



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GERONTOLOGIA BIOMÉDICA

---

## TESE DE DOUTORADO

# ANÁLISE DOS MECANISMOS PSICONEUROIMUNOENDÓCRINOS QUE REGULAM A IMUNIDADE CELULAR EM IDOSOS SAUDÁVEIS

**CLARICE LUZ**

Orientador: Prof. Dr. MOISÉS E. BAUER

TESE APRESENTADA AO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM GERONTOLOGIA BIOMÉDICA  
COMO REQUISITO PARCIAL PARA A  
OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR.

PORTO ALEGRE (RS)  
JANEIRO DE 2006

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

*In memoriam a Osmar Honorato Luz*

*“Que não conseguiu resistir às doenças do envelhecimento e partiu  
antes que pudesse presenciar esta conquista...”*

*Dedico com muito amor este trabalho ao meu marido Luis Antonio e meus filhos Bruna e Vinicius.*

## **Agradecimentos**

Ao meu Orientador Prof. Dr. Moises Evandro Bauer pelo seu estímulo, apoio, compreensão, amizade e também por sua determinação em me auxiliar na busca da qualidade neste do trabalho e.pela sua competente orientação.

A Prof. Dra. Ivana Manica da Cruz pelo apoio, incentivo, amizade e por ter muito me auxiliado junto ao Projeto Gênesis, na seleção dos idosos de Gravataí/RS.

A Sra.Ingrid Manfredi, da Prefeitura de Gravataí/RS, pelo seu carinho e seu trabalho incansável no traslado dos idosos de Gravataí até o Hospital São Lucas/PUCRS.

A Prefeitura de Gravataí, pelo apoio e auxílio no transporte dos idosos.

Aos então estagiários do IPB, Diego Collaziol, Thales Preissler Diego, Fabiana Dornelles, Elisa e Carolina pelo auxílio com as culturas de linfócitos e nas coletas de saliva.

As colegas do Laboratório *in vitro* da Medicina Nuclear do Hospital São Lucas, Rosa Maria Selbach Souza e Clair Subtil pelo auxílio nas coletas de sangue e preparo das amostras para os ensaios.

Aos então estágios da Faculdade de Farmácia da PUCRS, Fernando Frosi e Adriana Pedroso que muito me incentivarem a iniciar este estudo e no o auxílio junto aos idosos.

A Sra. Vera Lúcia Santos do Nascimento (Secretaria do Pós Graduação em Gerontologia Biomédica), que carinhosamente sempre me incentivou e auxiliou nas questões burocráticas.

A Jaqueline Ehroin, Vanessa Franco e Fernando Gonçalves que me deram cobertura no meu trabalho durante a minha ausência.

A DPC - Medlab, em especial ao Sandro e Dr. Nilton Cabreira, pelo incentivo, confiança pela doação dos kits para as análises hormonais e de citocinas.

Aos alunos da PUCRS e aos funcionários do Hospital São Lucas que gentilmente participarem como grupo de controle.

Em especial, a todos idosos que participaram deste estudo que sempre me receberam carinhosamente e muito me ensinaram sobre a vida, o envelhecimento e a relevância de estudos nesta área.

A minha querida mãe, Edith que me ensinou a perseverança e a nunca desistir dos meus objetivos.

Enfim, a todos os amigos que me estimularam, e a todos que contribuíram de uma ou outra forma, e que eu não tenha citado.

Ao CNPq e FAPERGS pelo apoio financeiro.

# SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>9</b>
<b>2.</b>	<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>10</b>
<b>3.</b>	<b>LISTA DE ABREVIATURAS.....</b>	<b>11</b>
<b>4.</b>	<b>RESUMO.....</b>	<b>14</b>
<b>5.</b>	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>15</b>
<b>6.</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>7.</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>19</b>
7.1.	ALTERAÇÕES NUTRICIONAIS NO ENVELHECIMENTO .....	19
7.1.1.	<i>Albumina sérica.....</i>	19
7.1.2.	<i>Ferritina.....</i>	20
7.1.3.	<i>Ácido fólico .....</i>	20
7.1.4.	<i>Vitamina B12.....</i>	21
7.2.	ALTERAÇÕES PSICOLÓGICAS NO ENVELHECIMENTO .....	22
7.2.1.	<i>Depressão.....</i>	24
7.2.2.	<i>Ansiedade.....</i>	26
7.2.3.	<i>Estresse .....</i>	27
7.2.3.1.	<i>Tipos de estresse .....</i>	28
7.2.4.	<i>Fatores estressores no envelhecimento.....</i>	31
7.3.	ALTERAÇÕES ENDÓCRINAS NO ENVELHECIMENTO .....	31
7.3.1.	<i>Fisiologia do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HPA).....</i>	32
7.3.2.	<i>Ritmo circadiano do cortisol.....</i>	34
7.3.3.	<i>Teoria neuroendócrina do envelhecimento .....</i>	36
7.3.4.	<i>Cortisol .....</i>	38
7.3.5.	<i>Dehidroepiandrosterona (DHEA).....</i>	39
7.3.6.	<i>Hormônio do crescimento (GH) .....</i>	41
7.3.7.	<i>Resistência adquirida a glicocorticóides .....</i>	44
7.4.	ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS NO ENVELHECIMENTO.....	45
7.4.1.	<i>Células T.....</i>	48
7.4.2.	<i>Proliferação celular.....</i>	50
7.4.3.	<i>Citocinas .....</i>	51
7.4.4.	<i>TNF-<math>\alpha</math>.....</i>	52
7.4.5.	<i>IL-6.....</i>	54
7.4.6.	<i>sIL-2R.....</i>	55
7.5.	INTERAÇÕES PSICONEUROIMUNOENDÓCRINAS .....	56
<b>8.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>61</b>
8.1.	OBJETIVO GERAL.....	61
8.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	61
<b>9.</b>	<b>ARTIGO 01 - IMPACT OF PSYCHOLOGICAL AND ENDOCRINE FACTORS ON CYTOKINE PRODUCTION OF HEALTHY ELDERLY PEOPLE.....</b>	<b>62</b>
	<b>ABSTRACT.....</b>	<b>63</b>
9.1.	INTRODUCTION .....	64
9.2.	MATERIALS AND METHODS.....	66
9.2.1.	<i>Subjects .....</i>	66
9.2.2.	<i>Psychological evaluation .....</i>	67
9.2.3.	<i>Collection of salivary samples and cortisol analysis .....</i>	68
9.2.4.	<i>Collection of peripheral blood and isolation of mononuclear cells.....</i>	69
9.2.5.	<i>Serum DHEA.....</i>	69

