação da gaiola. O protocolo teve a duração de 28 dias e os animais foram divididos em quatro tratamentos, sendo um controle (C), um segundo submetido ao protocolo de estresse (E), um terceiro com estresse e desafio imunológico inespecífico com adjuvante Saponina® (E+D) e um quarto grupo que, além do estresse e desafio imunológico, recebeu doses diárias de hormônio do crescimento durante os 28 dias do experimento na dose de 25 µg/kg p.v. por via subcutânea (BROWN-BORG; RAKOCZY, 2003; TREGUERRES et al., 2008) (E+D+GH). Para cada um dos tratamentos foram montados grupos contendo cinco animais jovens machos, cinco animais velhos machos e o mesmo número de fêmeas jovens e senis.

O presente experimento foi desenhado visando minimizar o número de animais utilizados. Ao final dos 28 dias de experimento, os animais foram sacrificados por decapitação em guilhotina, respeitando as normas internacionais (NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC, 1985) e do Conselho Federal de Medicina Veterinária, sob mínimas condições de estresse.

2.2. Ensaio hormonal

A coleta de sangue total dos animais ocorreu imediatamente após a decapitação, sendo as amostras centrifugadas a 1.000 g durante 20 minutos, sob refrigeração. O soro obtido foi aliquoteado e congelado a -80° para posteriores análises.

Os níveis séricos de testosterona e estrogênio foram mensurados quantitativamente por ensaio imunoenzimático – ELISA, utilizando os kits Interkit® em parceria com o Laboratório de Fisiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

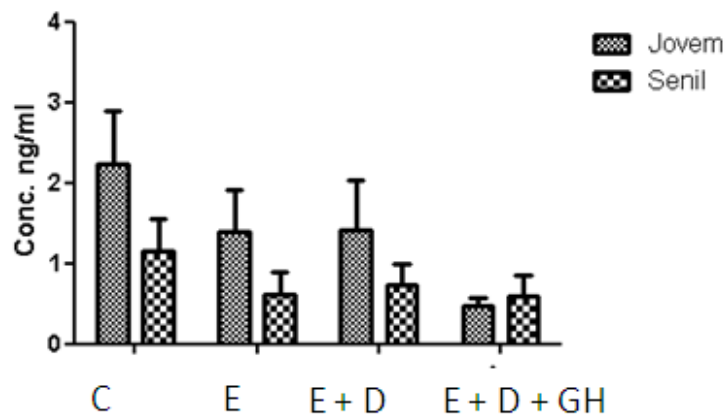
As amostras de soro foram descongeladas, homogeneizadas e centrifugadas a 2.500 giros por 10 minutos, sob refrigeração e as análises seguiram as recomendações da Interkit® 2010, para todos os protocolos. Os resultados foram expressos em ng/ml e pg/ml e cada amostra foi analisada em duplicata.

2.3. Análise estatística

Os resultados hormonais obtidos tiveram suas estatísticas descritivas analisadas através do software Sistema para Análises Estatísticas (SAEG® 9.1). Em função da pequena amostra, utilizou-se a estatística t, teste t de student, admitindo a normalidade da mesma, sendo o delineamento inteiramente casualizado em arranjo fatorial (2 x 2 x 4), sendo SEXO x IDADE x PROTOCOLOS, com cinco repetições.

3. RESULTADOS

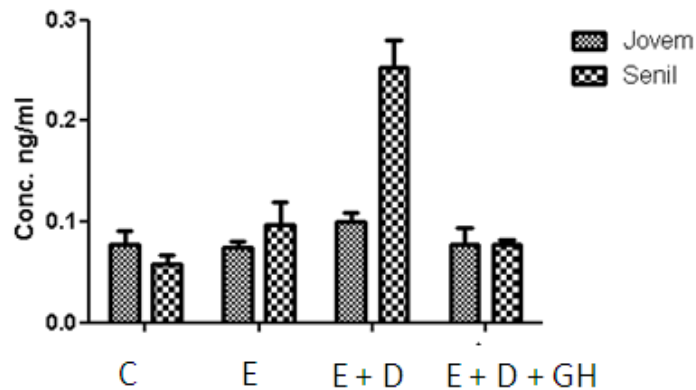
Nos machos, os níveis absolutos de testosterona sofreram um decréscimo, tanto em relação à idade quanto ao tratamento, sendo sempre mais baixo nos animais senis em relação aos jovens. Também os tratamentos de estresse e desafio provocaram a diminuição do hormônio. O grupo tratado com GH apresentou os menores níveis de testosterona entre os protocolos. No entanto, os animais senis tratados apresentaram níveis mais altos em comparação aos jovens do mesmo grupo, contrariando as demais tendências, conforme pode ser observado na Figura 1.



C = controle; E = estresse; E+D = estresse com desafio imunológico; E+D+GH = estresse com desafio imunológico e tratamento com hormônio do crescimento.

Figura 1 - Representação gráfica dos níveis de testosterona absolutos nos machos jovens e senis em cada um dos protocolos.

As fêmeas apresentaram um padrão similar na curva de testosterona independente da idade e do tratamento. Exceção válida para as fêmeas senis desafiadas, cujos níveis de testosterona tiveram seu valor absoluto aumentado em relação a todos os demais. Estes dados estão representados na Figura 2.



C = controle; E = estresse; E+D = estresse com desafio imunológico; E+D+GH = estresse com desafio imunológico e tratamento com hormônio do crescimento.

Figura 2 - Representação gráfica dos níveis de testosterona absolutos nas fêmeas jovens e senis em cada um dos protocolos.

Estatisticamente as análises de testosterona não foram significativas para os fatores idade, protocolo, nem na interação idade x protocolo ao nível de significância de 0,05. Como já previsto, a variável sexo influenciou significativamente os níveis deste hormônio ($p < 0,05$), bem como sua interação protocolo x sexo. Os resultados estão apresentados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Variações dos níveis de esteróides sexuais em função dos protocolos

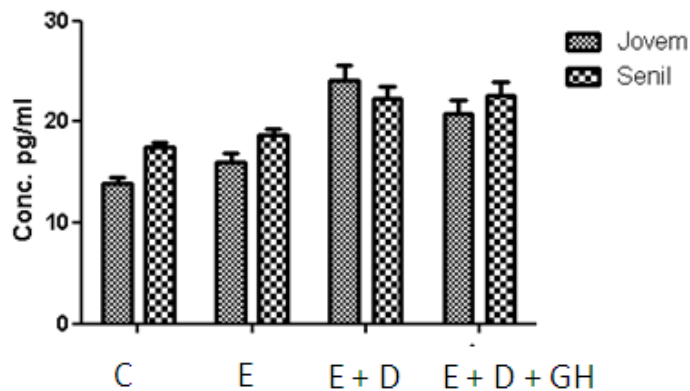
Protocolo/variável	Testosterona	Teste média	Estrógeno	Teste média
Controle	-	-	18.510	B
Estresse	-	-	18.600	B
Estresse + Desafio	-	-	23.482	A
Estresse + Desafio + GH	-	-	23.291	A

Letras diferentes na coluna indicam médias estatisticamente diferentes.

Tabela 2 - Nível de significância dos esteróides sexuais em função das variáveis analisadas e suas interações

Parâmetro/variável	Testosterona	Estrógeno
Idade	0.064	
Sexo	0.000*	0.004*
Protocolo	0.166	0.000*
Protocolo x idade		
Protocolo x sexo	0.078	0.251

* significativo ($p < 0,05$).



C = controle; E = estresse; E+D= estresse com desafio imunológico; E+D+GH= estresse com desafio imunológico e tratamento com hormônio do crescimento.

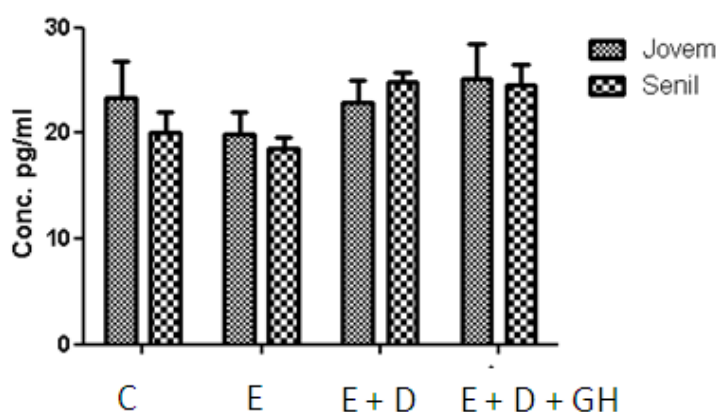
Figura 3 - Representação gráfica dos níveis de estradiol absolutos nos machos jovens e senis em cada um dos protocolos.

Os níveis absolutos de estradiol nos machos apresentaram uma curva contrária à testosterona, com aumento nos animais senis e uma tendência a elevação com os tratamentos. Os machos do grupo desafiado apresentaram maiores níveis em relação aos demais tratamentos, como pode ser visto na Figura 3. Os animais tratados com GH, tanto jovens como senis, apresentaram aumento absoluto deste hormônio em relação aos grupos controle e estresse.

Nas fêmeas, os níveis absolutos de estradiol diminuiram nos animais estressados em relação aos seus controles. No entanto, verificou-se aumento nos grupos desafiados e tratados com GH, que foi maior nas fêmeas senis desafiadas. Os valores estão representados graficamente na Figura 4.

Estatisticamente os níveis de estradiol foram influenciados pelas variáveis sexo e protocolo. Embora as análises tenham sido feitas para um nível de significância igual a $p < 0,05$, estas variáveis são altamente significativas ($p < 0,01$), conforme apresentado nas Tabelas 1 e 2.

As médias, estatisticamente foram iguais, para os protocolos controle © e estresse (E). Também o foram para os protocolos estresse + desafio (E+D) e estresse + desafio + GH (E+D+GH), tendo níveis superiores ao do C e E, conforme Tabela 2.



C = controle; E = estresse; E+D = estresse com desafio imunológico; E+D+GH = estresse com desafio imunológico e tratamento com hormônio do crescimento.

Figura 4 - Representação gráfica dos níveis de estradiol absolutos nas fêmeas jovens e senis em cada um dos protocolos.

4. DISCUSSÃO

Neste experimento a testosterona não apresentou alterações significativas para nenhum dos fatores e protocolos, com exceção para a variável sexo ($p < 0,05$) e sua interação protocolo x sexo. Em valores absolutos os níveis de testosterona sofreram um decréscimo progressivo relacionado tanto a idade quanto aos protocolos (Figura 1). Níveis diminuídos de testosterona também foram encontrados por Bowman et al. (2006) em um experimento com ratos senis machos e fêmeas submetidos a estresse crônico por imobilização por 21 dias.

De acordo com Lynch et al. (2009), o timo possui receptores de andrógenos que aumentam com a idade, podendo levar a apoptose de timócitos e produção de citocinas imunossupressoras como TNF- β . Também Leposavic et al. (2009) afirmam que machos castrados são mais resistentes a infecção por micobactérias, e que uma administração exógena deste hormônio diminui esta resistência.

O efeito imunossupressor da testosterona também foi demonstrado por Filipin et al. (2010) quando infectou ratos machos com *Trypanosoma cruzi*, aplicou testosterona e verificou um aumento do parasitismo e diminuição da proliferação de timócitos, comparados aos ratos não tratados com o hormônio.

Segundo Klein (2000), altas concentrações de testosterona aumentam o comportamento agressivo e competitivo, da mesma forma que reduzem a resposta imune humoral e celular, representando um alto custo de sobrevivência para os machos.

Neste estudo, as fêmeas jovens apresentaram valores absolutos de testosterona semelhantes, ao contrário das senis cujos valores oscilaram, com picos individuais no protocolo E+D. Segundo Foecking et al. (2008), fêmeas geralmente exibem baixas concentrações de andrógenos em relação aos machos da mesma espécie e os níveis de testosterona e diidrotestosterona variam de acordo com o ciclo estral.

Este experimento não avaliou o ciclo reprodutivo dos animais, mas estes picos de testosterona em algumas fêmeas senis sob estresse pode estar relacionado ao ciclo estral, já que ratas mantêm um ciclo regular até por volta dos 18 a 24 meses, só entrando em um diestro persistente após esta idade (BOWMAN et al., 2006) . Como as fêmeas senis deste trabalho apresentavam idade entre 22 e 24 meses, é provável que algumas ainda estivessem ciclando, justificando este elevado nível do hormônio.

Segundo Choudhry et al. (2007), o sistema imunológico de machos e fêmeas responde de formas diferentes a um insulto estressante como uma ferida ou hemorragia e atribuem aos esteróides gonadais esta diferença, uma vez que células imunes possuem a habilidade de sintetizar estes hormônios. Respostas diferentes entre os gêneros também foram encontradas neste estudo

O colesterol é a base para a síntese destes esteróides e é convertido em testosterona em ambos os sexos. O que diferencia a conversão da testosterona em 5 α -dehidrotestosterona (5 α -DHT) nos machos e em 17 β -oestradiol nas fêmeas são as enzimas 5 α -redutase e aromatase, respectivamente. Estas enzimas, juntamente a outras envolvidas na síntese de esteróides sexuais, estão presentes nas células imunes de órgãos linfóides (CHOUDHRY et al., 2007; EPEL, 2008).

Choudhry et al. (2007) relataram um experimento com machos e fêmeas submetidos a uma situação de trauma e mensuraram a expressão da atividade das enzimas 5 α -redutase e aromatase em células T. Verificaram um aumento significativo de 5 α -redutase nas células T de machos e conseqüente aumento dos níveis de 5 α -DHT, o que implicou em diminuição da função de células T. Ao contrário dos machos, as fêmeas tiveram aumento da aromatase e diminuição da 5 α -redutase, levando a conversão da testosterona em 17 β -oestradiol.

Estes achados confirmam a ação imunomoduladora do estradiol (REHMAN; MASSON, 2005; DARNALL; SUAREZ, 2009; LEPOSAVIC et al., 2009) e levam a suposição de que os níveis absolutos diminuídos de testosterona nos machos, desconsiderando-se a variável idade, podem estar relacionados a uma forma de defesa do organismo frente ao estresse em função do seu efeito deletério sobre o SI. Entretanto os dados deste trabalho vão de confronto aos de Bowman et al. (2006) quando afirmam que machos senis apresentam testosterona mais elevados.

Em relação ao estrógeno, os níveis absolutos nos machos senis foram maiores que nas fêmeas semelhante aos achados de Bowman et al. (2006), em um experimento, também com ratos, onde os níveis encontrados de estradiol foi duas vezes maior nos machos senis em relação às fêmeas de mesma idade.

De acordo com estes autores, a origem do estradiol circulante detectado em machos senis ainda não foi esclarecida. Evidências circunstanciais apontam para a possibilidade de conversão periférica da testosterona circulante, já que em primatas a gordura representa a origem periférica da atividade aromatase. Como os ratos senis acumulam gordura corporal, uma hipótese é que o aumento dos níveis circulantes de estradiol nos ratos machos senis seja um reflexo da atividade aromatase extra-gonadal.

Observou-se um aumento significativo nos níveis mensurados de estradiol neste trabalho, tanto em machos quanto em fêmeas, que foi maior nos protocolos E+D e E+D+GH. Em detrimento do efeito imunomodulador do estradiol, a literatura tem mostrado o duplo efeito sobre o SI. Hince et al. (2008) afirmam que um aumento deste hormônio nas fêmeas também está relacionado com a incidência de doenças autoimunes, como artrite reumatóide,

esclerose múltipla e lúpus eritematoso sistêmico. Contraditoriamente, camundongos com lesões como vasculite renal, inflamação periarticular, provocadas por uma deficiência nas células T, apresentam melhora significativa quando tratados com estrógeno (SELI; ARACI, 2002).

Estes mesmos autores afirmam que este esteróide feminino interage com o SI direta e indiretamente. Seus efeitos indiretos resultam da interação com outros hormônios, elevando GH, secreção de prolactina e liberação de timosina, todos afetando o desenvolvimento de células T. Durante os anos reprodutivos, as fêmeas têm uma resposta celular e humoral mais robusta em relação aos machos. Estes efeitos são observados em um timo maior, altas concentrações de anticorpos e melhor capacidade em rejeitar tumores.

Bird et al. (2008) fazem uma revisão sobre os efeitos dos esteróides, em situações de hemorragia, para ambos os sexos. Segundo os autores, a administração de baixas doses de estrógeno ou o bloqueio do receptor de andrógeno em machos, melhora a imunossupressão observada com a perda de sangue. Para as fêmeas, a administração de testosterona ou o bloqueio de estrógeno é que melhora a função imune, confirmando o efeito dúbio destes hormônios. Neste estudo, o uso do GH não influenciou significativamente os níveis dos hormônios sexuais, apresentando valores estatisticamente iguais ao do protocolo E+D. No entanto, de acordo com Brown-Borg (2009), o GH pode interferir na condição reprodutiva quando camundongos GH transgênicos, com elevados níveis plasmáticos de GH, apresentam maturação sexual e senescência reprodutiva precoces. Além disso, fêmeas de uma linhagem de camundongos anões são inférteis e os machos são subférteis, com reduzida espermatogênese e ausência de comportamento masculino.

