

**ESTRESSE SOCIAL CRÔNICO MURINO: A INFLUÊNCIA DA LATÊNCIA DE AGRESSÃO
SOBRE AS ALTERAÇÕES TIMICAS
MURINE CHRONIC SOCIAL STRESS: THE INFLUENCE OF AGGRESSION LATENCY UPON
THYMIC ALTERATIONS**

**Aline Guazzelli, Hugo Medeiros Garrido de Paula. – Ciências Biológicas - Departamento de Ciências
Biológicas – Faculdade de Ciências – Campus de Bauru.**

Resumo

Modelos animais podem ser úteis no estudo dos efeitos do estresse psicossocial sobre condições patológicas e atividade do sistema imune. Num modelo baseado na interação residente-intruso em camundongos, foi descrito que o timo apresenta redução de tamanho como consequência das interações sociais. O objetivo do presente trabalho foi determinar quais aspectos dessa interação intruso-residente estão associados com alterações tímicas. Foram utilizados 8 camundongos SWISS, 4 deles foram separados individualmente em caixas a fim de que desenvolvessem territorialidade, e denominados residentes. Após um período de seis dias, cada um dos 4 animais restantes foi colocado na caixa junto a um residente, sendo categorizado como intruso e, formando assim 4 duplas. Nessa caixa, os animais permaneciam separados por uma grade impedindo o contato físico, exceto por um período máximo de 5 minutos por dia, quando os animais podiam interagir. Tal condição foi mantida por 21 dias, e as interações foram registradas em vídeo. Ao término desse procedimento, os animais foram sacrificados e o timo foi coletado, pesado, analisado quanto à celularidade e incluído para corte histológico. Os parâmetros comportamentais foram transcritos por um programa de computador especializado (Etholog, 2.25), e comparados entre si e com as variáveis do timo através do teste de correlação de Pearson. Foram registrados comportamentos de luta defensiva e ofensiva, fuga e posturas de submissão. A frequência de lutas ofensivas diminuiu significativamente (teste t; $p < 0,05$) a partir do sétimo dia (até dia 7: $5.62 \pm 2,07$; dia 8 a 21: $1,54 \pm 0,43$). Outros parâmetros comportamentais oscilaram ao longo dos dias e não mostraram correlação significativa com alterações tímicas. A latência das lutas mostrou correlação negativa com o peso do timo nos animais submissos ($r = -0,96$; $p = 0,038$), e positiva com a celularidade do timo dos animais dominantes ($r = 0,99$; $p = 0,006$). Na interação residente-intruso, a latência de agressão parece ser o fator mais relacionado com os efeitos do estresse social sobre o timo.

Palavras chave: estresse social, timo, agressão

Abstract

Animal models have contributed to better understand the effects of the psychosocial stress upon the immune system activity. In the mice resident-intruder model, social interaction exposure resulted in thymus size reduction. The present study aimed at determining which aspects of the resident-intruder interaction are associated with the thymic alterations. Eight Swiss male mice were subjected to the resident-intruder model of chronic stress. Four of them were housed alone in home-cages for six days and were considered residents. After that, each one of the four remaining mice (the intruder ones) was placed along with a resident animal composing four dyads. The animals were separated by a perforated partition so as to prevent physical interaction, except when the partition was removed for up to five minutes daily. It happened for 21 days and the animals' interactions were videotaped. The mice were then sacrificed, the thymuses were weighed, and submitted to histological and cells viability evaluation. Behavioral transcriptions were done by specialized computer software (Etholog 2.25), and the Pearson test for correlations was used to compare behavioral variables (aggressions, escapes and submission posture) with the thymus variables. The frequency of the offensive fights significantly decreased (Student test t; $p < 0.05$) regarding the first seven days (5.62 ± 2.07) in relation to the following days (1.54 ± 0.43). This reflects the establishment of social hierarchy in the dyads, with dominance or subordination being assumed regardless of the intruder/resident condition. Aggression latency showed a negative correlation with the thymuses weight in subordinates mice ($r = -0.96$; $p = 0.038$) and a positive correlation with the cells viability in dominants mice ($r = 0.99$; $p = 0.006$). Other behavioral parameters oscillated during this period and did not present significant correlation with thymuses alterations. The aggression latency showed to be the most related factor with thymuses changes as the consequence of the social stress in the mice resident-intruder paradigm.