9.2.6.	Cell cultures and cytokines.....	69
9.2.7.	Statistical analysis.....	70
9.3.	RESULTS.....	71
9.3.1.	Demographic data and psychological evaluation.....	71
<b>TABLE 2. CHARACTERISTICS OF THE STUDY SAMPLE.</b>		<b>72</b>
9.3.2.	Endocrine evaluation.....	73
9.3.3.	Cytokines.....	74
9.3.4.	Psychoneuroendocrine relationships on cytokine production.....	75
9.4.	DISCUSSION.....	77
<b>ACKNOWLEDGEMENTS</b> .....		<b>80</b>
<b>10. ARTIGO 02 - HEALTHY AGEING IS ASSOCIATED WITH SIGNIFICANT DISTRESS AND IMPAIRED NEUROIMMUNOMODULATION</b> .....		<b>81</b>
<b>RUNNING TITLE: NEUROIMMUNOMODULATION OF HEALTHY AGEING</b> .....		<b>81</b>
<b>SUMMARY</b> .....		<b>82</b>
10.1.	INTRODUCTION.....	83
10.2.	METHODS.....	86
10.2.1.	Subjects.....	86
10.2.2.	Procedures.....	87
10.2.3.	Psychological evaluation.....	87
10.2.4.	Nutritional analyses.....	88
10.2.5.	Collection of salivary samples and measurements of DHEA.....	89
10.2.6.	DHEA and GH assessments.....	89
10.2.7.	Collection of peripheral blood and isolation of mononuclear cells.....	89
10.2.8.	Cell cultures and steroid sensitivity assays.....	90
10.2.9.	Cell proliferation/viability assay.....	91
10.2.10.	Statistical analysis.....	91
10.3.	RESULTS.....	92
10.3.1.	Demographic data and nutritional analyses.....	92
10.3.2.	Psychological assessment.....	93
10.3.3.	DHEA assessments.....	94
10.3.4.	Serum versus immunoreactive GH.....	95
10.3.5.	Lymphocyte proliferation and sensitivity to steroids.....	96
10.3.6.	Interrelationships.....	99
10.4.	DISCUSSION.....	100
<b>11. DISCUSSÃO GERAL</b> .....		<b>107</b>
11.1.	ENVELHECIMENTO SAUDÁVEL VERSUS PATOLÓGICO.....	107
11.2.	ALTERAÇÕES PSICOLÓGICAS NO ENVELHECIMENTO.....	109
11.3.	ALTERAÇÕES NEUROENDÓCRINAS NO ENVELHECIMENTO.....	111
11.4.	IMPLICAÇÕES DA IMUNOSSENESCÊNCIA PARA A SAÚDE HUMANA.....	113
11.5.	O ESTRESSE E GLICOCORTICÓIDES ACELERAM O ENVELHECIMENTO.....	116
11.6.	OS CENTENÁRIOS.....	118
11.7.	TERAPIAS PARA ATENUAR A IMUNOSSENESCÊNCIA.....	119
<b>12. CONCLUSÕES</b> .....		<b>121</b>
<b>13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....		<b>123</b>
<b>14. ANEXOS</b> .....		<b>155</b>
14.1.	ARTIGO COMPLETO.....	155
14.2.	ARTIGO COMPLETO.....	156
14.3.	ARTIGO DE REVISÃO.....	157
14.4.	PROTOCOLO SENIEUR.....	158
14.5.	ESCALA DE DEPRESSÃO GERIÁTRICA.....	164
14.6.	ESCALA DE ANSIEDADE.....	165