Dentre os diversos fatores que contribuem para o declínio da função imune com o envelhecimento, os hormônios esteróides são considerados potentes imunossupressores e sua inibição tem revertido este estado degenerativo e induzido a recuperação das funções e celularidade tanto do timo como da medula óssea, retomando a competência imune a níveis equivalentes ao de um jovem (CHIDGEY et al., 2007).

Alguns autores sugerem então a gonadectomia como medida terapêutica para reversão da involução tímica, já que, segundo Hince et al. (2008), existem receptores para os esteróides sexuais nas células estromais

tímicas. Para Perisic et al. (2010), os efeitos de uma gonadectomia são transitórios e limitados sobre o “rejuvenescimento” do timo e podem ser devido a uma produção compensatória de andrógenos pelas células tímicas e estrógenos pela adrenal e tecido adiposo.

Os animais considerados jovens já se encontravam em idade de declínio do tecido tímico, que, segundo Shanker (2004), é coincidente com a puberdade. Como os ratos alcançam a idade reprodutiva entre 50 e 60 dias (SHARP; LA REGINA, 1998), considera-se já haver níveis de hormônios sexuais circulantes tanto nas fêmeas quanto nos machos. Entretanto, para Quaglino *et al.* (1998) as principais mudanças involutivas no timo de ratos acontecem à partir do sexto mês de vida, o que coincide com a idade dos animais jovens deste experimento.

Os efeitos dos esteróides sexuais sobre o eixo HPA também apresentam um aspecto dimórfico, sendo que a testosterona inibe a função do eixo e o estrógeno estimula. De acordo Renard et al. (2005), um dos mecanismos destes esteróides na modulação da resposta ao estresse é a ligação de seus respectivos receptores genômicos em áreas específicas do SNC e aumento de catecolaminas através de um mecanismo similar no SNS.

A concentração de catecolaminas e atividade adrenal foi maior em ratos machos submetidos a um estresse crônico por privação materna, sugerindo maior sensibilidade ao estressor em relação às fêmeas. Os autores hipotizam que um nível menor de ansiedade verificado nas fêmeas pode ser consequência do efeito regulador do estrógeno.

Segundo Foecking et al. (2008), nas fêmeas, o estrógeno promove uma proteção aos efeitos deletérios do estresse no desempenho cognitivo, então, uma possível hipótese para os elevados níveis de estradiol em machos senis deste trabalho, pode estar relacionada também a um efeito protetor, conferindo resistência ao estresse. Os esteróides sexuais podem promover mudanças morfológicas em tecido cerebral através de vários mecanismos como indução ou supressão de apoptose, migração celular, sinaptogênese, interações com fatores de crescimento, interações com mediadores parácrinos como prostaglandina e estradiol, além de efeitos na aposição glial-neuronal.

Baeza et al. (2010), utilizando um modelo de menopausa induzida em camundongos por ovariectomia, relataram alterações comportamentais nos

animais castrados, além de uma diminuição da resposta proliferativa de células NK, sugestivas de um envelhecimento precoce ou imunossenescência.

A ciência tem buscado incessantemente compreender os mecanismos do envelhecimento na tentativa de reverter o processo degenerativo do organismo. A reconstituição tímica parece ser a alternativa mais eficiente para o restabelecimento do sistema imunológico senil. No entanto, diversos são os fatores que interagem com a depleção imunológica e uma intervenção neuroendócrina parece ser o caminho para um envelhecimento saudável.

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho, pode-se inferir que os níveis elevados de estradiol nos animais dos protocolos E+D e E+D+GH, de ambos os sexos, pode ser uma tentativa do organismo de estimular a resposta imunológica e proteger-se dos efeitos deletérios do estresse.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAEZA, I.; DE CASTRO, N.M.; GIMÉNEZ-LLORT, L.; DE LA FUENTE, M. Ovariectomy, a model of menopause in rodents, causes a premature aging of the nervous and immune systems. **Journal of Neuroimmunology**, v. 219, p. 90-99, 2010.

BAUER, M.E.; JECKEL, C.M.M.; LUZ, C. The role of stress factors during aging of the immune system. **Neuroimmunomodulation**, v. 1153, p. 139-152, 2009.

BIRD, M.D.; KARAVITIS, J.; KOVACS, E.J. Sex differences and estrogen modulation of the cellular immune response after injury. **Cellular Immunology**, v. 252, p. 57-67, 2008.

BOWMAN, R.E.; MACLUSKY, N.J.; DIAZ, S.E.; ZRULL, M.C.; LUINE, V.N. Aged rats: Sex differences and responses to chronic stress. **Brain Research**, v. 1126, p. 156-166, 2006.

BROWN-BORG, H.M. Hormonal control of aging in rodents: the somatotropic axis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 299, p. 64-71, 2009.

BROWN-BORG, H.M.; RAKOCZY, S.G. Growth hormone administration to long-living dwarf mice alters multiple components of the antioxidative defense system. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 124, p. 1013-1024, 2003.

BUDDENBERG, T.E.; KOMOROWSKI, M.; RUOCCO, L.A.; SOUZA E SILVA, M.A.; TOPIC, B. Attenuating effects of testosterone on depressive-like behavior in the forced swim test in healthy male rats. **Brain Research Bulletin**, v. 79, p. 182-186, 2009.

CARRASCO, G.A.; VAN DE KAR, L.D. Neuroendocrine pharmacology of stress. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p. 235-272, 2002.

CHEN, Y.; WU, C.; KAO, C.; TSAI, T. Longevity and lifespan control in mammals: Lessons from the mouse. **Ageing Research Reviews**, v. 9, p. S28-S35, 2010.

CHIDGEY, A.; DUDAKOV, J.; SEACH, N.; BOYD, R. Impact of niche aging on thymic regeneration and immune reconstitution. **Seminars in Immunology**, v. 19, p. 331-340, 2007.

CHOUHRY, M.A.; BLAND, K.I.; CHAUDRY, I.H. Trauma and immune response – Effect of gender differences. **Injury, International Journal of the Care of the Injured**, v. 38, p. 1382-1391, 2007.

DARNALL, B.D.; SUAREZ, E.C. Sex and gender in psychoneuroimmunology research: Past, present and future. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 23, p. 595-604, 2009.

EPEL, E.S. Psychological and metabolic stress: a recipe for accelerated cellular aging? **Hormones**, v. 8, p. 7-22, 2009.

FILIPIN, M.D.V.; CAETANO, L.C.; BRAZÃO, V.; SANTELLO, F.H.; TOLDO, M.P.A.; PRADO JR., J.C. DHEA and testosterone therapies in *Trypanosoma cruzi*-infected rats are associated with thymic changes. **Research in Veterinary Science**, v. 89, p. 98-103, 2010.

FOECKING, E.M.; McDEVITT, M.A.; ACOSTA-MARTÍNEZ, M.; HORTON, T.H.; LEVINE, J.E. Neuroendocrine consequences of androgen excess in female rodents. **Hormones and Behavior**, v. 53, p. 673-692, 2008.

FRANCESCHI, C.; BONAFÉ, M.; VALENSIN, S. Human immunosenescence: the prevailing of innate immunity the failing of clonotypic immunity, and the filling of immunological space. **Vaccine**, v. 18, p. 1717-1720, 2000.

GARCIA-SEGURA, L.M.; DIZ-CHAVES, Y.; PEREZ-MARTIN, M.; DARNAUDERY, M. Estradiol, insulin-like growth factor-I and brain aging. **Psychoneuroendocrinology**, v. 32, p. S57-S61, 2007.

GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de fisiología médica**. 11.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 1115 p.

HERRERA-PÉREZ, J.J.; MARTÍNEZ-MOTA, L.; FERNÁNDEZ-GUASTI, A. Aging increases the susceptibility to develop anhedonia in male rats. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 32, p. 1798-1803, 2008.

HINCE, M.; SAKKAL, S.; VLAHOS, K.; DUDAKOV, J.; BOYD, R.; CHIDGEY, A. The role of sex steroids and gonadectomy in the control of thymic involution. **Cellular Immunology**, v. 252, p. 122-138, 2008.

KLEIN, S.L. Hormones and mating system affect sex and species differences in immune function among vertebrates. **Behavioral Process**, v. 51, p. 149-166, 2000.

LEPOSAVIC, G.; PERISIC, M.; KOSEC, D.; ARSENOVIC-RANIN, N.; RADOJEVIC, K.; STOJIC-VUKANIC, Z.; PILIPOVIC, I. Neonatal testosterone imprinting affects thymus development and leads to phenotypic rejuvenation and masculinization of the peripheral blood T-cell compartment in adult female rats. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 23, p. 294-304, 2009.

LYNCH, H.E.; GOLDBERG, G.L.; CHIDGEY, A.; VAN DEN BRINK, M.R.M.; BOYD, R.; SEMPOWSKI, G.D. Thymic involution and immune reconstitution. **Trends in Immunology**, v. 30, p. 366-373, 2009.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Guide for care and use of laboratory animals**: a report of the Institute of Laboratory Animal Resources Committee on Care and Use of Laboratory Animals. 1985.

NASS, R.; JOHANNSSON, G.; CHRISTIANSEN, J.S.; KOPCHICK, J.J.; THORNER, M.O. The aging population – is there a role for endocrine interventions? **Growth Hormones & IGF Research**, v.19, p. 89-100, 2009.

PARDON, M. Stress and ageing interactions: a paradox in the context of shared etiological and physiopathological processes. **Brain Research Reviews**, v. 54, p. 251-273, 2007.

PERISIC, M.; ARSENOVIC-RAMIN, N.; PILIPOVIC, I.; KOSEC, D.; PESIC, V.; RADOJEVIC, K.; LEPOSAVIC, G. Role of ovarian hormones in aged-associated thymic involution revisited. **Immunobiology**, v. 215, p. 275-293, 2010.

QUAGLINO, D.; CAPRI, M.; BERGAMINI, G.; EUCLIDI, E.; ZECCA, L.; FRANCESCHI, C.; RONCHETTI, I.P. Age-dependent remodeling of rat thymus. Morphological and cytofluorimetric analysis from birth up to one year of age. **European Journal of Cell Biology**, v. 76, p. 156-166, 1998.

REHMAN, H.U.; MASSON, E.A. Neuroendocrinology of female aging. **Gender Medicine**, v. 2, p. 41-56, 2005.

RENARD, G.M.; SUÁREZ, M.M.; LEVIN, G.M.; RIVAROLA, M.A. Sex differences in rats: Effects of chronic stress on sympathetic system and anxiety. **Physiology & Behavior**, v. 85, p. 363-369, 2005.

SELI, E.; ARICI, A. Sex steroids and the immune system. **Immunology Allergy Clinical National American**, v. 22, p. 407-433, 2002.

SHANKER, A. Is thymus redundant after adulthood? **Immunology Letters**, v. 91, p. 79-86, 2004.

SHARP, P.E.; LA REGINA, M.C. **The laboratory rat**. New York: CRC Press, 1998.

TRESGUERRES, J.A.F.; KIREEN, R.; TRESGUERRES, A.F.; BORRAS, C.; VARA, E.; ARIZNAVARRETA, C. Molecular mechanisms involved in the hormonal prevention of aging in the rat. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 108, p. 318-326, 2008.

VASTO, S.; CANDORE, G.; BALISTRERI, C.R.; CARUSO, M.; COLONNA-ROMANO, G.; GRIMALDI, M.P.; LISTI, F.; NUZZO, D.; LIO, D.; CARUSO, C. Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 128, p. 83-91, 2007.

WAGNER-SMITH, K.; MARKOU, A. Depression: a repair response to stress-induced neuronal microdamage that can grade into a chronic neuroinflammatory condition? **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 35, p. 742-764, 2011.

CAPÍTULO 5

IMUNOPROTEASOMAS E SUA FUNÇÃO NO ENVELHECIMENTO

RESUMO: O envelhecimento está associado a mudanças em diversos sistemas do organismo, inclusive o sistema imunológico. A imunossenescência é acompanhada por alterações na síntese e degradação de proteínas, levando ao acúmulo de proteínas danificadas. O proteasoma é a principal maquinaria proteolítica celular, responsável pela degradação de proteínas normais e danificadas, mas sua atividade sofre um decréscimo durante o envelhecimento. Células imunes e outras ativadas por citocinas inflamatórias expressam uma variante do proteasoma denominada imunoproteasoma que é composto por subunidades catalíticas, ajudando a prevenir o acúmulo de proteínas agregadas. Sua expressão no SNC tem sido relacionada a doenças neurodegenerativas decorrentes do envelhecimento.

Palavras-chave: Imunossenescência, imunoproteasoma, sistema nervoso, proteínas.

IMMUNE PROTEASOMES AND ITS FUNCTION IN AGING

ABSTRACT: Aging is associated with changes in several body systems including the immune system. The immunosenescence is accompanied by changes in synthesis and degradation of proteins, leading to accumulation of damaged proteins. The proteasome is the major cellular proteolytic machinery responsible for degradation of normal and damaged proteins, but its activity suffers a decline during aging. Immune and others cells activated by inflammatory cytokines express a proteasome's variant called immune proteasome which is composed of catalytic subunits, helping to prevent the accumulation of aggregated proteins. Its expression in the SNC has been linked to neurodegenerative diseases of aging.

Keywords: Immunosenescence, immune proteasome, nervous system, protein.

1. INTRODUÇÃO

A taxa de envelhecimento da população mundial vem aumentando nas últimas décadas. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (2011), estima-se que a população de idosos alcance quase dois bilhões. No Brasil, este crescimento também é real e a faixa etária acima de 60 anos é a que mais cresce em termos proporcionais, devendo alcançar uma projeção de 32 milhões de idosos em 2050. Segundo a Organização Mundial de Saúde, este crescimento representa 16 vezes o número de pessoas acima de 60 anos contra o crescimento de cinco vezes da população total (BRASIL, 2002).

O envelhecimento é acompanhado por alterações de caráter, a princípio, fisiológico, que adquirem uma condição de doença, com aumento da vulnerabilidade do organismo. Como consequência, o avançar da idade promove o aumento exponencial das taxas de morbidade e mortalidade (VASTO et al., 2007; NASS et al., 2009).

O sistema imunológico também passa por alterações como a involução do timo, diminuição do repertório de células T virgens, aumento das células de memória, aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias, encurtamento do telomere com danos ao DNA, que caracterizam a imunossenescência (KRABBE et al., 2004; DE MARTINIS et al., 2005; WENG, 2006).

Segundo Franceschi et al. (2007), o sistema imune de um indivíduo, é submetido a uma constante carga de desafios imunológicos promovendo uma sobrecarga antigênica denominada “inflammaging”. A capacidade de responder a estes insultos está relacionada à resposta ao estresse, cujo mecanismo central sofre prejuízo durante o envelhecimento.

Alterações neurológicas decorrentes de danos freqüentes ao cérebro, na tentativa de responder aos insultos estressantes, levam a uma atrofia do córtex pré-frontal e do hipocampo, estando relacionadas com doenças neurodegenerativas como Doença de Alzheimer, esclerose múltipla, demência (MIZOGUCHI et al., 2009).

Ao nível molecular, oxidação, conjugação e glicolização de proteínas promovem mutações acumulativas no DNA, caracterizando o processo de envelhecimento. Os imunoproteasomas agem na degradação destas proteínas

danificadas e são um importante tópico do campo de pesquisa sobre senilidade (MISHTO et al., 2010).

2. PROTEASOMA – IMUNOPROTEASOMA

Para manter a viabilidade e funcionalidade celular é importante que as proteínas sejam submetidas à renovação. Para que isso ocorra, as proteínas dobradas, modificadas ou danificadas e até mesmo aquelas não necessárias devem ser reconhecidas e degradadas. Durante o processo evolutivo, vários sistemas foram se desenvolvendo com este propósito.

Os níveis de proteínas intracelulares são resultado do balanço entre os processos de síntese e degradação, sendo fundamentais para o funcionamento correto das células. A degradação das proteínas é regulada e acontece através de duas vias principais: a primeira representada pelos lisossomas, organelas vesiculares contendo hidrolase ácida, com diferentes especificidades que mantêm proteínas endógenas constitutivas ou internaliza as exógenas por endocitose e pinocitose (CIECHANOVER, 2005).

A outra via proteolítica envolve a ubiquitina, um polipeptídeo de 76 aminoácidos, que age como marcador pela degradação de um complexo multienzimático, o proteasoma. O sistema ubiquitina-proteasoma não requer compartimentação e um complexo catalítico age em pH neutro, com mecanismos dependentes de ATP, envolvendo numerosas moléculas adjuvantes consideradas “semaforinas” (FINLEY et al., 2004).