Keywords: social stress, thymus, aggression

INTRODUÇÃO

Há muito tempo o estresse social tem sido relatado como causa principal do desenvolvimento de várias psicopatologias, incluindo depressão, isolamento social e estresse pós-traumático (Blanchard et al. 1998). O isolamento social demonstrou ter efeito deletério na saúde, sendo considerado uma das principais

causas de doenças em humanos (House, 2001), sintomas também foram relatados para outras espécies de mamíferos, como camundongos, ratos, babuínos, esquilos, macacos e porcos, (Ruis et al., 2001).

Estímulos aversivos podem prejudicar a saúde das pessoas, esses efeitos prejudiciais são resultantes não do estímulo em si, mas de nossas reações a eles. O fisiologista Walter Cannon introduziu o termo estresse referindo-se às reações fisiológicas causadas pela percepção de situações aversivas ou ameaçadoras. Os efeitos do estresse podem ser causados por dois hormônios secretados pelas glândulas adrenais, a adrenalina e o cortisol. A adrenalina é liberada em resposta a estímulos aversivos, e promove respostas fisiológicas e comportamentais de alerta, sendo responsável pela elevação da pressão cardíaca. O cortisol é considerado um glicocorticóide por exercer efeitos no metabolismo da glicose. Os glicocorticóides fazem parte de um grupo de hormônios do córtex adrenal que é importante para o metabolismo de proteínas e carboidratos, sendo secretado nas situações de estresse. A secreção de glicocorticóides é controlada por neurônios no núcleo paraventricular do hipotálamo (NPV), os quais secretam um peptídeo denominado hormônio liberador de corticotrofina (CRH), que estimula a glândula hipófise anterior a secretar o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), que entra na circulação geral e estimula o córtex adrenal a secretar glicocorticóides. Os efeitos dos glicocorticóides ajudam o animal a reagir diante a uma situação estressante, mas sua secreção prolongada pode ocasionar efeitos prejudiciais, dentre eles, aumento da pressão arterial, diabetes, infertilidade, inibição das respostas inflamatórias e a supressão do sistema imune. (Carlson, 2001). Estudos relatam que o estresse social pode agir de diferentes maneiras sobre as funções imunológicas, dependendo do modelo de estresse empregado (Merlot et al, 2003)

Dentre os procedimentos comumente usados para reproduzir quadros de estresse em animais de laboratório, muitos possuem baixo valor heurístico, uma vez que simulam condições pouco naturalísticas para os animais, como imobilidade e choques elétricos nas patas (Manuela et al, 1998). Além disso, as respostas de estresse exibidas por um indivíduo dependem do tipo de estresse ao qual ele fora submetido (Merlot et al, 2003). Conseqüentemente, modelos animais que envolvam o contexto social podem ser considerados mais apropriados para a modelagem do estresse vivenciado por humanos, pois representam situações cotidianas nas vidas das pessoas (Manuela et al, 1998), e isso é mais relevante biologicamente na investigação das patologias causadas por estresse (Tamashiro et al, 2004).

Alguns experimentos têm sugerido que o estresse social estaria associado a alterações da resposta imunológica, especificamente da resposta imune celular (Biondi & Zannino, 1997; Dorian & Garfinkel, 1987). Dados experimentais têm revelado que estressores agudos e crônicos resultam na involução tímica (Tunrey e Harmsen, 1987). Observado inicialmente em animais submetidos a modelos convencionais de estresse (estresse de mobilização, choques nas patas, corrida ou nado forçado) verificou-se que a involução

tímica se tratava de um evento reversível que permaneceria apenas na vigência do estímulo (Dhabhar, 1995; Berkovits, 1990).

Mais recentemente, a avaliação do timo de animais submetidos ao estresse social, tem revelado alterações tímicas persistentes, especialmente, no que se refere à redução do número de células T no sangue periférico. Segundo (Bartolomucci, 2004) o estresse social resultante das interações antagônicas entre camundongos machos, causa tanto alterações transitórias como permanentes na função tímica. Segundo os autores, logo às 24h de confronto com um oponente macho dominante, animais submissos exibem marcada atrofia tímica, com aumento significativo dos eventos apoptóticos e diminuição na proliferação celular. Aos 7 dias, estes eventos se individualizam, ou seja, apesar de não haver mais diferença no índice de apoptose dos timócitos, ocorre um aumento no percentual de células em proliferação, sugerindo um início de regeneração do tecido tímico.