14.7. INVENTÁRIO DE SINTOMAS DE ESTRESSE ..... 167

## 1. LISTA DE TABELAS

---

<b>Tabela 1.</b> Efeitos do envelhecimento sobre células do sistema imune inato.....	47
<b>Tabela 2.</b> Características da amostra estudada.....	72
<b>Tabela 3.</b> Impacto dos fatores psicológicos nas variáveis neuroendócrinas.....	75
<b>Tabela 4.</b> Características da amostra.....	93
<b>Tabela 5.</b> Análise de regressão múltipla para variáveis endócrinas.....	100

## 2. LISTA DE FIGURAS

---

<b>Figura 1.</b> Núcleo paraventricular do hipotálamo.....	33
<b>Figura 2.</b> Inervação periférica dos principais órgãos linfóides.....	58
<b>Figura 3.</b> Avaliação endócrina .....	73
<b>Figura 4.</b> Produção de citocinas.....	75
<b>Figura 5.</b> Correlação entre cortisol (22h) e citocinas.....	76
<b>Figura 6.</b> Padrão circadiano de DHEA salivar.....	95
<b>Figura 7.</b> Níveis de GH sérico (A) versus GH imunorreativo (B).....	96
<b>Figura 8.</b> Proliferação de células T.....	97
<b>Figura 9.</b> Sensibilidade de linfócitos a glicocorticóides <i>in vitro</i> .....	98
<b>Figura 10.</b> Proliferação de células T e sensibilidade periférica a glicocorticóides.....	99

### 3. LISTA DE ABREVIATURAS

---

**5-HT** – serotonina

**ACTH** – adrenocorticotropina

**APP** – proteínas de fase aguda

**AVP** – vasopressina da arginina

**BMI** - índice de massa corporal

**CBG** – globulina transportadora da corticotropina

**CMI** – imunidade celular mediada

**ConA** – concavaleína A

**CPM** – contagens por minuto

**CRH** – fator liberador da corticotropina

**CTL** – células T citotóxicas

**DEX** – dexametasona

**DHEA** – dehidroepiandrosterona

**DHT** – hipersensibilidade do tipo tardio

**DST** – teste de supressão com dexametasona

**GC** – glicocorticoide

**GH** – hormônio do crescimento

**GHRH** – fator liberador de GH

**GR** – receptor de glicocorticóides

**HIV** – vírus da imunodeficiência adquirida

**HLA** – antígenos leucocitários humanos

**HPA** – hipotálamo-hipófise-adrenal

**IFN\_...** - interferons

**IGF-1** – fator de crescimento semelhante a insulina 1

**IGFBP3** – proteína 3 ligadora do IGF

**IL-...** – interleucinas

**LPS** – lipopolissacarídeo

**MHC** – complexo principal de histocompatibilidade

**NK** – natural killer

**PBL** – linfócitos do sangue periférico

**PBMCs** – células mononucleares do sangue periférico

**PHA** – fitohemaglutinina

**POMC** – pró-opiomelanocortina

**PVN** – núcleo paraventricular

**PWM** – pokeweed mitogen

**RIA** – radioimunoensaio

**SDHEA** – sulfato de dehidroepiandrosterona

**SGA** – síndrome da adaptação geral

**SIL** - receptor solúvel das interleucinas

**SNA** – sistema nervoso autônomo

**SNC** – sistema nervoso central

**SNS** – sistema nervoso simpático

**TCR** – receptor de célula T

**TLR** - Toll-like receptor

**TNF** – fator de necrose tumoral

## 4. RESUMO

---

Introdução: Envelhecimento está associado com alterações imunológicas que se assemelham às observadas no estresse crônico e no tratamento com glicocorticóides (GCs). Estas mudanças incluem a involução tímica, redução das células T CD4+, aumento de citocinas do perfil Th2, aumento das células NK e redução da proliferação de linfócitos T. Esses dados sugerem que a imunossenescência pode estar intimamente relacionada ao estresse psicológico e aos hormônios do estresse. O presente estudo analisou as interações das variáveis psiconeuroendócrinas na imunorregulação no envelhecimento estritamente saudável. Métodos: Participaram neste estudo 46 idosos ( $72,0 \pm 8,5$  anos) e 33 jovens ( $28,0 \pm 6,8$  anos) saudáveis recrutados pelo protocolo SENIEUR. As variáveis psicológicas (estresse, ansiedade e depressão) foram aferidas através de escalas psicométricas. Amostras de saliva foram coletadas (9, 12 e 22h) para dosagem de cortisol e dehidroepiandrosterona (DHEA) (radioimunoensaio). As células mononucleares (PBMCs) foram isoladas do sangue periférico e cultivadas por 24-96 horas com estímulos para as células T (fitohemaglutinina, PHA) e macrófagos (lipopolissacarídeo). Avaliou-se a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-6), IL-2R e hGH nos sobrenadantes das culturas celulares. Também avaliou-se a sensibilidade das células T a glicocorticóides (dexametasona e cortisol) *in vitro*. Resultados: Os idosos apresentaram-se mais estressados, ansiosos, deprimidos e com níveis aumentados de cortisol salivar e diminuição de DHEA e hGH sérico. Os idosos apresentaram uma diminuição significativa da proliferação celular, sem alterações nos níveis de IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-2R e hGH imunorreativo, quando comparados com os jovens adultos. Os idosos ainda apresentaram uma resistência celular significativa aos GCs. Conclusão: Demonstramos que o envelhecimento humano estritamente saudável apresenta alterações psiconeuroendócrinas que podem estar associadas com a imunossenescência.