O sistema ubiquitina-proteasoma age sobre diversas classes de proteínas, sendo responsável por cerca de 90% da degradação extra lisossomal que intervém na regulação de numerosos processos celulares. De acordo com Ciechanover (1998), estes processos celulares são: a) controle do ciclo celular mediante proteólise de proteínas reguladoras específicas; b) crescimento e proliferação celular através da degradação de oncoproteínas e de proteínas da via de transdução; c) reparo do DNA; d) regulação da transcrição; e) regulação da resposta inflamatória e imune; f) processamento da apresentação de antígenos em associação ao MHC-I e g) degradação de proteínas modificadas ou danificadas (DRiPs). Em função de intervir em processos de importância vital para a célula, sua inibição leva à morte celular e

seu mau funcionamento pode ser a base de numerosos eventos patológicos (CHIECHANOVER, 1998).

Segundo Seifert et al. (2010), o sistema ubiquitina proteasoma (UPS) representa o principal sistema de degradação dependente de ATP nos eucariotas que está envolvido na manutenção da homeostase celular. A função central do proteasoma 26S é a degradação de proteínas poliubiquitinadas formadas pela cascata de enzimas E1, E2 e E3, que ativam, conjugam e transferem múltiplos pedaços da ubiquitina a substratos de proteínas, marcando estes alvos para degradação.

Substratos de proteasomas são proteínas reguladoras de vida curta envolvidas na diferenciação celular, na regulação do ciclo celular, regulação da transcrição ou apoptose. A rápida eliminação das proteínas pelo UPS é também de particular importância sob condições de estresse, como choque térmico ou estresse oxidativo, que causa a produção de proteínas parcialmente desnaturadas ou dobradas (SEIFERT et al., 2010).

A enzima E4, conhecida como fator de associação, suporta a formação de cadeias poliméricas de ubiquitina (CHIECHANOVER, 1998). Este mecanismo de formação dos proteasomas é apresentado na Figura 1.

O sistema proteasomal é o mais importante do citosol. Este sistema consiste de 20S “cerne” (core) de proteasoma e um grupo de proteínas reguladoras que carregam estas atividades específicas. O “core” proteasoma 20S é a principal partícula do sistema proteasomal, sendo uma complexa estrutura celular envolvida na degradação proteolítica de proteínas oxidadas, regulação da expectativa de vida destas proteínas, controle de qualidade, expressão de gene, estresse e resposta imune, carcinogênese, reparo do DNA e, provavelmente, em muitas outras funções celulares e vias regulatórias que ainda não foram descobertas (JUNG et al., 2010).

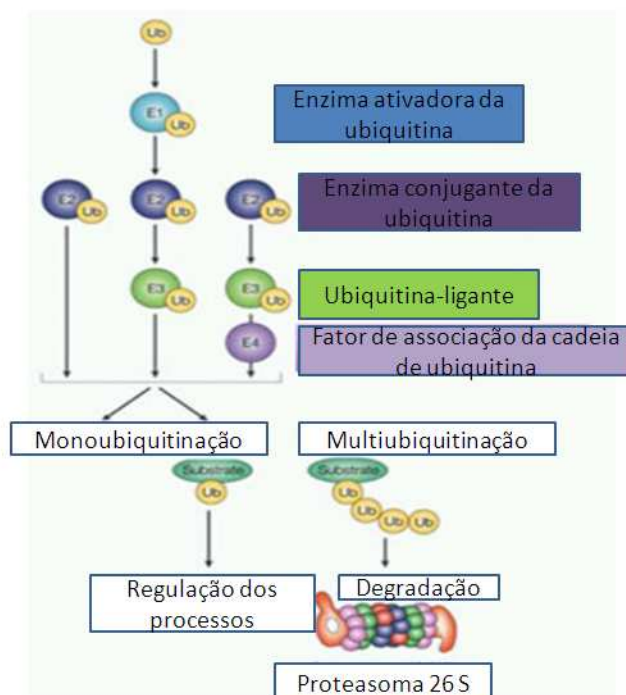
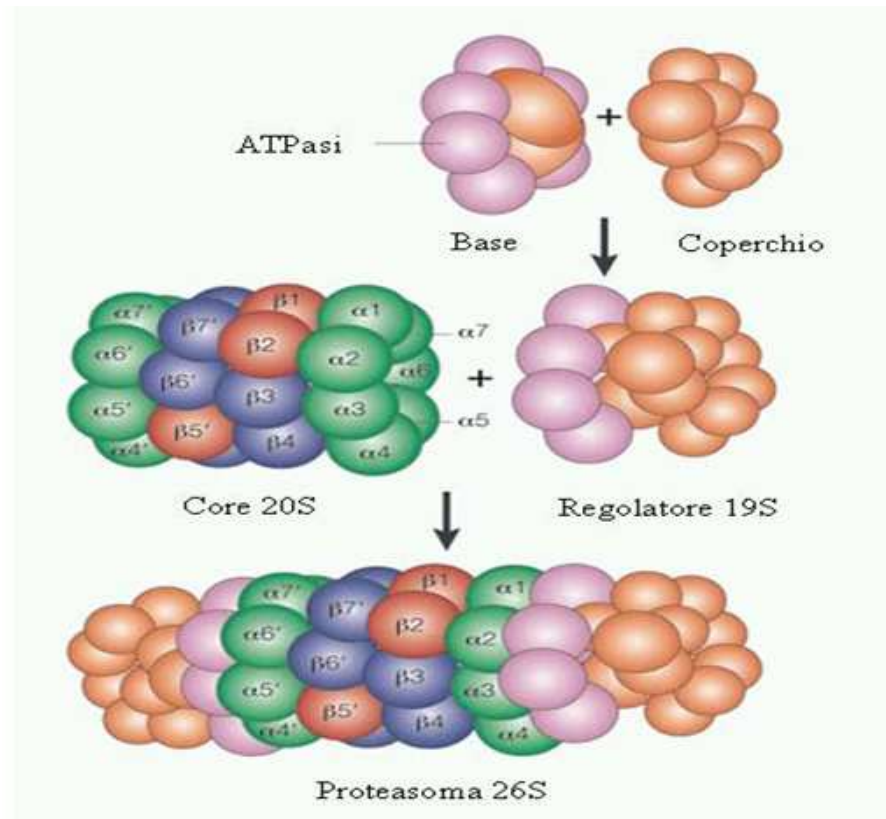


Figura 1 - Processo de ubiquitinação através das enzimas, para reconhecimento do proteasoma 26S.

O proteasoma 20S é a parte central do sistema proteasomal que é essencial para todas as células eucariotas (plantas e animais) e algumas células procariotas. É uma estrutura cilíndrica, com peso molecular de 700 kDa, com quatro anéis heptâmeros homólogos (2α e 2β) organizados numa seqüência $\alpha\beta\beta\alpha$. Está presente e ativo tanto no citoplasma quanto no núcleo (CHONDROGIANI; GONOS, 2005; JUNG et al., 2010).

O “core” catalítico 20S associa-se com o complexo regulador 19S para formar o proteasoma 26S que é uma multi-subunidade do complexo protease (SEIFERT et al., 2010). Esta multi-subunidade está envolvida na renovação das proteínas de vida curta, regulando uma variedade de processos celulares tais como sinais de transição, resposta ao estresse, controle transcripcional, segregação cromossômica, reparo do DNA e progressão do ciclo celular. Suas atividades proteolíticas residem nas subunidades $\beta 1$, $\beta 2$ e $\beta 5$ (KRÜGER et al., 2001). Um detalhamento da estrutura do proteasoma 26S é apresentado na Figura 2.

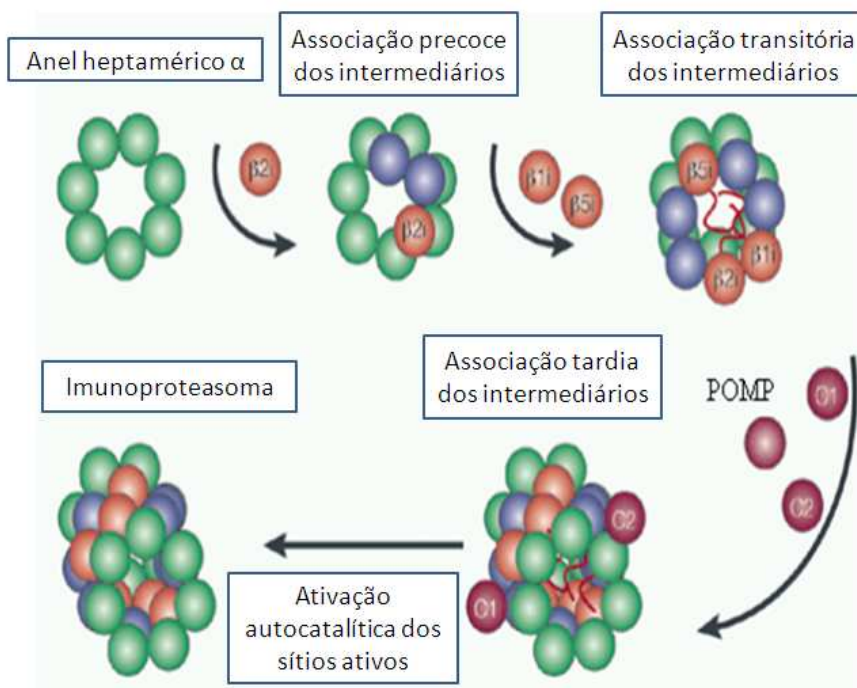


O proteasoma 20 S se une a unidade reguladora 19 S para formar o proteasoma 26 S.

Figura 2 - Estrutura do proteasoma.

O proteasoma reconhece e degrada substratos de proteínas modificadas pelas cadeias de poliubiquitinas e pequenos fragmentos de proteínas gerados pelo proteasoma têm sido usados pelo MHC-I para apresentação de antígenos ao sistema imune, principalmente às células T citotóxicas (DEVENTER; NEEFJES, 2010; DOWLING et al., 2010; SEIFERT et al., 2010).

No entanto, isso pode ser complicado pela presença de genes no locus MHC que encontra as duas variantes de subunidades catalíticas Imp2/ β 1i, Imp7/ β 5i. Estas duas subunidades, associadas a uma terceira subunidade Imp7/ β 2i, são abundantes nas células do sistema imune e são expressas em outros tipos de células após exposição à citocina interferon- γ (INF- γ). Células imunes que expressam estas subunidades catalíticas variantes possuem um proteasoma especializado chamado imunoproteasoma (DEVENTER; NEEFJES, 2010), que é apresentado na Figura 3.



A ativação da subunidade β acontece sobre o anel heptamérico formado pela subunidade α . As seqüências são uma função específica no processo e acontecem autocataliticamente. Na última passagem já está na parte interna do cilindro, completamente agrupado (C - chaperoninas; POMP - proteína de maturação do proteasoma).

Figura 3 - Formação do imunoproteasoma.

Em vertebrados, as subunidades β do proteasoma 20S cataliticamente ativas ($\beta1i/LMP2$, $\beta2i/MECL-1$, $\beta5i/LMP7$) são incorporadas ao complexo proteasoma originado da indução da citocina IFN- γ , para formar uma composição proteasoma alternativa. Duas dessas subunidades, $\beta1i/LMP2$ e $\beta5i/LMP7$, são encontradas dentro do MHC-I, que leva os resíduos para o imunoproteasoma (SEIFERT et al., 2010).

Os imunoproteasomas apresentam atividades peptidases alteradas e limpam locais determinados resultando em uma eficiente liberação de epítomos. O aumento da oferta de peptídeos pelo imunoproteasoma tem efeito positivo na eficiência da apresentação de antígenos pelo MHC-I e é importante para disparar uma precoce resposta de células T citotóxicas (CIECHANOVER, 2010; SEIFERT et al., 2010).

Segundo Yewdel (2005), os imunoproteasomas são constitutivamente expressos em células e tecidos imunológicos e, em níveis mais baixos, em

outros tipos celulares, tendo sua expressão induzida pelas citocinas Interferon gama (IFN- γ) ou Fator de necrose tumoral alfa (TNF α).

Uma grande quantidade de novas proteínas geradas é defeituosa na dobra, translação ou associação e então, necessitam ser destruídas para prevenir a formação de agregados potencialmente perigosos. Estes produtos são chamados produtos ribossomais defeituosos (DRiPs). Os imunoproteasomas são essenciais para a degradação de DRiPs resultando da translação mTOR induzida após exposição ao IFN- γ (DEVENTER; NEEFJES, 2010).

O complexo regulador PA28 é ativado pelo IFN- γ e expresso constitutivamente em muitos tecidos, inclusive no cérebro. Ele é composto de duas subunidades, PA28 α e PA28 β , organizadas em um complexo 14-heptamérico $\alpha_3\beta_4$ com cerca de 180-200 kDa. Tais subunidades são originadas pela duplicação e divergência do gene que codifica PA28 γ , uma proteína de localização prevalentemente nuclear, expressa em altos níveis no cérebro e dotada de atividade anti-apoptótica (RECHSTEINER; HILL, 2005).

O PA28 α se liga de maneira independente aos anéis externos do proteasoma 20S e sua expressão está relacionada a um aumento da eficiência da apresentação de antígenos, mas não influencia a troca de outras proteínas celulares, nem favorece a associação do imunoproteasoma.

Krüger et al. (2001), em estudos de cinética, ilustram como o PA28 α aumenta a afinidade do proteasoma pelo substrato protéico, sem modificar a atividade máxima do complexo enzimático e favorecendo a entrada para degradar e liberar produtos. No *core* 20S a porção amino terminal da subunidade α se projeta para a parte interna da cavidade catalítica, bloqueando o acesso e, contraditoriamente, as subunidades 19S e PA28 α vão para a abertura do canal.

Internamente, na célula, a presença do PA28 α e do regulador 19S levam a formação de complexos híbridos 19S-20S-PA28 α , que representam em torno de 25% do total de proteasomas. A presença desta forma particular de proteasoma, associada à expressão do imunoproteasoma sob ação do INF- γ , serão responsáveis pela produção de peptídeos diferentes daqueles gerados do 26S contendo somente o 19S (YEWDEL, 2005).

De acordo com Chondrogianni et al. (2010), uma correta manipulação do proteasoma, por métodos genéticos ou naturais, pode retardar a senescência em até 15%. Estes mesmos autores testaram os efeitos da quercetina em culturas de fibroblastos humanos. Trata-se de uma substância com propriedades anti-oxidantes capaz de ativar o proteasoma e influenciar a viabilidade e sobrevivência celular.

3. O PROTEASOMA NO SISTEMA NERVOSO CENTRAL E NO ENVELHECIMENTO

O controle de qualidade de proteínas é essencial para promover a função celular e orquestrar uma eficiente resposta celular ao estresse, sendo essencial para a manutenção do organismo. Evidências propõem que um declínio funcional de componentes da rede de proteases é decisivo para o envelhecimento. A correção dos defeitos na homeostase protéica em organismos senis representa uma das formas mais promissoras na luta contra o processo de envelhecimento (KOGA et al., 2010).

Durante o processo de envelhecimento, o sistema ubiquitina-proteasoma sofre numerosas modificações (MISHTO et al., 2006a). Mesmo havendo uma diminuição da atividade do proteasoma em vários tecidos, em humanos centenários sua atividade é mantida, principalmente nos fibroblastos (CHONDROGIANNI, 2000).

Poucas informações são disponíveis sobre modificações do imunoproteasoma no envelhecimento, mas Ferrington et al. (2005) relataram um aumento do imunoproteasoma e uma diminuição do proteasoma constitutivo no músculo de ratos velhos em relação aos jovens.

Como ocorre um aumento relacionado à idade do grau de oxidação, ubiquitinação e conjugação de lípidos peroxidados, resultando em uma alteração do complexo catalítico, acredita-se que 19S e 20S sejam ubiquitinadas no mesmo nível. No entanto, esta modificação não altera o processo da associação do 26S, não existindo nenhuma diferença na relação 26S/20S durante o envelhecimento (MISHTO et al., 2003).

O proteasoma 20S é o principal responsável pela degradação da ubiquitina e, mesmo em baixos níveis de estresse oxidativo, ocorre uma

modificação da sua estrutura e aumento da sua atividade através da indução de chaperonas como as HSPs (DING; KELLER, 2001). Entretanto, existem evidências de que o proteasoma 20S, em particular o constitutivo, é mais resistente ao estresse oxidativo que o 26S, como demonstrado pelo acúmulo de proteínas poliubiquitinadas. Neste momento a subunidade LMP2 se torna fundamental para a eliminação de proteínas oxidadas e para a sobrevivência celular (DING et al., 2006; MISHTO et al., 2010).

Elevados níveis de HSP ocorrem durante o envelhecimento normal e podem estar associados a diversas doenças neurodegenerativas, indicando um papel neuroprotetor destas chaperonas. Elas atuam como um sinal para o SNC indicando alterações intracelulares que ocorrem durante o estresse oxidativo. Para Ding e Keller (2001), a expressão elevada de HSPs preserva a função do proteasoma via dobramento da proteína, desagregação protéica e transporte para o proteasoma. Este pode ser um importante aspecto na prevenção do acúmulo de proteínas oxidadas e prevenir a inibição do proteasoma nos locais onde as proteínas são inseridas.