O timo é o órgão-chave do desenvolvimento e maturação dos linfócitos T, as células responsáveis pela modulação da resposta imune (Abbas, 2004). Este órgão se limita, superiormente com a traquéia, lateralmente com os pulmões e inferior e, posteriormente, com o coração. Quando plenamente desenvolvido, é de formato piramidal, constituído por dois lobos fundidos e encapsulados por tecido conjuntivo. A cápsula conjuntiva emite septos para o interior dos lobos, dividindo-os em um grande número de lóbulos tímicos; em cada um deles é possível observar a região cortical, muito densa em timócitos e a região medular, com uma densidade menor destas células (Calich & Vaz, 2001).

É para este órgão que, a partir da medula óssea, migram as células precursoras dos linfócitos T. Uma vez no timo, estas células, agora denominados timócitos, sofrem processos de diferenciação, seleção, proliferação e maturação. Esses processos ocorrem, sequencialmente, em microambientes distintos delimitados morfológica e fenotipicamente no interior do órgão.

O microambiente tímico é composto por células não linfóides (células epiteliais, células endoteliais, fibroblastos, macrófagos, células dendríticas) e pela matriz extracelular. De modo geral, a integridade funcional do timo é mantida tanto pelos componentes do seu microambiente como pela barreira hemato-tímica, que é fundamental para a prevenção da tolerância a antígenos estranhos. Essa barreira é composta por células endoteliais capilares, lâmina basal do endotélio, espaço perivascular, lâmina basal de células reticulo-epiteliais e células reticulo-epiteliais e proteínas responsáveis pelas junções intercelulares. É neste espaço complexo que as células T adquirem propriedades funcionais de célula maduras (Geenen, 2001), processo que inclui, entre outros, o rearranjo de genes envolvidos na expressão de receptores de células T (TCR) e alterações na expressão de moléculas da superfície celular.

Em indivíduos jovens, o timo contém muitas células que se encontram embebidas em uma rede epitelial conhecida como estroma tímico, que proporciona o microambiente adequado para seu

desenvolvimento (Janeway et al, 2002). O timo também alberga um grande número de células em processo de degeneração; essas têm morfologia e marcadores característicos de células em apoptose (Bowen, 1999; Roberts et al., 2003)

Cabe salientar aqui que a maioria das células T geradas no timo não é utilizada durante o processo de amadurecimento os então timócitos sofrem um processo de seleção, cujo objetivo é preservar apenas as células que carregam receptores ditos "úteis" para a homeostase do organismo. Estes eventos se iniciam no timo fetal, a partir da 8ª semana de gestação (Haynes et al, 1988), quando da expressão de antígenos de superfície dos timócitos (receptores de células T ou TCR, CD4 e CD8) (Lobach & Haynes, 1987; Royer & Reinherz, 1987).

Estes receptores são peças chave tanto para a sobrevivência dessas células como para sua proliferação e maturação. Na ausência deles, os timócitos entram em uma via que os levará a morte, a chamada "morte por negligência". Do mesmo modo, as células que carregam receptores capazes de reagir com antígenos próprios e, portanto, potencialmente nocivas ao organismo, também são eliminadas. Assim, ao final do processo, somente as células que carregam receptores *úteis* são preservadas.

A preservação dessas células é conhecida como *seleção positiva*; esta assegura a maturação das células T nas quais os receptores ligam-se com baixa avides (mais fracamente) às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Os eventos que envolvem a eliminação de timócitos potencialmente auto-reativos são conhecidos como *seleção negativa*, é se dá quando os receptores de antígenos ligam-se com alta afinidade aos auto-antígenos presentes nos órgãos linfóides primários. A morte por negligência ocorre quando os timócitos não conseguem interagir produtivamente com o complexo MHC-peptídeo, ou seja, quando o TCR do timócito não é capaz de reconhecer as moléculas de MHC no timo. Assim, é a avides da interação entre o timócito e as células estromais tímicas, o fator que determina se o linfócito será selecionado positiva ou negativamente.