## 5. ABSTRACT

---

Introduction: Aging has been associated with immunological changes that resemble those observed following chronic stress or glucocorticoid (GC) treatment. These changes include thymic involution, lower number of T CD4+ cells, increased Th2 cytokines and NK cells and blunted T-cell proliferation. These data suggest that immunosenescence may be closely related psychological distress and stress hormones. Here, we analyzed the psychoneuroendocrine interactions of immunoregulation during strictly healthy aging. Methods: Forty six elders ( $72.0 \pm 8.5$  yrs) and 33 young adults ( $28.0 \pm 6.8$  yrs) were recruited accordingly the health criteria of the SENIEUR protocol. The psychological variables (stress, anxiety and depression) were measured by structured clinical interviews. Salivary samples were collected (9, 12 and 22h) for the assessment of cortisol and dehydroepiandrosterone (DHEA) by radioimmunoassays. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated and cultured for 24-96h with stimuli for T cells (phytohemagglutinin, PHA) and macrophages (lypopolysaccharide). We evaluated the production of pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$  and IL-6), IL-2R and hGH in the supernatants of cell cultures. We also investigated the T-cell sensitivity to GCs (dexamethasone and cortisol) *in vitro*. Results: The elders were more stressed, anxious, depressed and had higher cortisol levels in contrast to reduced DHEA and serum hGH. The elders presented a significant lower proliferation without changes in IL-6, TNF- $\alpha$ , IL-2R and immunoreactive hGH when compared to young adults. Cells of elders had a reduced T-cell sensitivity to GCs than young adults. Conclusion: We demonstrate that strictly healthy aging present psychoneuroendocrine changes that may be associated to immunosenescence.



## 6. INTRODUÇÃO

---

O número de idosos vem aumentando muito rapidamente nos países em desenvolvimento. No Brasil, em particular, a população idosa vem crescendo de forma rápida desde o início da década de 60, estreitando progressivamente a base da pirâmide populacional. Embora ocorram disparidades regionais, atualmente a média de idade de idosos se encontra em torno de 67 anos. Especificamente entre 1980 e 2001, o indicador da expectativa de vida passou de 62,7 para 68,9 anos, correspondendo a um aumento de 6,2 anos para ambos os sexos (Swartz, 1990).

O processo de envelhecimento é um fenômeno complexo e modifica gradualmente a integridade de todos os órgãos do corpo. Muitos tecidos, órgãos e sistemas apresentam funções diminuídas no envelhecimento. Essas alterações levam à deterioração da saúde e a perdas na capacidade dos indivíduos cuidarem de si próprios e na qualidade de vida em geral. Em particular, as alterações do sistema imune no processo de envelhecimento (imunossenescência) representam as principais contribuições para o desenvolvimento de doenças e para a mortalidade elevada em idosos. Esta condição implicou diretamente em mudanças epidemiológicas onde as doenças crônico-degenerativas passaram a ser uma das principais causas de morbidade e mortalidade (Fa, 1997).

Estima-se que ao longo da “*era do envelhecimento*”, a população brasileira tenha um crescimento aproximado da população geral em torno de 88%, enquanto que a população idosa, no mesmo período, crescerá aproximadamente 123%. Assim, em 2025, idosos passarão a representar 13,8% da população, fazendo com que o Brasil saia da décima sexta posição em número de idosos para a sexta posição mundial (Agarwal, Acevedo *et al.*, 1988). Estima-se que haverá então cerca de 32 milhões de brasileiros com 60 anos ou mais. Em outras palavras, o Brasil será brevemente um país de idosos.

O Rio Grande de Sul, em particular, possui a maior expectativa de vida do país (72,3 anos). Esse fato justifica a realização de estudos gerontológicos no nosso Estado, com o objetivo elucidar os fatores associados a esta longevidade, bem como proporcionar alternativas para garantia de qualidade de vida dos mesmos. Entretanto, poucas são as medidas preventivas e estratégicas para a efetiva prevenção e tratamento das doenças associadas com o processo de envelhecimento. Estas perspectivas justificam o grande interesse nas pesquisas em Gerontologia Biomédica.

Uma questão fundamental nos estudos imunogerontológicos é a obtenção de populações de idosos saudáveis. Muitas vezes, torna-se difícil distinguir se as alterações imunológicas são decorrentes do envelhecimento ou das doenças associadas ao processo de envelhecimento. Logo, com o objetivo de analisar o processo específico do envelhecimento, nós selecionamos idosos estritamente saudáveis através da aplicação do protocolo SENIEUR (Ligthart, Corberand, Fournier, Galanaud, Humans, Kenes, MLLer-Hermelink *et al.*, 1984), que define critérios rigorosos de saúde baseados em investigações clínicas e parâmetros hematológicos e bioquímicos.