O proteasoma 20S parece ser predominantemente expresso no cérebro com múltiplas isoformas LMP2 e PA28 α e, em uma análise por imunohistoquímica da atividade do proteasoma no SNC, verificou-se ser sua atividade predominantemente citosólica (DING; KELLER, 2001).

Os imunoproteasomas são expressos constitutivamente no cérebro e em lentes oculares, caracterizando estes tecidos como imunoprivilegiados, sem aparente necessidade de gerar peptídeos I ligantes e sugerindo uma função alternativa para imunoproteasomas. Acredita-se então que imunoproteasomas têm uma importante função além daquela processadora de antígenos tanto em tecidos normais quanto em infectados por patógenos (YEWDEL, 2005).

Com relação à expressão e composição do imunoproteasoma no SNC, existem variações quanto às áreas cerebrais, com particular atenção para os neurônios piramidais do córtex e hipocampo, que apresentam maiores conteúdos de proteasoma (MENGUAL et al., 1996).

Muitas das modificações do sistema ubiquitina-proteasoma ocorridas durante o envelhecimento são descritas também no SNC, mas as informações da literatura têm sido conflitantes. Uma diminuição da atividade do proteasoma foi descrita no hipocampo, córtex, cerebelo, tronco encefálico e medula

espinhal de ratos senis (JUNG et al., 2010). Diversamente, Abd El Mohsen et al. (2005), demonstraram um aumento oxidativo no hipocampo de ratos velhos, mas não no córtex ou cerebelo, além de nenhuma variação relacionada ao envelhecimento na atividade do proteasoma.

Em outro trabalho, Ding et al. (2006) evidenciaram um aumento da atividade relacionado à idade de algumas subunidades do proteasoma e nenhuma diferença na atividade do complexo 20S, descrevendo uma diminuição da atividade 26S e um aumento nos níveis de proteínas oxidadas nestes animais senis.

Quando os mecanismos pró-oxidativo e de defesa sofrem um desequilíbrio, como no envelhecimento ou em alguma doença neurodegenerativa, a inibição do proteasoma é um mecanismo que favorece o acúmulo de proteínas oxidadas e a formação de agregados, com graves alterações na homeostase neuronal. Verifica-se um acúmulo de lipofuxina intracelular com indução de autofagia, além de uma alteração da expressão de genes relacionados a muitas patologias neurodegenerativas. Também há um aumento da suscetibilidade a apoptose induzida por TNF- α com inibição irreversível da síntese protéica (DING et al., 2006).

O complexo multicatalítico mede a degradação de proteínas de importância para a sobrevivência neuronal como as ciclinas, p53, a parkinina, os agregados protéicos e as proteínas oxidadas. A degradação das histonas e de alguns fatores de transcrição ou reguladores desta transcrição sugere o papel do proteasoma na manutenção da homeostase nuclear (COLLINS; TANSEY, 2006).

A expressão da ubiquitina e do proteasoma, nas terminações sinápticas ou no citosol e no núcleo, indica a importância destes nas conexões neurais, nas transmissões de impulsos nervosos e na plasticidade sináptica (MISHTO et al., 2006b).

Também são poucas as informações sobre os fatores reguladores da transcrição dos componentes do proteasoma, com algumas evidências de que seria coordenada por mais de uma subunidade. Uma análise de bioinformática, associada a um estudo *in vitro* sugere que a expressão dos genes *psmb8* (LMP7), *psmb9* (LMP2), *psme1* (PA28 α), *psme2* (PA28 β), entre outros de enzimas ubiquitinantes E2 e E3, são regulados pelos fatores de transcrição

Zif268 (Egr1/Krox24/NGF-IA), expresso após alguns fenômenos relacionados à atividade neural (JAMES et al., 2006).

A ligação antigênica no MHC I e a apresentação ao TCR das células T CD+ são normalmente produzidas pelos proteasomas. Os imunoproteasomas aumentam a geração de epítopos antigênicos específicos e seu papel nas doenças neurodegenerativas tem sido descrito (MISHTO et al., 2010).

Juntas, estas considerações sugerem que o acúmulo de proteínas oxidadas e ubiquitinadas, associadas com o envelhecimento, apresentam diminuição na taxa de renovação protéica, enfatizando que a degradação do proteasoma está sim relacionada com o envelhecimento (MISHTO et al., 2010).

4. CONSIDERAÇÕES

O real aumento da expectativa de vida promove a necessidade de compreender os mecanismos e marcadores epigenéticos envolvidos no processo de envelhecimento, objetivando o rápido diagnóstico e possíveis descobertas terapêuticas para o controle de doenças senis (SPROTT, 2010).

Os imunoproteasomas desempenham um importante papel no controle de doenças induzidas pela inflamação. Estudos futuros podem elucidar como acontecem as falhas na mudança do proteasoma para imunoproteasoma e como os imunoproteasomas estão envolvidos e no mecanismo patológico de diversas doenças.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL MOHSEN, M.M.; IRAVANI, M.M.; SPENSER, J.P.E.; ROSE, S.; FAHIM, A.T.; MOTAWI, T.M.K.; ISMAIL, N.A.F.; JENNER, P. Age-associated changes in protein oxidation and proteasome activities in rat brain: modulation by antioxidants. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v. 336, p. 386-391, 2005.

CHONDROGIANNI, N.; GONOS, E.S. Proteasome dysfunction in mammalian aging. Steps and factors involved. **Experimental Gerontology**, v. 40, p. 931-938, 2005.

CHONDROGIANNI, N.; KAPETA, S.; CHINOU, I.; VASSILATOU, K.; PAPASSIDERI, I.; GONOS, E.S. Anti-ageing and rejuvenating effects of quercetin. **Experimental Gerontology**, 2010.

CHONDROGIANNI, N.; PETROPOULOS, I.; FRANCESCHI, C.; FRIGUET, B.; GONOS, E.S. Fibroblast cultures from healthy centenarians have an active proteasome. **Experimental Gerontology**, v. 35, p. 721-728, 2000.

CIECHANOVER, A. The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. **The EMBO Journal**, v. 17, p. 7151-7160, 1998.

CIECHANOVER, A. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin and the proteasome. **Nature Review Molecular Cell Biology**, v. 6, p. 79-86, 2005.

CIECHANOVER, A. Tracing the history of the ubiquitin proteolytic system: the pioneering article. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 387, p. 1-10, 2010.

COLLINS, G.A.; TANSEY, W.P. The proteasome: a utility tool for transcription? **Current Opinion in Gerontology and Development**, v. 16, p. 197-202, 2006.

DE MARTINIS, M.; FRANCESCHI, C.; MONTI, D.; GRINALDI, L. Inflamm-aging and lifelong antigenic load as major determinants of ageing rate and longevity. **FEBS Letters**, v. 579, p. 2035-2039, 2005.

DEVENTER, S.; NEEFJES, J. The immunoproteasome cleans up after inflammation. **Cell**, v. 142, n. 20, p. 517-518, 2010.

DING, Q.; KELLER, J.N. Proteasomes and proteasome inhibition in the central nervous system. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 31, p. 574-584, 2001.

DING, Q.; MARTIN, S.; DIMAYUGA, E.; BRUCE-KELLER, A.J.; KELLER, J.N. LMP2 knock-out mice have reduced proteasome activities and increased levels of oxidatively damaged proteins. **Antioxidant Redox Signaling**, v. 8, p. 130-135, 2006.

DOWLING, R.J.O.; TOPISIROVIC, I.; FONSECA, B.D.; SONENBERG, N. Dissecting the role of mTOR: Lessons from mTOR inhibitors. **Biochimica e Biophysica Acta – Proteins & Proteomic**, v. 1804, p. 433-439, 2010.

FERRINGTON, D.A.; HUSOM, A.D.; THOMPSON, L.V. Altered proteasome structure, function and oxidation in aged muscle. **FASEB Journal**, v. 19, p. 644-646, 2005.

FINLEY, D.; CIECHANOVER, A.; VARSHAVSKY, A. Ubiquitin as a central cellular regulator. **Cells**, v. 116, p. S29-S32, 2004.

FRANCESCHI, C.; CAPRI, M.; MONTI, D.; GUINTA, S.; OLIVIERI, F.; SEVINI, F.; PANCURGIA, M.P.; INDIVIA, L.; CELANI, L.; SCURTI, M.; CEVENINI, E.; CASTELLANI, G.C.; SALVIOLI, S. Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. **Mechanisms of Ageing And Development**, v. 128, p. 92-105, 2007.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Projeção da população do Brasil por sexo e idade – 1980-2050**. Disponível em: <www.ibge.gov.br>. Acesso em: 31 maio 2011.

JAMES, A.B.; CONWAY, A.M.; MORRIS, B.J. Regulation of the neuronal proteasome by Zif268. **Journal of Neuroscience**, v. 26, p. 1624-1634, 2006.

JUNG, T.; CATALGOL, B.; GRUNE, T. The proteasomal system. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 30, p. 191-296, 2010.

KOGA, H.; KAUSHIK, S.; CUERVO, A.M.. Protein homeostasis and aging: the importance of exquisite quality control. **Ageing Research Reviews**, 2010.

KRABBE, K.S.; PEDERSEN, M.; BRUUNSGAARD, H. Inflammatory mediators in the elderly. **Experimental Gerontology**, v. 39, p. 687-699, 2004.

KRÜGER, E.; KLOSTZEL, P.; ENENKEL, C. 20 proteasome biogenesis. **Biochimie**, v. 83, p. 289-293, 2001.

MENGUAL, E.; ARIZTI, P.; RODRIGO, J.; GIMENEZ-AMAYA, J.M.; CASTANO, J.G. Immunohistochemical distribution and electron microscopic subcellular localization of the proteasome in the rat CNS. **Journal of Neuroscience**, v. 16, p. 6331-6341, 1996.

MISHTO, M.; BELLAVISTA, E.; LIGORIO, C.; TEXTORIS-TAUBE, K.; SANTORO, A.; GIORDANO, M.; D'ALFONSO, S.; LISTI, F.; NACMIAS, B.; CELLINI, E.; LEONE, M.; GRIMALDI, L.M.E.; FENOGLIO, C.; ESPOSITO, F.; MARTINELLI-BONESCHI, F.; GALIMBERTI, D.; SCARPINI, E.; SEIFERT, U.; AMATO, M.P.; CARUSO, C.; FOSCHINI, M.P.; KLOETZEL, P.M.; FRANCESCHI, C.. Immunoproteasome LMP2 60HH variant alters MBP epitope generation and reduces the risk to develop Multiple Sclerosis in Italian female population. **PlosOne**, v. 5, n. 2, p. 1-10, 2010.

MISHTO, M.; BELLAVISTA; SANTORO, A.; SOLZING, A.; LIGORIO, C.; NACMIAS, B.; SPAZZAFUMO, L.; CHIAPPELLI, M.; LICASTRO, F.; SORBI, S.; PESSION, A.; OHM, T.; GRUNE, T.; FRANCESCHI, C. Immunoproteasome and LMP2 polymorphism in aged and Alzheimer's disease brains. **Neurobiology of Aging**, v. 27, p. 54-66, 2006a.

MISHTO, M.; BELLAVISTA, E.; SESSIONS, R.; TEXTORIS-TAUBE, K.; DAL PIAZ, F.; GARRARD, G.; FORTI, K.; SALVIOLI, S.; FRIGUET, B.; KLOETZEL, P.M.; RIVETT, A.J.; FRANCESCHI, C. A structural model of 20S immunoproteasomes: effect of LMP2 codon 60 polymorphism on expression, activity, intracellular localization and insight into regulatory mechanisms. **Biological Chemistry**, v. 387, p. 417-429, 2006b.

MISHTO, M.; SANTORO, A.; BELLAVISTA, E.; BONAFÉ, M.; MONTI, D.; FRANCESCHI, C. Immunoproteasomes and immunosenescence. **Ageing Research Reviews**, v. 2, p. 419-432, 2003.

MIZOGUCHI, K.; IKEDA, R.; SHOJI, H.; TANAKA, Y.; MARUYAMA, W.; TABIRA, T. Aging attenuates glucocorticoid negative feedback in rat brain. **Neuroscience**, v. 159, p. 259-270, 2009.

NASS, R.; JOHANSSON, G.; CHRISTIANSEN, J.S.; KOPCHICK, J.J.; THORNER, M.O. The aging population – is there a role for endocrine interventions? **Growth Hormones & IGF Research**, v. 19, p. 89-100, 2009.

RECHSTEINER, M.; HILL, C.P. Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. **Trends Cell Biology**, v. 15, p. 27-33, 2005.

SEIFERT, U.; BIALY, P.L.; EBSTEIN, F.; BECH-OTSCHIR, D.; VOIGT, A.; SCHRÖTER, F.; PROZOROVSKI, T.; LANGE, N.; STEFFEN, J.; RIEGER, M.; KUCKELKORN, U.; AKTAS, O.; KLOETZEL, P-M.; KRÜGER, E. Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon Interferon-induced oxidative stress. **Cell**, v. 142, p. 613-624, 2010.

SPROTT, R.L. Biomarkers of aging and disease: Introduction and definitions. **Experimental Gerontology**, v. 45, p. 2-4, 2010.

VASTO, S.; CANDORE, G.; BALISTRERI, C.R.; CARUSO, M.; COLONNA-ROMANO, G.; GRIMALDI, M.P.; LISTI, F.; NUZZO, D.; LIO, D.; CARUSO, C. Inflammatory networks in ageing, age-related diseases and longevity. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 128, p. 83-91, 2007.

WENG, N. Aging of the immune system: how much can the adaptative immune system adapt? **Immunity**, v. 24, p. 495-499, 2006.

YEWDEL, J.W. Immunoproteasomes: regulative the regulator. **PNAS**, v. 26, n. 102, p. 9089-9090, 2005.

CAPÍTULO 6

AValiação DO HIPOCAMPO E DA EXPRESSÃO DE IMUNOPROTEASOMAS PA28 α , α 7, LMP2 E LMP7 EM RATOS JOVENS E SENIS SUBMETIDOS A UM PROTOCOLO DE ESTRESSE CRÔNICO MODERADO E TRATADOS COM HORMÔNIO DO CRESCIMENTO

RESUMO: O envelhecimento promove alterações estruturais, principalmente no hipocampo. Da mesma forma, episódios de estresse comprometem a plasticidade deste órgão, o que acarreta uma susceptibilidade a desordens neurodegenerativas. Neste trabalho avaliaram-se os efeitos de um protocolo de estresse crônico moderado sobre ratos jovens (6 meses) e senis (24 meses), tratados ou não com hormônio do crescimento (GH), na histomorfometria do hipocampo e na expressão de imunoproteasomas PA28 α , α 7, LMP2 e LMP7. Houve diferenças relativas ao gênero na resposta ao estresse, com maior espessura da camada granular nos machos. O uso de GH melhorou a densidade celular do hipocampo dos ratos senis, que foi mais evidente nas fêmeas. A expressão de PA28 α e α 7 foram fortemente positiva em todos os animais, independente do tratamento adotado. LMP2 foi expressa nos animais senis e em alguns jovens submetidos ao estresse. O uso de GH diminuiu a expressão de LMP2 e tornou negativa a de LMP7 nos ratos senis.

Palavras-chave: Estresse, senilidade, ratos, hipocampo, imunoproteasomas.

EVALUATION OF THE HIPPOCAMPUS AND THE EXPRESSION OF IMUNOPROTEASOMES PA28 α , α 7, LMP2 AND LMP7 IN YOUNG AND OLD RATS SUBJECT TO A PROTOCOL FOR CHRONIC MILD STRESS AND TREATED WITH GROWTH HORMONE

ABSTRACT: Aging promotes structural changes, primarily in the hippocampus. Likewise, episodes of stress compromise the plasticity of this organ, which causes a susceptibility to neurodegenerative disorders. This study evaluated the effects of a chronic mild stress protocol on young (6 months) and old (24 months) rats treated or not treated with growth hormone (GH), histomorphometry of the hippocampus and immune proteasomes expression of PA28 α , α 7, LMP2 and LMP7. There were sex-related differences in the stress response, with increased thickness of the granular layer in males. The use of GH improved the cell density in the hippocampus of old rats, which was more evident in females. The expression of PA28 α and α 7 were strongly positive in all animals, regardless of treatment adopted. LMP2 was expressed in old animals and some young ones subjected to stress. The use of GH decreased the expression of LMP2 and turned LMP7 negative in the old rats.

Keywords: Stress, senility, rats, hippocampus, immune proteasomes.