Ao final desses processos, 2-5% das células precursoras que chegam da medula óssea, deixam o timo como linfócitos T maduros, *semi-prontos* para desempenharem suas funções. Assim, a geração de novas células, a eliminação de células não reativas e a exportação de células T maduras, são eventos importantes na regulação desse órgão e, conseqüentemente, para a preservação da saúde do indivíduo.

De qualquer modo, a capacidade funcional das células T presentes tanto na medula tímica como no sangue periférico permanece suprimida, pelo menos até 10 dias após o confronto social (Stefanski e Engler, 1998), o que pode representar um fator importante no aumento da susceptibilidade à infecções verificado em animais estressados.

OBJETIVOS

Frente a estas assertivas e visando contribuir para a melhor compreensão dos fenômenos envolvidos nas alterações imunológicas verificadas em indivíduos submetidos ao estresse social crônico, é proposta do presente estudo investigar quais aspectos da interação entre camundongos residentes e intrusos podem estar relacionadas com as seguintes alterações tímicas: peso do órgão, celularidade, viabilidade e morfologia.

MATERIAIS E MÉTODOS

Sujeitos da Pesquisa e Grupos Experimentais

Foram utilizados oito camundongos SWISS, machos, adultos, provenientes do Biotério Central da UNESP de Botucatu.- SP. No decorrer da experimentação, os animais foram mantidos à temperatura ambiente no biotério de manutenção do Laboratório de Immunopatologia Experimental (LIPE) - Unesp - Bauru, recebendo água filtrada e ração *ad libitum*. Todos os procedimentos foram executados de acordo com as normas éticas estabelecidas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Os sujeitos foram divididos em grupos experimentais da seguinte forma: quatro animais foram individualmente isolados (grupo residente) por uma semana a fim que se desenvolvesse uma individualidade e territorialidade. Após esse período, cada um dos outros quatro animais restantes (destinados a comporem o grupo intruso) foi colocado na caixa junto a um residente, e o critério de escolha para a formação das duplas foi o peso corpóreo: o intruso não podia ter peso superior ao do residente. Nesse momento, os animais interagiram por 10 minutos. Após esse tempo, uma grade foi colocada dividindo a caixa em duas partes iguais, não permitindo o contato físico, como forma de prevenir injúrias, mas mantendo o contato sensorial entre os animais. As grades foram removidas diariamente, por mais 20 dias e os animais podiam interagir por no máximo 5 min.

Análise Comportamental

Durante a interação social os comportamentos dos animais foram gravados em vídeo e transcritos por um programa de computador específico (Etholog 2.25). Uma ordem hierárquica foi estipulada: o animal que morde e ataca, foi classificado como DOMINANTE, e o animal que foge e grita foi classificado como SUBMISSO. Então foram estipuladas quatro categorias, RD-Residente Dominante; RS- Residente Submisso; InD- Intruso Dominante e InS- Intruso Submisso. O grupo controle foi determinado a partir de quatro animais mantidos juntos durante todo período.

Coleta de material e Avaliação do Timo

Os animais foram eutanasiados pela administração de dose excessiva de anestésico (4,0 ml/kg de Thionembutal na concentração de 100mg/ml). Após a morte do animal, foi coletado o timo. O timo foi limpo, lavado em PBS, seco em papel de filtro e, em seguida, pesado em Balança analítica. Animais controle foram eutanasiados separadamente um dia após o término do sacrifício do grupo de estresse, e foram submetidos a todos os procedimentos descritos para os animais do grupo de estresse.

Após a pesagem do timo, seus lobos foram separados. O lobo direito foi imerso em solução fixadora de formalina 10% por 24 horas, sendo, em seguida, submetido à lavagem em água corrente, desidratado em gradiente de álcool e incluído em Parafina. O lobo esquerdo foi transferido para placa de petri estéril e homogeneizado (macerado) em 2 mL de PBS. A suspensão obtida foi centrifugada por 10 minutos a 1500 rpm. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* ressuspenso em 1 mL de PBS, para determinação da celularidade e viabilidade dos timócitos.