Pesquisas recentes apontam a necessidade de integrar diferentes disciplinas para melhor compreender as alterações imunológicas no envelhecimento. No processo de envelhecimento são observadas inúmeras mudanças fisiológicas que promovem várias disfunções no sistema nervoso central, endócrino e imune (Troen, 2003). Para manutenção da homeostase destes sistemas no envelhecimento, são necessárias reestruturações fisiológicas, as quais nem sempre são favoráveis para saúde do idoso. Estes sistemas participam na etiologia de várias doenças associadas ao envelhecimento, como as doenças crônico-inflamatórias, diabetes, demências e o câncer. Apesar deste crescente interesse, estudos adicionais ainda serão necessários na tentativa de identificar os mecanismos que estão relacionados com o envelhecimento propriamente dito e quais eventos podem representar futuras condições patológicas e conseqüentes prejuízos à saúde do idoso.

Até o presente momento, nenhum estudo investigou o papel das variáveis psiconeuroendócrinas na regulação da resposta imune dos idosos saudáveis. Logo, o entendimento destas interações entre o sistema imune, endócrino e nervoso é relevante para se entender o processo da imunossenescência e seu papel na etiologia de doenças que são de alta prevalência em idosos.

Envelhecimento está associado com alterações imunológicas (imunossenescência) que se assemelham aos observados no estresse crônico e no tratamento com glicocorticóides (GCs). Estas mudanças incluem a involução tímica, redução das células T CD4+, aumento de citocinas do perfil Th2, redução da proliferação de linfócitos T e aumento das células NK. Estes dados sugerem que a imunossenescência humana pode estar intimamente relacionada com o estresse psicológico e aos hormônios do estresse. As alterações do sistema imunes durante o envelhecimento estão entre as principais causas que contribuem para o aumento da morbidade e mortalidade em idosos, devido ao aumento na incidência de infecções, doenças autoimunes e o câncer (Malaguarnera, Ferlito *et al.*, 2001) Contudo, são ainda insuficientes as intervenções terapêuticas para amenizar, retardar ou reverter o impacto da imunossenescência sobre a saúde física e psicológica do idoso.

Na fundamentação teórica do projeto, são apresentadas evidências de os fatores nutricionais, psicológicos e neuroendócrinos podem estar implicadas na modulação do sistema imune no envelhecimento. Para tanto, o presente estudo, propõe analisar a seguinte hipótese:

*H<sub>0</sub> = Alterações psiconeuroendócrinas podem estar associadas com a resposta imune celular no envelhecimento saudável.*

## 7. REFERENCIAL TEÓRICO

---

### 7.1. ALTERAÇÕES NUTRICIONAIS NO ENVELHECIMENTO

Um dos principais fatores que intervêm nos estudos relacionados com a biologia do envelhecimento é a condição nutricional do idoso. Isto porque, tal variável afeta de modo sistêmico a homeostasia corporal e as respostas a fatores ambientais. Abaixo segue uma revisão dos principais componentes nutricionais que podem atuar na modulação psiconeuroendócrina do sistema imune.

#### 7.1.1. *Albumina sérica*

A albumina sérica é uma proteína visceral, considerada fundamental na manutenção da pressão osmótica do organismo. Além disso, ela é uma proteína carreadora de várias moléculas que circulam na corrente sanguínea como hormônios, zinco, magnésio, cálcio e ácidos graxos. Em geral, os níveis de albumina sérica representam um indicador seguro do estado protéico visceral (Mobarhan e Trumbore, 1991).

A síntese de albumina ocorre no fígado e aumenta principalmente quando ocorre uso de corticosteróides e de hormônios da tireóide ou diminui em presença de fatores estressores como trauma, infecção, radiação, desnutrição, em pacientes pós-cirúrgicos, no envelhecimento, etc.(Mobarhan e Trumbore, 1991).

A hipoalbuminemia pode ocorrer também em diversas situações clínicas como nas doenças hepáticas, infecções, síndrome nefrótica, estresse metabólico, ingestão inadequada de proteínas, desnutrição protéica, edema, hiper-hidratação e nas síndromes de má-aborção. Níveis significativamente baixos de albumina também são observados em pacientes de internação psiquiátrica com mania, esquizofrenia e depressão maior (Swartz, 1990; Huang, Wu *et al.*, 2003).

Segundo (Salive, Cornoni-Huntley *et al.*, 1992) em idosos, ocorre uma prevalência de níveis diminuídos de albumina (<3,5g/dL), como resultado do aumento do número de doenças crônicas. Entretanto, alguns estudos (Klonoff-Cohen, Barrett-Connor *et al.*, 1992) sugerem que níveis baixos de albumina sérica ocorrem com aumento da idade e que esta associação é independente do estado de saúde em geral. Contudo, em vários estudos apontam que níveis baixos de albumina estão associados ao aumento da morbidade e mortalidade especialmente em idosos (Rudman, Feller *et al.*, 1987; Agarwal, Acevedo *et al.*, 1988; Corti, Guralnik *et al.*, 1994).