1. INTRODUÇÃO

O hipocampo, assim como o giro denteado, formam a região cerebral que é responsável não somente pela formação da memória recente, mas também pelo controle emocional, processamento da memória e controle neuroendócrino (PAXINOS, 2008; HUNTER et al., 2009). A formação hipocampal é uma região cerebral particularmente sujeita a mudanças de caráter estrutural, funcional e neurogênico em resposta ao estresse e doenças relacionadas ao envelhecimento, como depressão e Doença de Alzheimer (PARDON, 2007; FRANCESCHI et al., 2007; HUNTER et al., 2009; MIZOGUCHI et al., 2009).

Repetidas exposições ao estresse podem mudar gradualmente as características elétricas, morfológicas e a capacidade proliferativa das células do cérebro. A liberação repetida de glicocorticóides (GC), principalmente sobre o hipocampo, interfere na proliferação de células progenitoras, nas propriedades neuronais e na apoptose, além de iniciar uma resposta via genômica (JOËLS et al., 2007). Além disso, o estresse, particularmente o estresse crônico, influencia a estrutura e função da formação hipocampal. Humanos submetidos a uma situação de estresse agudo, que resulte em uma exposição pós-traumática, tendem a evoluir para uma desordem de estresse crônico que contribui para um estado depressivo e predispõe a outras doenças relacionadas ao estresse. Estas desordens estão relacionadas à diminuição de volume do hipocampo (McEWEN et al., 1997; BARAN et al., 2009). Em modelos animais o estresse crônico diminui a neurogênese hipocampal e a complexidade das ramificações dendríticas (HUNTER et al., 2009), sendo mais evidente nos ratos machos (GARRETT; WELLMAN, 2009).

Durante o envelhecimento ocorrem mudanças estruturais no cérebro, acompanhadas de atrofia (JÖELS et al., 2007), com perda de tecido nos lobos temporal e frontal nos machos, sendo que nas fêmeas estas perdas são maiores no hipocampo e lobo parietal. Segundo Pardon (2007), sinais biológicos e emocionais, característicos da senilidade, equivalem a uma reação de estresse crônico e podem ser observados na ausência de qualquer estressor. No entanto, a habilidade de responder a estímulos estressantes, diminui com a idade, deixando os indivíduos mais vulneráveis aos efeitos

colaterais deste estresse. Isto porque, com o avançar da idade, observa-se um desequilíbrio na atividade do eixo HPA, secundária a uma diminuição do número de receptores de glicocorticóides. O resultado é uma hipersecreção de GCs com aumento gradual da deterioração do hipocampo. Esta secreção aumentada de GC está relacionada a muitas doenças da senilidade como depressão, *déficits* cognitivos e Doença de Alzheimer (MIZOGUSHI et al., 2009).

Durante o processo de envelhecimento, ocorre um declínio funcional de componentes da rede de proteases (KOGA et al., 2010), com acúmulo de proteínas celulares danificadas (CARRARO et al., 2002) e modificações na atividade do proteasoma em vários tecidos (CHONDROGIANNI, 2000). O proteasoma reconhece e degrada substratos de proteínas modificadas pelas cadeias de poliubiquitinas, e fragmentos de proteínas gerados por estes proteasomas têm sido usados pelo MHC-I para a apresentação de antígenos ao sistema imune (DEVENTER; NEEFJES, 2010). O proteasoma 20S com suas subunidades catalíticas (β 1, β 2,e β 5), associa-se com o complexo regulado 19S para formar o proteasoma 26S (SEIFERT et al., 2010).

Em vertebrados, as subunidades β específicas, cataliticamente ativas (β 1i/LMP2, β 2i/MECL-1 e β 5i/LMP7) são incorporadas ao complexo proteasoma sob indução do INF- γ , formando os imunoproteasomas (MISHTO et al., 2006a). Estes imunoproteasomas normalmente existem em várias células, inclusive no cérebro, sendo rapidamente ativados por citocinas pró-inflamatórias produzidas pelo sistema imune inato em resposta a uma inflamação (SEIFERT et al., 2010).

Neste trabalho investigou-se a expressão dos imunoproteasomas LMP2, LMP7, da subunidade α 7 e da unidade ativadora PA28 α no hipocampo de ratos jovens e senis submetidos a um protocolo de estresse crônico moderado.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Os animais

Para a realização deste experimento foram utilizados ratos jovens, com idade entre 5 e 6 meses, machos (n=20) e fêmeas (n=20). O número equivalente de animais velhos, com idade entre 23 e 24 meses, de ambos os sexos. Os animais foram mantidos em ambiente com umidade e temperatura controlada (25 a 28°C), com dieta *ad libitum*. Os animais foram divididos em quatro tratamentos, tendo representantes jovens e senis, machos e fêmeas em cada um deles. O experimento teve a duração de 28 dias e respeitou as normas internacionais (NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC, 1985) e do Conselho Federal de Medicina Veterinária.

2.2. Protocolo experimental

Os animais foram submetidos a um protocolo de estresse crônico moderado, adaptado de Lucca et al. (2009) e Gamaro et al. (2003), utilizando-se os estressores privação de água e ração, imobilização, inclinação da gaiola, calor, frio, luz intermitente e isolamento. Todos aplicados em dias e tempos diferentes de forma a preservar a higidez dos animais. O primeiro grupo, considerado controle (C), não recebeu o protocolo de estresse. Os demais grupos receberam o protocolo de estresse, sendo que o segundo foi apenas estressado (E), o terceiro recebeu além do protocolo de estresse um desafio imunológico inespecífico com adjuvante Saponina, no 26.º dia (E+D) e o último grupo recebeu todos os tratamentos anteriores mais 25 g/kg p.v. hormônio do crescimento em doses diárias nos 28 dias (E+D+GH) (FRENCH et al., 2002; BROWN-BORG; RAKOCZY, 2003; TRESGUERRES et al., 2008). No 29.º dia todos os animais foram decapitados por guilhotina para coleta de material, sob mínimas condições de estresse.

2.3. Amostras cerebrais

Após remoção do encéfalo, o órgão foi imediatamente pesado e transferido para um frasco contendo fixador. Depois de fixados em paraformaldeído a 10% por 48 horas e transferidos para frascos com paraformaldeído a 4%, procederam-se as secções anatómicas. Foi realizada uma primeira secção na fissura sagital, dividindo-o em duas partes especulares contralaterais. Uma segunda secção foi realizada no plano coronal, isto é, perpendicular ao plano sagital, dividindo então o encéfalo em quatro partes (BEAR et al., 2008). A segunda secção teve como objetivo a exposição do ventrículo lateral e, conseqüentemente do hipocampo. Todas as secções foram incluídas em Paraplast[®] (WAPPLER et al., 2009) e posicionadas de forma que a região hipocampal estivesse exposta ao micrômetro.

2.4. Análises histológicas do hipocampo

Realizaram-se secções em cortes de 4 µm e as lâminas foram coradas com Hematoxilina e Eosina e analisadas em microscópio óptico Nikon Eclipse E660[®] em objetivas de 40, 100 e 200X, para descrição histopatológica, priorizando-se as regiões CA4 e GD do hipocampo. Considerou-se a viabilidade das células da camada granular, a presença de neurônios piramidais e células da glia, principalmente astrócitos. Não foram utilizadas outras colorações com o intuito de verificar estruturas e alterações específicas do SNC, ficando para estudos com detalhamentos posteriores.

2.5. Morfometria do hipocampo

Após análise microscópica, os cortes histológicos foram fotografados, as imagens capturadas por uma câmera digital modelo Feldmann Wild Leitz Digi-Pro 5.0M e trabalhadas no software Micrometrics SE Premium[®].

As análises morfométricas levaram em consideração o hipocampo. Delimitou-se o perímetro da camada granular externamente e obteve-se uma medida da área contendo esta camada e a região CA4, que corresponde à área do GD. Em seguida, mediu-se o perímetro da região CA4, obtendo a área

da CA4. Por diferença, obteve-se a área da camada granular, subtraindo CA4 de GD. As proporções relativas entre as duas medidas de área do GD foram analisadas e receberam tratamento de estatística descritiva.

2.6. Imunohistoquímica para expressão de imunoproteasomas

Para realização da imunohistoquímica utilizamos cortes do hipocampo com 3 μ c, em lâminas silanizadas, que após desparafinização e hidratação em soluções alcoólicas decrescentes, procedeu-se o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3% em metanol. O tratamento proteolítico para desmascaramento de antígenos e recuperação antigênica foi realizado com EDTA 1mM pH8, por 40 minutos em banho-maria a 98°C. Após atingir temperatura ambiente as lâminas foram lavadas com tampão de lavagem TBS 1X pH 7,6 por 5 minutos. Os anticorpos utilizados foram proteasoma 20S subunidade β 1i (LMP2-13), subunidade β 5i (LMP7-1), subunidade α 7 (MCP72) monoclonais. Também foi utilizada a unidade ativadora 11S α (PA28 α) policlonal. As diluições foram 1:200, 1:700, 1:400 e 1:400, respectivamente. Todos os anticorpos utilizados foram da marca Enzo Life Sciences® USA, permanecendo sob incubação em câmara úmida por uma hora, quando então foram realizadas duas lavagens em TBS e subsequente aplicação do anticorpo secundário EnVision Dako® com polímero marcado anti-camundongo, permanecendo em incubação por mais 30 minutos em câmara úmida. Após este tempo foram realizadas mais duas lavagens em TBS e a revelação com DAB por três minutos, quando então os cortes foram lavados duas vezes em água destilada, corados com Hematoxilina de Mayer's e as lâminas foram montadas automaticamente com Micromount (Diapath®). A análise das lâminas foi feita em microscópio óptico da marca Zeiss Axiophot® para análise da expressão de imunoproteasomas.

3. RESULTADOS

3.1. Peso do encéfalo

O peso do encéfalo foi avaliado para todos os quatro protocolos. Ao se realizar as análises de estatística descritiva desta variável, com nível de significância de 0,05, observou-se que as variáveis sexo e protocolo influenciaram o tamanho do órgão. Porém, a variável idade, bem como a interação de protocolo x idade não modificou o peso do encéfalo, ao mesmo nível, conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Nível de significância do peso do encéfalo em função das variáveis analisadas e suas interações

Parâmetro/Variável	Cérebro
Idade	
Sexo	0.00026*
Protocolo	0.00021*
Protocolo x idade	0.38387
Protocolo x sexo	0.02153*

Fonte: Dados da pesquisa.

* Significativo ($p < 0,05$).

A Tabela 2 informa a média dos pesos dos encéfalos dos animais, cujos valores apresentaram-se estatisticamente iguais para os protocolos C e E, porém diferente para os protocolos E+D e E+D+GH, ao nível de 5% de significância. Estes dois últimos também apresentaram diferença estatística entre suas respectivas médias, indicando que os protocolos interferiram no peso encefálico destes animais.

Tabela 2 - Variações do peso do encéfalo em função dos protocolos

Protocolo/Variável	Cérebro
Controle	20.20 ^C
Estresse	20.52 ^C
Estresse + Desafio	21.51 ^B
Estresse + Desafio + GH	22.34 ^A

Letras diferentes na coluna indicam médias estatisticamente diferentes.

Já em relação aos animais senis é constatada uma resposta diversa, onde o peso médio do órgão apresentou-se diferente para o protocolo E+D+GH em relação aos demais. Baseado neste resultado, pode-se inferir que o tratamento hormonal promoveu um aumento de peso do encéfalo tanto em relação aos equivalentes jovens, quanto em relação a todos os demais protocolos. Entretanto, são iguais dentro do grupo quando considerada a variável sexo.

Tabela 3 – Variações dos pesos do encéfalo nas interações idade x protocolo, com influência do sexo

Idade x Protocolo		MC	FC	ME	FE	MED	FED	MEDGH	FEDGH
Cérebro	Jovem	2.08 ^{CD}	2.02 ^D	2.12 ^{BCD}	2.1 ^{BCD}	2.3 ^{ABC}	2.14 ^{BCD}	2.23 ^{ABCD}	2.2 ^{ABCD}
	Senil	2.02 ^B	1.96 ^B	2 ^B	1.98 ^B	2.16 ^A	2 ^B	2.27 ^A	2.24 ^A

Letras diferentes na coluna indicam médias estatisticamente diferentes.

MC = machos controle; FC = fêmeas controle; ME = machos estressados; FE = fêmeas estressadas; MED = machos estressados e desafiados; FED = fêmeas estressadas e desafiadas; MEDGH = machos estressados, desafiados e tratados com GH; FEDGH = fêmeas estressadas, desafiadas e tratadas com GH.

3.2. Histologia do hipocampo

Para a análise histológica do hipocampo selecionaram-se as regiões hipocampal do GD e CA4 com o intuito de padronizar os parâmetros analisados, bem como as amostras de medidas morfométricas. No GD analisaram-se a espessura da camada granular com presença ou ausência de eosinofilia citoplasmática dos neurônios e proximidade entre as células. Na região CA4 analisaram-se a presença de neurônios piramidais, astrócitos e densidade celular.

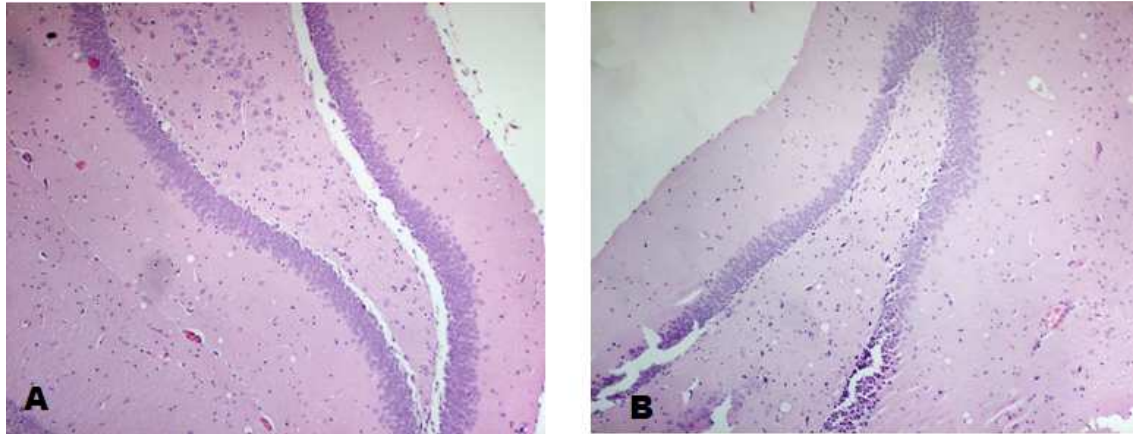
Os cortes analisados por microscopia óptica apresentaram um padrão de respostas individuais nos grupos controle e estresse crônico. Houve diferenças em todos os parâmetros analisados no que se refere à idade e sexo.

Os machos controles jovens, assim como as fêmeas controles jovens apresentaram um padrão de arquitetura do GD e CA4 similar e homogêneo, com boa celularidade da camada granular.

Os machos controles senis também apresentaram um padrão na arquitetura das regiões analisadas com boa celularidade e presença de poucas células hiperconcoradas na camada granular. Já as fêmeas controles senis apresentaram respostas individuais, com estreitamento da região CA4 em dois animais e uma delas apresentou as células da camada granular hiperconcoradas, assim como os neurônios piramidais, além de astrócitos abundantes com núcleos de cromatina condensada.

Uma característica observada nos animais senis, independente do sexo e do protocolo foi uma maior dispersão entre as células da camada granular. Este padrão morfológico também foi observado em poucos animais jovens estressados.

Os animais senis, de uma forma generalizada, apresentaram uma menor espessura da camada granulosa em comparação aos animais jovens, com maior presença de células granulosas fortemente coradas, com características morfológicas sugestivas de apoptose. Uma comparação entre um animal jovem e senil é apresentada na Figura 1.