A viabilidade e a celularidade do timo foram determinadas em câmara hemocitométrica de Neubauer em amostras coradas por Azul de Tripán; a viabilidade dos timócitos foi obtida, dividindo o número total de células vivas (translúcidas), pelo número total de células encontradas (células mortas + células vivas).

A avaliação histológica foi feita da seguinte maneira: após inclusão em parafina, o material foi submetido à microtomia para obtenção de cortes finos (4 µm). Estes cortes foram desparafinizados, hidratados em gradiente de álcool e corados por hematoxilina-eosina, para a avaliação histopatológica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise histológica dos animais do grupo de estresse demonstrou as mesmas características morfológicas dos animais controle, sendo possível observar em ambos os grupos a cápsula bem definida, a região cortical muito densa em timócitos e a região medular com uma densidade menor destas células, ou seja, sem alterações morfológicas aparentes. Nenhum dos trabalhos citados a seguir (Bartolomucci et al, 2004; Merlot et al, 2003; Stefanski e Engler, 1998), que relacionam estresse social e timo, fazem referência das interações sociais com as alterações morfológicas do timo.

Os parâmetros comportamentais escolhidos para correlação com alteração tímica foram frequência de lutas, briga ofensiva (um animal ataca o outro), briga defensiva (o animal assumia uma postura de defesa, erguendo-se sobre as duas patas traseiras), fuga (o animal fugia quando era atacado), catação agressiva (que consiste em um animal lambendo o outro), auto-limpeza (o animal lambe as patas dianteiras), tempo de congelamento (o animal para de se movimentar, não há movimento das vibrações e

há um aumento da respiração), tempo em que o animal andou pela caixa, inatividade do animal. A escolha desses parâmetros ocorreu em função do trabalho de Bartolomucci e colaboradores (2004) ter mostrado que essas variáveis são diferentes entre animais dominantes e submissos, o que também ocorre em relação ao tamanho do timo. Tomando como base que a posição hierárquica do animal (ser submisso ou dominante no paradigma residente-intruso), é um fator relevante, a mesma categorização foi feita no presente estudo. A frequência de lutas foi comparada entre os primeiros sete dias de experimentação e os demais dias, o que levou ao resultado que houve redução das mesmas (até dia 7: $5.62 \pm 2,07$; dia 8 a 21: $1,54 \pm 0,43$), isso demonstra que ocorreu o estabelecimento de postos hierárquicos que se tornaram estáveis a partir da primeira semana.

Os parâmetros comportamentais oscilaram ao longo dos dias e não mostraram correlação significativa com alterações tímicas, com exceção da latência das lutas, que apresentou correlação negativa com o peso do timo nos animais submissos ($r=-0,96$; $p=0,038$), e positiva com a celularidade do timo dos animais dominantes ($r=0,99$; $p=0,006$). Este resultado está ilustrado na figura 1.

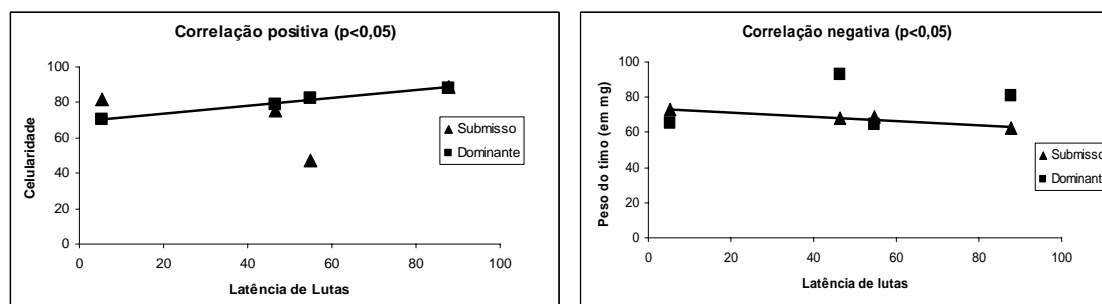


Figura 1. Correlações significativas, de acordo com o teste de Pearson, com nível de significância de 5%, entre parâmetros comportamentais e variáveis tímicas