### **7.1.2. Ferritina**

A anemia é um estado clínico freqüente nas populações geriátricas (Reynolds, 2002). Porém a anemia por deficiência de ferro não é consequência do envelhecimento. Níveis baixos de ferritina em idosos podem estar associados a distúrbios alimentares, como baixa ingestão de alimentos que contêm ferro, bem como alterações no trato digestivo, associados às síndromes de má absorção, má orientação nutricional ou ainda, em situações clínicas, associadas a doenças crônicas como insuficiência renal, sangramento digestivo, entre outras.

O grau de anemia está pobremente correlacionado com a presença de distúrbios de neuropsiquiátricos, porém quando, não tratadas, os pacientes poderão desenvolver eventualmente tais complicações (Botez Mi, 1979).

### **7.1.3. Ácido fólico**

Níveis circulantes de ácido fólico são de grande importância para o sistema nervoso em todas as idades (Reynolds, 2002). Na literatura crescem as evidências do envolvimento do ácido fólico no envelhecimento cerebral, podendo afetar especialmente a função cognitiva e o humor (Reynolds, 1968; Reynolds, 2002).

Embora a deficiência de folato seja amplamente considerada como uma consequência dietética secundária da doença psiquiátrica, estudos nutricionais não confirmam esta visão (Bottiglieri T, 1995). Uma dieta pobre, sem dúvida pode contribuir em alguns casos, particularmente em indivíduos idosos, mas outros fatores também podem estar associados como: má absorção intestinal, uso de drogas antiepilépticas, doenças crônicas, entre outros.

Em populações de idosos é alta a incidência da deficiência de folato, especialmente em pacientes psicogerítricos, aumentando o risco para a doença de Alzheimer, doenças vasculares e a demência (Bottiglieri T, 1995).

A associação entre baixas concentrações de folato sérico e concentrações plasmáticas elevadas de homocisteína com depressão e a demência também tem sido observada em pacientes epiléticos, neurológicos, psiquiátricos, geriátricos e psicogerítricos (Riggs, Spiro *et al.*, 1996). A deficiência de folato é também observada em até um terço de pacientes ambulatoriais psiquiátricos ou pacientes internados. Pacientes deprimidos com deficiência de folato apresentam escores mais altos de depressão, com mais altos índices de morbidade e pior resposta para o tratamento convencional com antidepressivos (Reynolds, Preece *et al.*, 1970). Em contrapartida, estudos que utilizaram a reposição de ácido fólico (Brocker P., 1986) verificaram que os pacientes apresentaram mudanças significativas de comportamento e melhora dos sintomas depressivos e dos escores na escala de depressão de Hamilton (Passeri Jr., 1993).

#### **7.1.4. Vitamina B12**

A vitamina B12 é essencial para inúmeras reações bioquímicas que estão implicadas na redistribuição do hidrogênio e carbono como, por exemplo, a biossíntese da metionina e síntese de DNA (De Bree, Verschuren *et al.*, 2001; Refsum, 2001). As consequências metabólicas da deficiência de Vitamina B12 não estão totalmente es-

clarecidas, entretanto entre as principais estão: a anemia megaloblástica e alterações desmielinizantes do sistema nervoso central (degeneração subaguda).

Em idosos, a deficiência de vitamina B12 é um achado comum na clínica médica (Wang Ba, 2001). Existem múltiplas causas para deficiência de vitamina B12, uma vez que qualquer falha no processo de assimilação, que vai desde dos alimentos até a sua utilização a nível celular, ocasiona uma interrupção neste processo aumentando muito a possibilidade de desenvolver uma deficiência por vitamina B12.

Na deficiência de vitamina B12 incluem-se manifestações pouco específicas, como por exemplo, a anemia, perda de peso e outras mais específicas como alterações neurológicas, parestesias, além de transtornos gastrintestinais, alterações do paladar, transtornos visuais (Carmel, Koren *et al.*, 1993) alteração de marcha e transtorno neuropsiquiátricos, como a depressão. As alterações mentais estendem-se desde a irritabilidade à doença de Alzheimer, podendo surgir em alguns casos a psicose e /ou esquizofrenia paranóide.

A presença ou ausência destas alterações está intimamente ligada ao grau de anemia ou deficiência nos níveis de vitamina B12 em associação ou não com os níveis de ácido fólico.

## **7.2. ALTERAÇÕES PSICOLÓGICAS NO ENVELHECIMENTO**

As alterações psicológicas no envelhecimento têm sido tema recorrente na literatura científica, devido à controvérsia, principalmente quanto à etiologia dos distúrbios emocionais em idosos. Em geral os estudos realizados sugerem que estes distúrbios sejam multifatoriais e podem estar associados a fatores genéticos, ambientais, culturais, sociais ou ainda ao histórico de vida do indivíduo e seu perfil no enfrentamento frente às situações adversas da vida.

As alterações psicológicas observadas no envelhecimento assumem características clínicas particulares ou aspectos incomuns em relação a sintomatologia apresentada em indivíduos mais jovens (Salzman, C. e Shader, R. I., 1978; Salzman, C. e Shader, R.I., 1978). Os sintomas mais freqüentes encontrados em idosos estão relacionados a distúrbios de memória e/ou concentração, apatia, desinteresse ou problemas físicos (Klerman, 1983) associados ou não com transtornos cognitivos, onde raramente apresentam queixas como tristeza ou disforia.(Regier, Goldberg *et al.*, 1978; Salzman, 1978; Benedict e Horton, 1990).