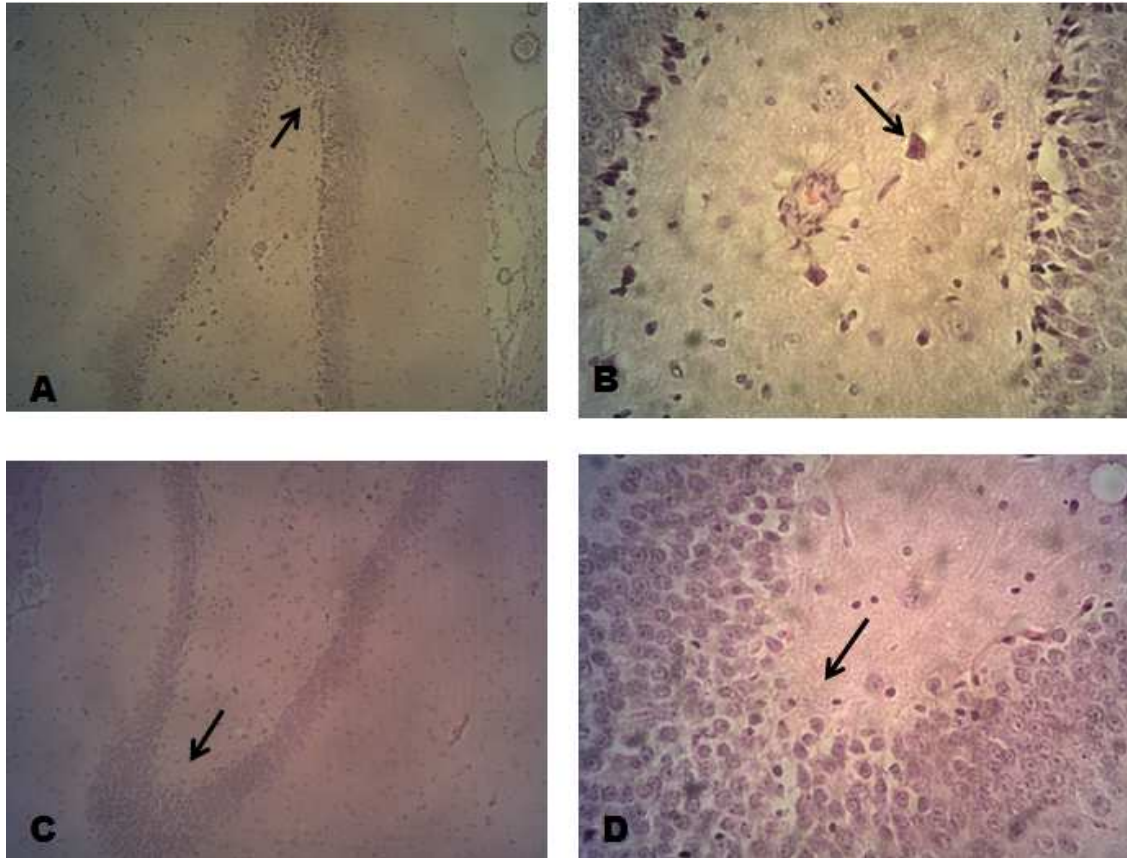


Notar as diferenças na arquitetura do GD e CA4 entre um animal jovem (A) e senil (B), com as células da CG mais densas no jovem, assim como presença de muitas células hipercoreadas no senil. H&E. 100x.

Figura 1 - Fotomicrografia do hipocampo.

Os grupos estressados apresentaram uma atrofia da região CA4 e as células da camada granular apresentavam-se mais dispersas em relação aos controles. Sendo que os machos, tanto jovens quanto senis apresentaram uma diminuição menos evidente desta camada. Os animais estressados e desafiados apresentaram o mesmo padrão morfológico dos grupos estressados, com algumas respostas individuais, principalmente nos machos senis.

Os animais senis tratados com GH, tanto os machos quanto as fêmeas apresentaram melhora no padrão de arquitetura do GD e CA4, com maior espessura da camada granular, além das células desta apresentarem-se menos dispersas em relação aos senis sem tratamento. As fêmeas senis deste grupo apresentaram uma melhora significativa da densidade celular no CA4, com presença de neurônios piramidais e astrócitos sem características degenerativas, além de menor número de neurônios eosinofílicos na camada granular. Na Figura 2 é possível visualizar estas alterações.



Animal macho submetido a estresse com presença de células hipercoreadas na borda interna da CG (A) e menor densidade celular em C4 (B), com neurônio piramidal com núcleo hipercoreado e cromatina condensada (seta). Situação contrária verificada em uma fêmea tratada com GH onde não se percebem tantas células hipercoreadas (C) além de neurônios piramidais viáveis e células da camada granular com aspecto viável (D) em relação B. Coloração H&E. 100X (A e C); 400X (B e D).

Figura 2 - Fotomicrografia do hipocampo de ratos senis.

3.3. Análise morfométrica

Ao se avaliar estatisticamente as respostas dos animais nos diferentes protocolos para a camada granular e região CA4, observou-se que não houve efeito significativo para as variáveis idade, sexo e protocolos, em nível de significância $p < 0,05$. Somente a interação protocolo x idade mostrou-se significativa, conforme os dados da Tabela 4.

Tabela 4 - Nível de significância da camada granular e da região CA4 em função das variáveis analisadas e suas interações

Parâmetro/variável	% granular	% CA4
Idade	0.2185	0.2185
Sexo		
Protocolo		
Protocolo x idade	0.00001	0.00001
Protocolo x sexo		

Analisando-se a interação dos protocolos x idade sobre as percentagens da camada granular, nota-se que entre os animais jovens, independente do sexo, as médias não são diferentes estatisticamente, exceto para as fêmeas jovens controle. Estas apresentaram a menor proporção de camada granular em relação ao giro denteado. Isto pode ser observado através da repetição das letras na Tabela 5.

Tabela 5 - Variações das percentagens da camada granular e região CA4 nas interações idade x protocolo, com influência do sexo

Idade x Protocolo		MC	FC	ME	FE	MED	FED	MEDGH	FEDGH
% Granular	Jovem	0.32 ^{AB}	0.25 ^C	0.33 ^{AB}	0.33 ^{AB}	0.31 ^{AB}	0.29 ^B	0.31 ^{AB}	0.30 ^{AB}
	Senil	0.38 ^A	0.31 ^B	0.30 ^B	0.30 ^B	0.30 ^B	0.28 ^B	0.31 ^B	0.31 ^B
% CA4	Jovem	0.75 ^A	0.68 ^{B^C}	0.67 ^{BC}	0.67 ^C	0.71 ^{BC}	0.69 ^{BC}	0.7B ^C	0.69 ^{BC}
	Senil	0.69 ^A	0.62 ^B	0.70 ^A	0.70 ^A	0.72 ^A	0.70 ^A	0.69 ^A	0.69 ^A

Letras diferentes na mesma linha indicam médias estatisticamente diferentes.

MC = machos controle; FC = fêmeas controle; ME = machos estressados; FE = fêmeas estressadas; MED = machos estressados e desafiados; FED = fêmeas estressadas e desafiadas; MEDGH = machos estressados, desafiados e tratados com GH; FEDGH = fêmeas estressadas, desafiadas e tratadas com GH.

Quando se considerou os indivíduos senis, a interação protocolo x idade também não apresentou diferenças estatísticas para os protocolos E, E+D e E+D+GH ($p < 0,05$). Observa-se, dentro do grupo controle, uma diferença entre os sexos. Os machos senis controles apresentaram a maior proporção de camada granular entre todos os grupos avaliados.

A área CA4 seguiu a mesma tendência discutida para a camada granular. Observa-se que somente nos animais do grupo controle existe diferença estatisticamente significativa para esta região. Entre os indivíduos senis dos quatro protocolos, as médias são iguais. Exceção, novamente, é feita às fêmeas do grupo controle.

3.4. Imunohistoquímica para imunoproteasomas

Na avaliação da expressão imunohistoquímica dos imunoproteasomas LMP2, LMP7, da subunidade catalítica PA28 α e da subunidade constitutiva α 7, analisou-se a região do GD do hipocampo e classificou-se a imunomarcacão em ausente (-), fraca (+) ou forte (++) , baseada na quantidade de células positivas.

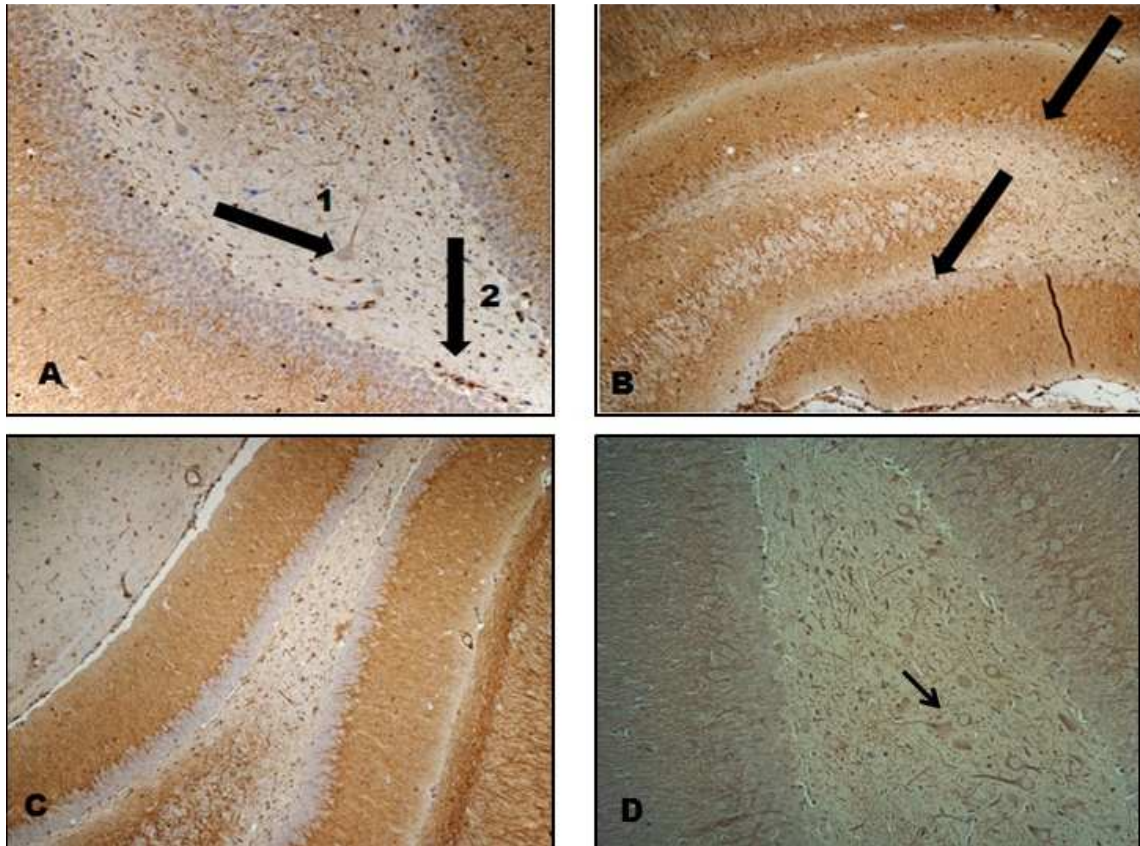
A subunidade constitutiva α 7 apresentou imunomarcacão forte em todos os tipos celulares e em todas as amostras analisadas, independentemente da idade e sexo dos animais e do tratamento (C, E, E+D ou E+D+GH). Todas as lâminas foram (++) imunomarcadas para a subunidade catalítica PA28 α , independentemente do tratamento, idade e gênero. Assim como para α 7, estas amostras também marcaram todos os tipos celulares, como pode ser conferido na Figura 3.

Para o imunoproteasoma LMP2, observou-se uma variação na imunomarcacão. Os animais controle, tanto jovens quanto senis, apresentaram imunomarcacão (+) nos neurônios, astrócitos e células endoteliais. A mesma observação é válida para os animais de ambos os sexos deste tratamento, no entanto, as células da camada granular não apresentaram nenhuma reatividade ao anticorpo anti-LMP2.



Figura 3 - Fotomicrografia do hipocampo.

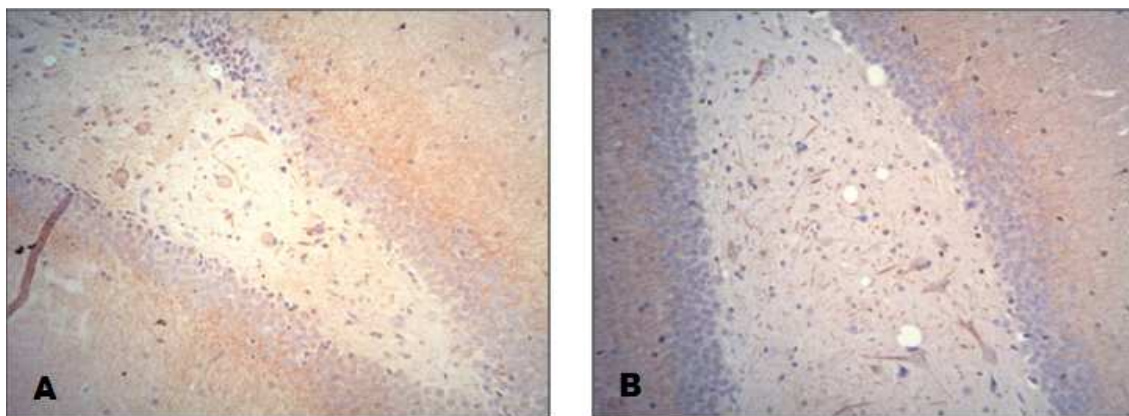
Os ratos dos tratamentos E e E+D também apresentaram um comportamento semelhante entre si, com reação (++) nos neurônios, astrócitos e células endoteliais. Os ratos senis apresentaram também algumas células da CG positivas para LMP2, mas esta imunomarcção foi mais raramente observada nos machos senis. As imunomarcações anti-LMP2 podem ser vistas na Figura 4.



O imunoproteasoma LMP2 foi expresso em neurônios e células endoteliais de animais senis dos tratamentos C, E e E+D. Notar em (A) as setas largas indicando um neurônio piramidal positivo (1) e células endoteliais (2) de uma fêmea senil C. Os ratos senis E apresentaram reação (++) em todas as células, inclusive algumas da CG (B), apontadas pelas setas largas. Os ratos jovens também apresentaram imunomarcção positiva em neurônios, mas não nas células da CG. Em (C) uma fêmea jovem E e em (D) um macho jovem E+D com indicação de um neurônio positivo (seta fina). A e D 200X; B e C 100X.

Figura 4 - Fotomicrografia do hipocampo de ratos imunomarcados com anticorpo anti-LMP2.

Para os animais do tratamento E+D+GH, a imunomarcção para LMP2 apresentou comportamento diverso nos ratos senis, sendo positiva (+), mas não tão forte como nos tratamentos E e E+D senis (Figura 5). Os animais jovens tratados com GH, tanto machos quanto fêmeas apresentaram reação (+) para LMP2.



O imunoproteasoma LMP2 foi expresso mais fracamente em neurônios e células endoteliais dos animais tratados com GH, quando comparados aos demais tratamentos. Os animais senis, tanto machos quanto fêmeas apresentaram imunomarcção semelhante ao dos jovens. Em (A), um macho senil e em (B), uma fêmea senil. 200X.

Figura 5 - Fotomicrografia do hipocampo de ratos imunomarcados com anticorpo anti-LMP2.

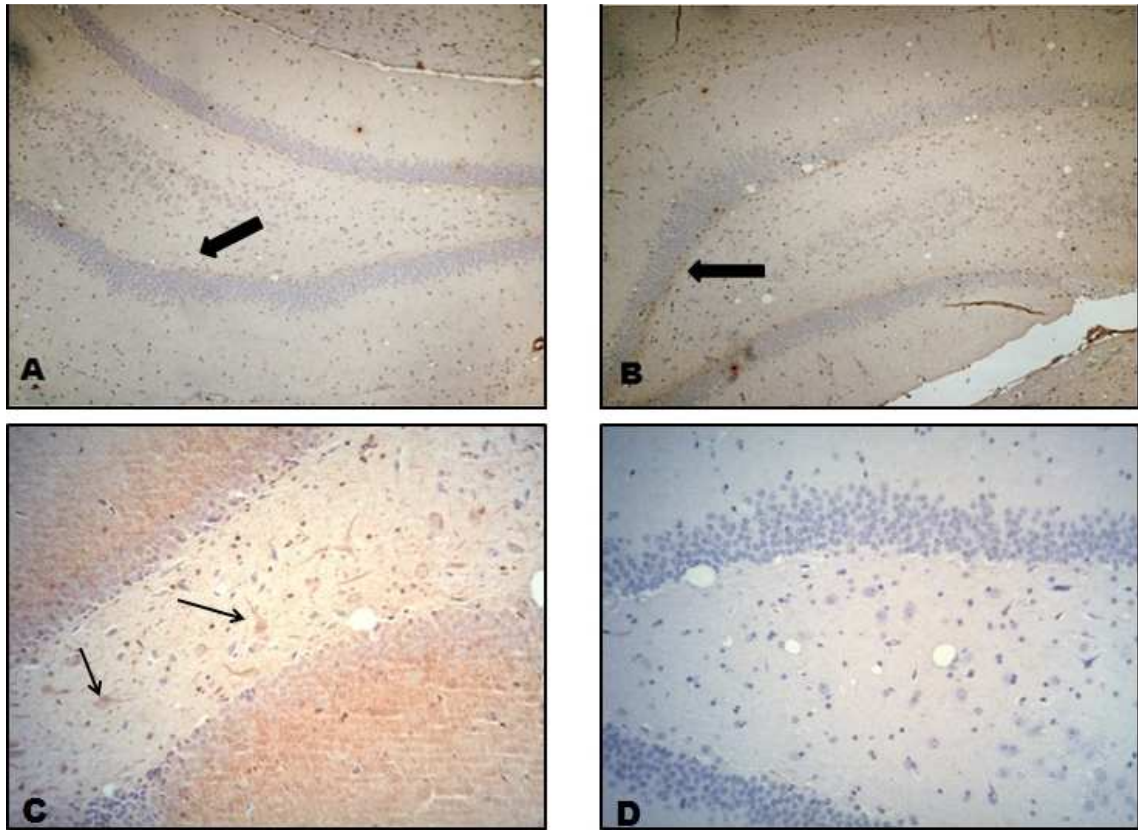
Os animais controle jovens, tanto os machos como as fêmeas, apresentaram imunomarcção ausente (-) para o imunoproteasoma LMP7. Os machos jovens estressados não expressaram LMP7 em nenhuma das células. No entanto, somente alguns dos machos senis estressados, mas não todos, apresentaram imunomarcção (+) em raros astrócitos e neurônios piramidais. Figura 6.