CONCLUSÃO

Na interação residente-intruso, a latência de agressão parece ser o ser o fator mais relacionado com os efeitos do estresse social sobre o timo.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Profa. Dra. Maria Sueli Parreira de Arruda e as alunas Nathalie Dias, Tainá Garcia e Natália Violato por terem colaborado com o presente trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S.; *Imunologia celular e molecular. Rio de Janeiro. Revinter*, p. 544, 2003.
- BARTOLOMUCCI, A. et al. Behavioral and physiological characterization of male mice under chronic psychosocial stress. *Psychoneuroendocrinology*, v.29, n. 7, p. 899-910, Aug., 2004.
- BIONDI M.; ZANNINO L.G. Psychological stress, neuroimmunomodulation, and susceptibility to infectious diseases in animals and man: a review. *Psychother. Psychosom.*, v.66, n. 1 p. 3-26, 1997.
- BLANCHARD, R.T et al. Chronic social stress: Changes in behavioral and physiological indices of emotion. *Aggressive behavior*, v. 24, p. 307-321, 1998.
- BOWEN, L.D. Apoptosis and programmed cell death. In: BYUNG, P.Y. (Eds.). **Methods in aging research**. Boca Raton. CRC Press, p.453-473, 1999.
- CALICH, V.; VAZ, C. *Imunologia. Rio de Janeiro: Revinter*, p. 42, 2001.
- CARLSON, N.R. Os transtornos de ansiedade, o autismo e o estresse. In _____. **Fisiologia do comportamento**. 7ª Ed. São Paulo: Tamboré, 2001. 569-581.
- DHABHAR, F.S et al. Effects of stress on immune cell distribution. Dynamics and hormonal mechanisms. **J Immunol.** v. 154, n. 10, p. 5511-5527, 1995.
- DORIAN B; GARFINKEL P.E. Stress, immunity and illness-a review. **Psychol. Med.**, n.17, p. 393-407, 1987.
- GEENEN, V. et al. Thymic T-cell tolerance of neuroendocrine functions: physiology and pathophysiology. **Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)**, n. 47, n. 1, p.179–188, Feb.2001.
- HAYNES, B.J et al. Early events in human T cell ontogeny: phenotypic characterization and immunohistologic localization of T cell precursors in early human fetal tissues. **J Exp Med**, v.168, n. 3 Sep. p. 1.061-1.080, 1988.
- HOUSE, J.S. Social isolation kills, but how and why? **Psychosom. Med.**, v. 63, Mar-Apr. P. 273–274, 2001.
- JANEWAY et al. Immunobiologia. **Artmed**, p. 252-3, 2001.
- LOBACH, D.; HAYNES, B. Ontogeny of the human thymus during fetal development. **J Clin Immunol**, v. 7, p. 281-297, Mar. 1987.
- MARTINEZ, M.; CALVO-TORRENT, A.; PICO-AFONSO, MA. Social defeat and subordination as models of social stress in laboratory rodents: a review. **Aggressive behavior**, n.24, p. 241-256, 1998.
- MERLOT, E et al. Importance of fighting in the immune effects of social defeat. **Physiology & Behavior**, v.80 n. 3-4 p. 351– 357, Nov. 2003.

ROYER, H.D.; REINHERZ, E.L. T lymphocytes: ontogeny, function, and relevance to clinical disorders. **N Engl Med**, v. 317, n. 18 p. 1.136-1.142, Oct. 1987.

RUIS, M.A.W. Adaptation to social isolation, acute and long-term stress responses of growing gilts with different coping characteristics. **Physiol. Behav.**, n. 4, p. 541–551, Jul. 2001.

STEFANSKI, V.; ENGLER, H. Effects of acute and chronic social stress on blood cellular immunity in rats. **Physiol Behav.**, v. 64 n. 5, p. 733-741, Jul. 1998.

TAMASHIRO, K.L.K et al. Metabolic and endocrine consequences of social stress in a visible burrow system. **Physiology & Behavior**, v.80, n 5, p. 683-693, Feb. 2004.

TURNEY, T.H.; HARMSSEN, A.G. Splenomegaly and other hematological parameters in the socially dominant mouse. **Physiol Behav.**, v.33, n. 4, p. 559-562, Oct. 1984.