Muito embora as desordens psicológicas do envelhecimento possam seguir padrões estabelecidos para indivíduos jovens, permitindo inseri-los dentro dos critérios diagnósticos, como por exemplo, DSM-IV e CID 10, os sintomas do caráter afetivo do idoso como queixas somáticas, dores crônicas, distúrbios do sono e apetite não são totalmente abrangidos por estas categorias de diagnóstico (Blazer, 1994). Alguns destes sintomas estão relacionados a alterações inerentes ao envelhecimento ou ainda associados ou sobrepostos a quadros demenciais ou a outras patologias clínicas preexistentes (Teri e Wagner, 1991; Devins, Edworthy *et al.*, 1992), o que dificulta o diagnóstico clínico de possíveis transtornos psicológicos (Klerman, 1983) podendo desta forma, ser facilmente negligenciados nas consultas clínicas de rotina, resultando em tratamentos inadequados (Almeida e Almeida, 1999).

Tendo em vista a complexidade da influência de fatores psicológicos associados a sistemas fisiológicos em adaptação no envelhecimento, nós analisamos as principais alterações psicológicas observadas no envelhecimento (depressão, ansiedade e estresse), sem que necessariamente estas estejam presentes como doenças psiquiátricas.



### **7.2.1. Depressão**

Embora algumas estimativas informem que a Depressão Maior pode ocorrer em aproximadamente 2% dos adultos com idade superior a 65 anos (Blazer, Bachar *et al.*, 1987), a prevalência da depressão subclínica (sintomas que não se encontram dentro dos critérios diagnósticos para Depressão Maior) no idoso é consideravelmente mais alta: entre 8 e 15% (Blazer, Kessler *et al.*, 1994). Entretanto quando associadas com doenças clínicas essas taxas aumentam significativamente, por exemplo, pacientes com doença coronariana apresentam até 45% dos sintomas depressivos graves (Aromaa, Raitasalo *et al.*, 1994; Carney, Freedland *et al.*, 1995). Taxas semelhantes são descritas em associação com uma série de outras doenças clínicas recorrentes no idoso, como doença de Parkinson (Tom e Cummings, 1998), doença cerebrovascular (Lyness, Caine *et al.*, 1998) e doença de Alzheimer (Burns, Jacoby *et al.*, 1990).

As discrepâncias observadas nas taxas de prevalências e incidência de quadros depressivos em idosos (Ernst e Angst, 1995; Lupsakko, Mantylarvi *et al.*, 2002) podem ser explicadas devido à dificuldade de diagnóstico da depressão. Isto pode ser justificado pelo fato de idosos negarem freqüentemente a depressão e apresentam-se com mais sintomas somáticos, prejuízo cognitivo, perda de memória ou ansiedade como comorbidade.

Os argumentos que sugerem um tipo diferente de depressão no envelhecimento em relação as demais faixas etárias se apóiam nas diferenças de sintomatologias. Nos idosos, a depressão se apresenta com sintomas somáticos mais freqüentes como, por exemplo, dores, desconforto abdominal, tonturas, cansaço e falta de energia, havendo menos antecedentes familiares de depressão e pior resposta ao tratamento. Apesar disso, a tendência atual é não estabelecer diferenças marcantes entre a depressão da idade tardia e a depressão dos adultos mais jovens. De fato, o que teria de diferente nos idosos seria, não a depressão em si, mas as circunstâncias existenciais específicas da idade.

Do ponto de vista vivencial, o idoso vive num contexto de situações de perdas continuadas: a diminuição do suporte sócio-familiar, a perda do status ocupacional e econômico, o declínio físico continuado. A maior frequência de doenças físicas e a incapacidade produtiva crescente compõem uma gama de perdas que conduzem a um expressivo rebaixamento do humor. Também do ponto de vista biológico, na idade avançada é mais freqüente o aparecimento de fenômenos degenerativos ou doenças físicas capazes de produzir sintomatologia depressiva.

A depressão causa mudanças de humor e comportamento, sendo muitas vezes associada a comorbidades médicas e com freqüência é caracterizada como um problema crônico e freqüente nos idosos (Murphy, 1983; Tuma, 2000) . Além da incapacitação pessoal e perdas do desempenho social, a depressão torna-se mais incapacitante que as doenças cardíacas, reumáticas, hipertensão ou diabetes (Almeida, Tamai *et al.*, 1999) estando associada ainda a um aumento de índices de mortalidade e do uso de serviços de saúde (Broadhead, Blazer *et al.*, 1990).

No idoso, a depressão ou sintomas depressivos sem tratamento resulta no sofrimento do paciente, taxas aumentadas de morte, de doenças médicas, suicídio, morbidez e aumento de sobrecarga aos cuidadores. Sintomas depressivos, na ausência de diagnóstico e tratamento, contribuem para o aumento da inaptidão e exacerbam condições clínicas.