As fêmeas jovens do tratamento E apresentaram imunomarcção (+) em alguns astrócitos. Já nas fêmeas senis, o anticorpo anti-LMP7 expressou-se com uma reação (+) nos neurônios e astrócitos.

Não houve expressão do anticorpo anti-LMP7 nas células da CG em nenhum dos grupos analisados, como pode ser visto na Figura 6. Os machos jovens apresentaram perfil de imunomarcção semelhante ao das fêmeas jovens, tanto para o anticorpo LMP2 como para anti-LMP7.

Os machos e fêmeas senis tratados com GH apresentaram imunomarcção negativa para LMP7, também apresentado na Figura 6. O mesmo aconteceu com os animais jovens destes tratamentos.

A Tabela 6 apresenta uma representação das médias por protocolo x idade para as imunomarcções anti-LMP2 e anti-LMP7.



O imunoproteasoma LMP7 foi expresso em neurônios e células endoteliais de animais senis C, E e E+D. Notar em uma fêmea senil C (A) a presença de discreta imunomarcacão, assim como na fêmea senil E (B) que também apresentou reação + nas células endoteliais (setas largas), não havendo imunomarcacão das células da CG. Nos machos senis E+D (C) houve uma reação mais forte em relação aos demais tratamentos, com neurônios piramidais positivos (setas finas). Os ratos senis tratados com GH foram negativos para LMP7. Na foto, uma fêmea senil E+D+GH (D). A e B 100X; C e D 200X.

Figura 6 - Fotomicrografia do hipocampo de ratos imunomarcados com anticorpo anti-LMP7.

Tabela 6 - Médias da expressão imunohistoquímica dos imunoproteasomas LMP2 e LMP7 no hipocampo de ratos de acordo com as interações idade x protocolo, com influência do sexo

Idade x Protocolo		MC	FC	ME	FE	MED	FED	MEDGH	FEDGH
Anti-LMP2	Jovem	+	+	+	+	+	+	+	+
	Senil	+	++	++	++	++	++	+	+
Anti-LMP7	Jovem	-	-	-	-	-	-	-	-
	Senil	-	-	-	+	++	+	-	-

MC = machos controle; FC = fêmeas controle; ME = machos estressados; FE = fêmeas estressadas; MED = machos estressados e desafiados; FED = fêmeas estressadas e desafiadas; MEDGH = machos estressados, desafiados e tratados com GH; FEDGH = fêmeas estressadas, desafiadas e tratadas com GH.

- imunomarcção ausente; + imunomarcção fraca; ++ imunomarcção forte.

4. DISCUSSÃO

O modelo de estresse crônico em ratos é utilizado porque seus efeitos podem imitar as alterações observadas em humanos expostos a períodos de estresse, principalmente relacionados à déficits cognitivos e perda de memória (BOWMAN et al., 2006).

O peso do encéfalo de um animal depende do seu peso corporal e da complexidade de seu encéfalo, que é expressa pelo coeficiente de encefalização (K). Por outro lado, a complexidade cerebral depende da posição filogenética do animal (Machado, 2006). No trabalho em questão não foram realizados testes cognitivos com o objetivo de avaliar parâmetros de aprendizagem ou memória. Estes parâmetros estão relacionados complexidade do cérebro.

Em cérebros de seres humanos, as mulheres costumam ter um peso inferior em até 10% em relação aos homens, embora não se constate nenhuma diferença na capacidade intelectual e sim em relação à proporcionalidade de massa corporal (COHEN, 1995). Isto pode ser observado nos animais deste experimento onde os machos, independentemente do tratamento,

apresentaram médias de peso estatisticamente maiores que as fêmeas. Quando comparamos o peso encefálico entre as diferentes idades, os animais senis apresentam peso maior em relação aos jovens, independentemente do gênero, contradizendo Cohen (1995) que afirma que após atingir a idade adulta, o tamanho cerebral reduz progressivamente.

Por ser um órgão de plasticidade morfológica, as alterações volumétricas do cérebro têm sido descritas após episódios de estresse e outras doenças de origem degenerativas, principalmente aquelas comuns na senilidade (WAGNER-SMITH; MARKOU, 2011).

4.1. Histomorfometria do hipocampo

Segundo Joëls et al. (2007), um modelo freqüentemente utilizado para investigar os efeitos do estresse crônico é o uso de corticosterona exógena por várias semanas. No entanto, este é um estudo pouco realista já que os níveis deste hormônio são controlados pela retroalimentação negativa do eixo HPA, tendendo à normalidade (DHABHAR et al., 1997; VARRIANO, 2008) e após três semanas os níveis de corticosterona não se elevam mais, sofrendo apenas picos após exposição a um novo estressor externo. Este foi um dos motivos por optar-se em não dosar este hormônio, além da possibilidade das coletas transformarem-se em mais um fator estressante para os animais.

Swaab et al. (2005), baseados em experimentos animais, afirmam que uma superexposição a GC durante prolongados períodos de estresse danifica o cérebro, especialmente em animais senis e, em particular os neurônios piramidais do hipocampo, comprometendo a memória e funções cognitivas.

Histologicamente, os animais dos protocolos E e E+D apresentaram uma atrofia da região CA4 e menor coesão das células da camada granular, que foi mais evidente nas fêmeas. Os machos, tanto jovens quanto senis apresentaram uma diminuição menos evidente desta camada. De acordo com Swaab et al. (2005), as fêmeas possuem um número maior de GR tanto no hipocampo quanto no córtex pré-frontal, sugerindo uma maior sensibilidade a fatores estressantes.

Dentre os estressores adotados em modelos de estresse crônico, a imobilização/contenção, tem sido o mais estudado. Buynitsky e Mostofsky

(2009), em uma ampla revisão sobre este estressor, sugerem que seus efeitos estão relacionados ao número de dias de aplicação, indo desde a adaptação, até danos neurológicos e perda óssea. No presente trabalho este não foi o único estressor adotado no protocolo e, por se tratar de animais senis, optou-se por restringi-lo ao tempo de 20 minutos por dia. Segundo os mesmos autores, a imobilização com esta duração promove aumento da secreção de ACTH e CC, do comportamento de escapar, além do desenvolvimento de diabetes. Ocorre também a diminuição da ingestão de alimentos e perda da capacidade de retenção da memória espacial.

Ao início do experimento, as primeiras imobilizações eram acompanhadas de um comportamento de ansiedade e os animais apresentavam ânsia de fuga, mais evidente nos machos, independente da idade. Com o passar dos dias, notou-se uma mudança neste comportamento, uma vez que os animais já não tentavam fugir e mantinham-se imóveis durante os 20 minutos do estressor. Esta capacidade de adaptação dos roedores foi relatada por Sharp e La Regina (1998) e considerada por outros autores durante um período de experimento superior a 12 dias, evitando que ao se adaptarem, perca-se a característica de estresse (GAMARO et al., 2003; BARAN et al., 2009).

Um decréscimo na camada de células granulares não foi percebido neste trabalho, onde, estatisticamente, as variáveis idade, sexo e protocolo não apresentaram níveis de significância menores que 5%. Jayatissa et al. (2008), avaliaram os efeitos do estresse nas células da camada granular do hipocampo em um experimento com ratos também submetidos a um protocolo de estresse crônico moderado. Relataram um decréscimo de 22,4% no total de células do hipocampo, contabilizados por métodos morfométricos, mas este decréscimo também não foi percebido na camada de células granulares, semelhante aos achados deste trabalho.

Ainda de acordo com Jayatissa et al. (2008), a aplicação de um protocolo de estresse crônico por seis semanas reduziu substancialmente tanto o número de células quanto o volume da camada granular. Este pode ser outro fator contribuinte para a não detecção de alterações morfométricas no presente trabalho, já que sua duração foi de quatro semanas.

Segundo Barkats et al. (1996), em um pioneiro trabalho comparando o hipocampo de diferentes linhagens de camundongos de quatro e vinte e quatro meses, são muitas as diferenças morfológicas que caracterizam uma influência genética na formação hipocampal. Estas diferenças acabam por conferir uma resposta individual de alterações como o envelhecimento. Estes mesmos autores verificaram que, morfometricamente, as principais variações na região hipocampal acontecem no GD e que as células da camada granular tendem a diminuir com a senilidade.

Neste trabalho, quando se mensurou a área da GD, apesar de estatisticamente as diferenças não serem significativas, verificou-se uma resposta contrária a de Barkats et al. (1996). Quando se analisou os animais senis, verificou-se que, mesmo não sendo estatisticamente diferentes, os controles apresentaram a área do GD e CA4 maiores em relação aos jovens do mesmo protocolo. Os ratos senis submetidos aos protocolos E e E+D apresentaram diminuição nas duas medidas. Exceção válida para os animais que receberam tratamento com GH, cujas medidas de percentagem apresentaram-se equivalentes aos animais jovens deste mesmo protocolo (E+ED+GH).

O hipocampo apresenta maior plasticidade em resposta a mudanças ambientais. Em um estudo de Korte et al. (2005), a produção de novas células, ou neurogênese, no GD de ratos alojados em um ambiente enriquecido aumentou. No entanto, McEwen et al. (1997) verificaram uma atrofia dos dendritos de neurônios localizados na região CA3 do hipocampo de ratos jovens, submetidos a um protocolo de estresse repetitivo por vinte e um dias. Os mesmos relataram também que esta atrofia não é permanente, persistindo por sete a dez dias após cessar o estressor.

Apesar dos resultados morfométricos deste trabalho não serem estatisticamente significativos, histologicamente, as diferenças individuais podem ser claramente percebidas, semelhante aos achados de Barkats et al. (1996) e sendo ainda mais evidentes no hipocampo de indivíduos senis (SEGAR et al., 2009). As células da camada granular dos animais senis de ambos os sexos submetidos aos protocolos de estresse apresentaram-se dispersas e hipercoradas em relação aos jovens. Poucos animais jovens

estressados apresentaram estas características histológicas, que podem estar associada ao efeito apoptótico dos GCs (SWAAB, 2005).

Os animais senis são mais susceptíveis às ações deletérias dos GC no cérebro. Mizoguchi et al. (2009) correlacionam este fato a uma falha no *feedback* negativo em determinadas áreas do cérebro em função de modificações associadas a determinadas proteínas dos GR, tais como as HSP90 que reduzem no hipocampo de ratos senis.

Como estas proteínas são essenciais para transportar os receptores de esteróides para o núcleo, seu decréscimo pode reduzir a ligação dos GC aos seus receptivos receptores e conseqüentemente reduzir sua translocação. Segundo McEwen (2000), os neurônios do GD passam por processo de neurogênese mesmo em ratos adultos que sofre uma influência direta dos esteróides da adrenal. Estes neurônios expressam receptores de CG.

Os neurônios piramidais, presentes no hilo do GD, ou região CA4, foram mais raros nos animais senis. Segundo Swaab (2005), estresse associado à senilidade ocasiona danos no hipocampo com perda degenerativa dos neurônios, afetando a estrutura deste órgão. Durante o envelhecimento a neurogênese no GD declina em ratos e macaco *Rhesus*, mas é revertida após adrenalectomia, sugerindo que este declínio é resultado do aumento da atividade do eixo HPA e conseqüente aumento de GC no hipocampo senil (McEWEN, 2000).

As reduzidas alterações detectadas no hipocampo dos animais senis neste experimento podem ser elucidadas por Pardon (2007), quando afirma que alguns roedores apresentam uma diminuição da ativação do eixo HPA e da reatividade ao estresse. Isso pode oferecer uma proteção ao processo de envelhecimento, período em que, geralmente, a habilidade em cessar esta resposta estressora está comprometida, representando a principal causa de danos cerebrais induzidos pelos GCs.

Segundo Wagner-Smith e Markou (2011), tratamento com antidepressivos pode reverter a perda de volume hipocampal associada a desordens de estresse e depressão. Neste trabalho o uso do GH nos animais senis promoveu uma recuperação da espessura da camada de células da granular, aumento relativo da área do GD e CA4. Os valores absolutos do peso do encéfalo dos animais senis que receberam tratamento com GH, tanto

machos quanto fêmeas, também foi maior em relação aos senis que não receberam o hormônio.

Swaab et al. (2005) afirmam que em pacientes humanos, uma deficiência de GH na infância está correlacionada a uma menor capacidade de responder ao estresse e, em consequência disso, estes apresentam maior probabilidade de desenvolver desordens depressivas. Em um experimento de Tresguerres et al. (2008), observou-se que ratos de 24 meses tratados com GH tiveram um aumento no número total de neurônios, mas o número de neurônios BrDU(+), que não expressam receptores de GH, não se alterou. Isto pode indicar um possível efeito anti-apoptótico deste hormônio. O GH parece ser um fator neuroprotetor para o cérebro e medula espinhal de animais jovens e previne perdas de células neuronais no hipocampo após injúria cerebral por isquemia-hipóxia unilateral. Da mesma forma ele também pode proteger os neurônios do hipocampo de degenerações relacionadas ao envelhecimento, sendo observado este efeito neuroprotetor em ambos os sexos.

Segundo McEwen (2000), diferenças sexuais também são percebidas no hipocampo e parecem estar relacionadas à presença de esteróides sexuais circulantes durante a formação da resposta ao estresse. Ratos machos submetidos a estresse psicossocial prolongado apresentam atrofia dendrítica além de danos neuronais, após estresse por natação forçada. Também macacos machos têm perda piramidal após uma situação de estresse crônico. Entretanto, após ausência de estrógeno, as fêmeas submetidas a estresse, se tornam mais vulneráveis, apresentando altos níveis cortisol na urina e perda progressiva de memória e do desempenho cognitivo.

Para Bowman et al. (2006), o estrógeno induz uma plasticidade sináptica no hipocampo que é alterada durante o envelhecimento, afetando as funções cognitivas e favorecendo o aumento dos níveis de GC associados a episódios de estresse. No entanto, não houve alterações evidentes entre sexos na histomorfometria deste estudo. Exceção para as fêmeas senis tratadas com GH que apresentaram aumento da densidade celular no CA4 e menor número de células hipercoloradas na camada granular, o que pode indicar uma ação do GH associada ao estrógeno.

Ron-Harel e Schwartz (2009) defendem o uso de IL-4 como indutora de IGF-1, que ativa a liberação de GH, como terapia capaz de promover a

renovação celular e a habilidade cognitiva. De acordo com estes autores, um mau funcionamento imunológico tem um efeito devastador sobre a capacidade de memória espacial dependente do hipocampo e pode ser revertido pela ativação imune.

4.2. Imunoproteasoma

O papel fisiológico dos proteasomas e imunoproteasomas e seu envolvimento nos processos patológicos tem sido uma área de pesquisa em crescente ascensão. Os proteasomas constitutivos e os imunoproteasomas normalmente existem na célula, mas a proporção entre estas duas isoformas varia com o tipo celular, tecido, condições ambientais (MISHTO et al., 2006a).

Investigou-se, neste trabalho, a expressão dos imunoproteasomas subunidades LMP2 e LMP7, além das subunidades catalítica PA28 α e constitutiva α 7 com o objetivo de verificar a presença no hipocampo de indivíduos jovens submetidos ao estresse. Por ser uma subunidade constitutiva, α 7 apresentou intensa imunomarcacão em todos os animais. Assim também foi a imunomarcacão para PA28 α , contrariando os achados de Stratford et al. (2006) que afirmaram ser esta subunidade expressa em níveis muito baixos nos tecidos.

De acordo com Ponnappan et al. (2007), os níveis de PA28 α e β são inalterados com o processo de envelhecimento. A presença de imunoproteasomas é sempre acompanhada da expressão da subunidade do complexo regulador PA28 α e já foi descrita também no cérebro de ratos. Esta subunidade se expressa tanto no núcleo quanto no citoplasma de vários tipos celulares, inclusive na micróglia. Mishto et al. (2003) também encontraram níveis elevados de PA28 α no cérebro de humanos senis e adultos, assim como foi a expressão do imunoproteasoma LMP2.

Assim como Ponnappan et al. (2007), que afirmam que os níveis de PA28 α são inalterados com a idade, não se observou alteração na expressão desta subunidade nos animais analisados neste experimento.

Segundo Ho et al. (2007), a subunidade catalítica LMP2 é altamente expressa no cérebro de pacientes com Doença de Alzheimer em relação ao cérebro de pacientes senis não dementes e a expressão em pacientes jovens é

ausente. Contrariando Ho et al. (2007), verificou-se imunomarcção positiva também nas fêmeas controle deste estudo, independente da idade. Nos animais estressados o anti-LMP2 foi expresso mais fortemente, e mais células se mostraram reativas nas fêmeas senis.

Acredita-se que estes resultados seriam em função da LMP2 ser requerida para a transcrição do gene receptor de estrógeno (ER) e para a progressão do ciclo celular mediado por este hormônio, conforme Ho et al. (2007). Esta positividade na expressão deste imunoproteasoma pode estar relacionada com o ciclo estral destes animais.

Neste estudo, uma maior imunomarcção para LMP2 em fêmeas senis quando comparadas aos machos da mesma idade pode estar relacionada também à atividade do proteasoma 26S, envolvido na transcrição dos receptores nucleares de hormônios (NHR). Segundo Keppler et al. (2011), o ER é degradado via proteasoma e sua atividade proteolítica está ligada ao gene de transcrição dos NHRs. Em função disso, pode-se inferir que existe uma relação entre sexo e expressão de LMP2 no hipocampo de ratos senis.

Para Mishto et al. (2006b), o imunoproteasoma é claramente expresso no hipocampo de indivíduos senis e aparentemente não expresso, ou só em quantidades mínimas no hipocampo de jovens. Nestes últimos, ele é limitado às células endoteliais. Isto suporta a hipótese de que o envelhecimento cerebral é caracterizado por um estado inflamatório crônico, denominado “inflammaging” por Franceschi et al. (2000) e acompanhado por alterações metabólicas. Como a resposta ao estresse promove um ambiente semelhante à resposta inflamatória (BLACK, 2002), pode acontecer uma neuroinflamação, semelhante ao processo de envelhecimento (FRANCESCHI et al., 2007; DEVENTER E NEEFJES, 2010).

No entanto, a menor expressão de LMP2 nos animais senis tratados com GH e a ausência de LMP7 nestes mesmos animais vão de encontro aos achados histomorfométricos deste trabalho. Aqui, os ratos senis submetidos ao tratamento E+D+GH apresentaram aumento relativo das áreas GD e CA4, além de melhor espessura da CG em relação aos senis dos grupos C, E e E+D. De acordo com Tresguerres et al. (2008), o GH protege os neurônios do hipocampo contra danos conseqüentes do envelhecimento e, no presente

trabalho, pode ter atuado como neuroprotetor, minimizando a expressão de LMP2 e LMP7 nestes animais.

O processo de envelhecimento cerebral também tem relação direta com a imunossenilidade. Segundo Ro-Hanel e Schwartz (2009), são necessárias células T CD4+ específicas para antígenos do SNC, cuja integridade é comprometida pelo acúmulo de substâncias nocivas. O uso de substâncias que promovam a estimulação tímica e conseqüentemente a ativação imunológica, podem promover a renovação celular e restabelecer a habilidade cognitiva cerebral.

A expressão de LMP7 geralmente acompanha a de LMP2, tanto em tecidos cerebrais como em hepatócitos, como descrito por Mishto et al. (2006b). No presente estudo, a imunomarcção para LMP7 não apresentou a mesma reatividade nos animais analisados, sendo negativa nos jovens controle e fracamente positiva nos demais.

A ausência de imunomarcção para LMP7, neste trabalho, em alguns animais senis vai de encontro aos resultados de Ghi et al. (2009), quando analisaram expressão de LMP2 e LMP7 no hipocampo de cães e verificaram, assim como em neste estudo, uma ausência de LMP7 e um aumento de LMP2 em cães senis, comparados a jovens.

No entanto, Seifert et al. (2010) relataram que camundongos de oito semanas, deficientes da subunidade $\beta 5i/LMP7$, apresentaram maiores danos no SNC conseqüentes de um processo inflamatório mediado pelo estresse oxidativo. Neste trabalho, pode-se inferir que uma expressão de LMP7 menor em relação a LMP2 esteja relacionada a uma deficiência na ação protetora do imunoproteasoma nos animais submetidos aos protocolos de estresse e desafio imunológico.

5. CONCLUSÃO

Neste trabalho o estresse crônico moderado promoveu alterações histomorfométricas no hipocampo de indivíduos jovens que são características do envelhecimento neurológico, sugerindo a ação neurodegenerativa do protocolo de estresse adotado. A presença dos imunoproteasomas LMP2 e LMP7 em ratos jovens, submetidos a este protocolo de estresse crônico,

confirma que o estresse simula o processo de envelhecimento. Porém, a presença de uma imunomarcção fraca (+) para LMP2 nos animais senis tratados com GH sugere uma ação neuroprotetora deste hormônio no envelhecimento, indicando a necessidade de maiores estudos para o seu uso como terapia auxiliar também para desordens neurológicas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARAN, S.E.; ARMSTRONG, C.E.; NIREN, D.C.; HANNA, J.J.; CONRAD, C.D. Chronic stress and sex differences on the recall of fear conditioning and extinction. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 91, p. 323-332, 2009.

BARKATS, M.; BERTHOLET, J.Y.; COHEN-SALMON, C. Age-related morphological changes in the hippocampus in two mouse strains. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 87, p. 155-164, 1996.

BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso**. 3.ed. São Paulo: Artmed, 2008. 896 p.

BLACK, P.H. Stress and the inflammatory response: a review of neurogenic inflammation. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 16, p. 622-653, 2002.

BOWMAN, R.E.; MACLUSKY, N.J.; DIAZ, S.E.; ZRULL, M.C.; LUINE, V.N. Aged rats: sex differences and responses to chronic stress. **Brain Research**, v. 1126, p. 156-166, 2006.

BROWN-BORG, H.M.; RAKOCZY, S.G. Growth hormone administration to long-living dwarf mice alters multiple components of the antioxidative defense system. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 124, p. 1013-1024, 2003.

BUYNITSKY, T.; MOSTOFSKY, D.I. Restraint stress in biobehavioral research: Recent developments. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 33, p. 1089-1098, 2009.

CARRARO, G.; BULTEAU, A.; PETROPOULOS, I.; FRIGUET, B. Impairment of proteasome structure and function in aging. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 34, p. 1461-1474, 2002.

CHONDROGIANNI, N.; PETROPOULOS, I.; FRANCESCHI, C.; FRIGUET, B.; GONOS, E.S. Fibroblast cultures from healthy centenarians have an active proteasome. **Experimental Gerontology**, v. 35, p. 721-728, 2000.

COHEN, G.D. **O cérebro no envelhecimento humano**. São Paulo: Organização Andrei, 1995. 291 p.

DEVENTER, S.; NEEFJES, J. The immunoproteasome cleans up after inflammation. **Cell**, v. 142, n. 20, p. 517-518, 2010.

DHABHAR, F.S.; McEWEN, B.S.; SPENCER, R.L. Adaptation to prolonged or repeated stress-comparison between rat strains showing intrinsic differences in reactivity to acute stress. **Neuroendocrinology**, v. 65, p. 360-368, 1997.

FRANCESCHI, C.; BONAFÉ, M.; VALENSIN, S. Human immunosenescence: the prevailing of innate immunity the failing of clonotypic immunity, and the filling of immunological space. **Vaccine**, v. 18, p. 1717-1720, 2000.

FRANCESCHI, C.; CAPRI, M.; MONTI, D.; GUINTA, S.; OLIVIERI, F.; SEVINI, F.; PANCURGIA, M.P.; INDIVIA, L.; CELANI, L.; SCURTI, M.; CEVENINI, E.; CASTELLANI, G.C.; SALVIOLI, S. Inflammaging and anti-inflammaging: a systemic perspective on aging and longevity emerged from studies in humans. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 128, p. 92-105, 2007.

FRENCH, R.A.; BROUSSARD, S.R.; MEIER, W.A.; MINSHALL, C.; ARKINS, S.; ZACHARD, J.F.; DANTZER, R.; KELLEY, K.W. Age-associated loss of bone marrow hematopoietic cells is reversed by GH and accompanies thymic reconstitution. **Endocrinology**, v. 143, n. 2, p. 690-699, 2002.

GAMARO, G.D.; MANOLI, L.P.; TORRES, I.L.S.; SILVEIRA, R.; DALMAZ, C. Effects of chronic variate stress on feeding behavior and n monoamine levels in different rat brain structures. **Neurochemistry International**, v. 42, p. 107-114, 2003.

GARRETT, J.E.; WELLMAN, C.L. Chronic stress effects on dendritic morphology in medial prefrontal cortex: sex differences and estrogen dependence. **Neuroscience**, v. 162, p. 195-207, 2009.

GHI, P.; DI BRISCO, F.; DALLORTO, D.; OSELLA, M.C.; ORSETI, M. Age-related modifications of egr1 expression and ubiquitin-proteasome components in pet dog hippocampus. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 130, p. 320-327, 2009.

HO, Y.K.; BARGAGNA-MOHAN, P.; WEHENKEL, M.; MOHAN, R.; KIM, K. LMP2-Specific inhibitors: chemical genetic tools for proteasome biology. **Chemistry & Biology**, v. 14, p. 419-430, 2007.

HUNTER, R.G.; McCARTHY, K.J.; MILNE, T.A.; PFAFF, D.W., McEWEN, B.S. Regulation of hippocampal H3 histone methylation by acute and chronic stress. **PNAS**, v. 106, p. 20912-20917, 2009.

JAYTISSA, M.N.; BISGAARD, C.F.; WEST, M.J.; WIBORG, O. The number of granule cells in rat hippocampus is reduced after chronic mild stress and re-established after chronic escitalopram treatment. **Neuropharmacology**, v. 54, p. 530-541, 2008.

JOËLS, M.; KARST, H.; KRUGERS, H.J.; LUCASSEN, P.J. Chronic stress: Implications for neuronal morphology, function and neurogenesis. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 28, p. 72-96, 2007.

KEPPLER, B.R.; ARCHER, T.K.; KINYAMU, K. Emerging roles of the 26S proteasome in nuclear hormone receptor-regulated transcription. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1809, p. 109-118, 2011.

KOGA, H.; KAUSHIK, S.; CUERVO, A.M. Protein homeostasis and aging: the importance of exquisite quality control. **Ageing Research Reviews**, 2010.

KORTE, S.M.; KOOLHAAS, J.M.; WINGFIELD, J.C.; McEWEND, B.S. The Darwinian concept of stress: benefits of allostasis and costs of allostatic load and the trade-offs in health and disease. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 29, p. 3-38, 2005.

LUCCA, G.; COMIM, C.M.; VALVASSORI, S.S.; RÉUS, G.Z.; 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.

MACHADO, A. **Neuroanatomia funcional**. 2.ed. São Paulo: Ateneu, 2006. 363 p.

McEWEN, B.S. The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. **Brain Research**, v. 886, p. 172-189, 2000.

McEWEN, B.S.; CONRAD, C.D.; KURODA, Y.; FRANKFURT, M.; MAGARINOS, A.M.; McKITTRICK, C. Prevention of stress-induced morphological and cognitive consequences. **European Neuropsychopharmacology**, v. 7, p. S323-S328, 1997.

MISHTO, M.; BELLAVISTA; SANTORO, A.; SOLZING, A.; LIGORIO, C.; NACMIAS, B.; SPAZZAFUMO, L.; CHIAPPELLI, M.; LICASTRO, F.; SORBI, S.; PESSION, A.; OHM, T.; GRUNE, T.; FRANCESCHI, C. Immunoproteasome and LMP2 polymorphism in aged and Alzheimer's disease brains. **Neurobiology of Aging**, v. 27, p. 54-66, 2006a.

MISHTO, M.; BELLAVISTA, E.; SESSIONS, R.; TEXTORIS-TAUBE, K.; DAL PIAZ, F.; GARRARD, G.; FORTI, K.; SALVIOLI, S.; FRIGUET, B.; KLOETZEL, P.M.; RIVETT, A.J.; FRANCESCHI, C. A structural model of 20S immunoproteasomes: effect of LMP2 codon 60 polymorphism on expression, activity, intracellular localization and insight into regulatory mechanisms. **Biological Chemistry**, v. 387, p. 417-429, 2006b.

MISHTO, M.; SANTORO, A.; BELLAVISTA, E.; BONAFÉ, M.; MONTI, D.; FRANCESCHI, C. Immunoproteasomes and immunosenescence. **Ageing Research Reviews**, v. 2, p. 419-432, 2003.

MIZOGUCHI, K.; IKEDA, R.; SHOJI, H.; TANAKA, Y.; MARUYAMA, W.; TABIRA, T. Aging attenuates glucocorticoid negative feedback in rat brain. **Neuroscience**, v. 159, p. 259-270, 2009.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL – NRC. **Guide for care and use of laboratory animals**: a report of the Institute of Laboratory Animal Resources Committee on Care and Use of Laboratory Animals. 1985.

PARDON, M. Stress and ageing interactions: a paradox in the context of shared etiological and physiopathological processes. **Brain Research Reviews**, v. 54, p. 251-273, 2007.

PAXINOS, G. **The rat nervous system**. 3.ed. New York: Elsevier, 2006. 1309 p.

PONNAPPAN, S.; OVAA, H.; PONNAPPAN, U. Lower expression of catalytic and structural subunits of the proteasome contributes to decreased proteolysis in peripheral blood T lymphocytes during aging. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 799-809, 2007.

RON-HAREL, N.; SCHWARTZ, M.. Immune senescence and brain aging: Can rejuvenation of immunity reverse memory loss? **Trends in Neurosciences**, v. 32, n. 7, p. 367-375, 2009.

SEIFERT, U.; BIALY, P.L.; EBSTEIN, F.; BECH-OTSCHIR, D.; VOIGT, A.; SCHRÖTER, F.; PROZOROVSKI, T.; LANGE, N.; STEFFEN, J.; RIEGER, M.; KUCKELKORN, U.; AKTAS, O.; KLOETZEL, P-M.; KRÜGER, E. Immunoproteasomes preserve protein homeostasis upon Interferon-induced oxidative stress. **Cell**, v. 142, p. 613-624, 2010.

SEGAR, T.M.; KASCKOW, J.W.; WELGE, J.A.; HERMAN, J.P. Heterogeneity of neuroendocrine stress responses in aging rat strains. **Physiology & Behavior**, v. 96, p. 6-11, 2009.

SHARP, P.E.; LA REGINA, M.C. **The laboratory rat**. New York: CRC Press, 1998.

STRATFORD, F.L.L.; CHONDROGIANNI, N.; TROUGAKOS, I.P.; GONOS, E.S.; RIVETT, A.J. Proteasome response to interferon- γ is altered in senescent human fibroblasts. **FEBS Letters**, v. 580, p. 3989-3994, 2006.

SWAAB, D.F.; BAO, A.; LUCASSE, P.J. The stress system in human brain in depression and neurodegeneration. **Ageing Research Reviews**, v. 4, p. 141-194, 2005.

TRESGUERRES, J.A.F.; KIREEN, R.; TRESGUERRES, A.F.; BORRAS, C.; VARA, E.; ARIZNAVARRETA, C. Molecular mechanisms involved in the hormonal prevention of aging in the rat. **Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology**, v. 108, p. 318-326, 2008.

VARRIANO, A.A. **Alterações clínicas e bioquímicas decorrentes do estresse crônico imprevisível e do estresse oxidativo em ratos**. 2008. 146 f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

WAGNER-SMITH, K.; MARKOU, A. Depression: A repair response to stress-induced neuronal microdamage that can grade into a chronic neuroinflammatory condition? **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 35, p. 742-764, 2011.

WAPPLER, E.; SZILÁGYI, G.; GÁL, A.; SKOPÁL, J.; NYAKAS, C.; NAGY, Z.; FELSZEGHY, K. Adopted cognitive tests for gerbils: Validation by studying ageing and ischemia. **Physiology & Behavior**, v. 97, p. 107-114, 2009.

CONCLUSÕES GERAIS

- Assim como o envelhecimento, o estresse crônico moderado promove a atrofia do timo.
- O desafio imunológico não foi capaz de provocar mudanças estruturais no timo.
- A terapia com GH levou a hipertrofia do timo, principalmente nos animais senis.
- Os níveis de testosterona não se alteraram com os protocolos.
- Nos protocolos E+D e E+D+GH os níveis de estradiol foram aumentados em ambos os sexos, indicando uma resposta imunológica ao estresse.
- O estresse crônico moderado promove alterações histomorfométricas no hipocampo de indivíduos jovens que são características do envelhecimento neurológico.
- A presença dos imunoproteasomas LMP2 e LMP7 em ratos jovens, submetidos aos protocolos de estresse simula o processo de envelhecimento.
- Uma imunomarcção fraca ou ausente nos ratos senis submetidos ao estresse, desafio imunológico e tratamento com GH, sugere uma ação neuroprotetora deste hormônio.