Entretanto, pouco ainda se sabe sobre o papel do envelhecimento no surgimento e no curso das síndromes depressivas (Newmann, 1989) tanto na etiopatologia, como em suas manifestações clínicas, curso e desfecho. Sabe-se, entretanto que os aspectos biológicos, bem como os psicológicos e socioeconômicos parecem contribuir para o surgimento e manutenção dos quadros depressivos.

### **7.2.2. Ansiedade**

A ansiedade é um comportamento biológico necessário à sobrevivência do ser humano e é fundamental para adaptação do indivíduo às exigências da vida. Significa também um sinal de alerta que adverte sobre o perigo iminente e capacita a pessoa para medidas eficientes, sejam de enfrentamento ou de fuga. O indivíduo ansioso coloca-se em posição de alarme, através de manifestações tanto físicas como psíquicas (Hirshfeld, 1999).

Respostas de ansiedade, tais como paralisia, susto, alterações na frequência cardíaca, sudorese, pressão arterial e vigilância aumentada são padrões de respostas defensivas e adaptativas que visam reduzir o perigo ou injúria. Muitos transtornos de ansiedade são decorrentes de padrões de respostas exageradas a situações estressoras, e desenvolvem-se mais comumente em indivíduos com uma predisposição neurobiológica que os torna facilmente ansiosos ou alarmados (Jain, Blais *et al.*, 1999). Transtornos de ansiedade são aqueles que incluem: desordens de pânico, agorafobia, social, fobia, ansiedade generalizada, estresse pós-traumático e transtorno obsessivo-compulsivo. Em pessoas idosas, tais condições clínicas são pouco referenciadas. Isso pode ser devido ao fato destes serem compreendidos como comorbidade clínicas ou sintomas de depressão, indicando o nível de confusão associado entre os transtornos de ansiedade com as outras desordens psicológicas. Saber com certeza se a ansiedade pode ser uma das causas ou conseqüência da depressão e se a coexistência de ambos os fenômenos constituem em uma nova entidade clínica, ainda são questões abertas para pesquisas.

Embora haja uma relação complexa entre ansiedade e idade, estudos apontam para uma tendência de que a ansiedade possa diminuir com avançar da idade (Xavier, Ferraz *et al.*, 2001), mas ainda assim sua prevalência é maior de que os transtornos depressivos. Com frequência, os transtornos de ansiedade têm início tardio e estão associados a transtornos depressivos e doença física. Raros estudos são consistentes

sobre as características específicas das desordens de ansiedade em pessoas idosas, não se podendo assim afirmar se, estas diferem das características clínicas de pessoas mais jovens. Em geral, 17% dos homens e 22% das mulheres adultos informaram ter sintomas de ansiedade (Murrell e Himmelfarb, 1989). Entretanto, a ansiedade nos idosos pode se manifestar através da exacerbação de alguns sintomas físicos ou psicológicos, diferentemente dos jovens adultos, uma vez que, a ansiedade pode monopolizar totalmente as atividades psíquicas e comprometer, desde a atenção e memória, até a interpretação fiel da realidade.

### **7.2.3. Estresse**

Estresse pode ser definido, como qualquer situação real ou imaginária que altera a homeostase de um sistema biológico (Levine, 1967). As pressões capazes de levar ao estresse são chamadas de fatores ou agentes estressores. Assim sendo, o estressor pode ser um acontecimento ou uma situação, que de acordo com a sua intensidade, produz tensão emocional suficiente para induzir à reação de estresse.

Os fatores estressantes podem variar amplamente quanto à sua natureza, abrangendo desde componentes emocionais, como por exemplo, frustração ou ansiedade, até componentes de origem ambiental, biológica e física, como é o caso do ruído excessivo, da poluição, variações extremas de temperatura, problemas de nutricionais, entre outros (Lipp, 2003).

Existe uma certa confusão entre estresse e ansiedade. Na realidade, a ansiedade pode ser considerada um dos componentes psíquicos do estresse, juntamente com o medo, pânico, apreensão, angústia, desespero, etc (Cunningham, 1997). O estresse envolve o organismo como um todo e, assim como o aumento de adrenalina e de cortisol podem ser considerados componentes endócrinos do estresse. A ansiedade seria, igualmente, um de seus componentes psíquicos do estresse (Falsetti, 1995).

O estresse não implica, obrigatoriamente, numa alteração patológica e doentia. Ele contribui para a adaptação e a sobrevivência das espécies. O estresse produz uma gama de modificações na composição química e na estrutura funcional do organismo. Algumas dessas modificações são necessárias à adaptação do indivíduo à situação estressora, podendo ser mecanismos de defesa contra os agentes estressores, entretanto, em alguns casos, tais modificações podem resultar em dano ou lesão (Selye, 1936).

A maioria das respostas a estressores é complexa e freqüentemente envolve respostas motoras e cognitivas imediatas e mais tardiamente respostas neuroendócrinas. As respostas puramente neurais servem inicialmente para retirada do organismo da situação estressora. As mudanças neuroendócrinas servem para sustentar a resposta ao estressor e assegurar que a situação ameaçadora seja evitada ou superada. Este conjunto de modificações fisiológicas, resultantes do contato do organismo com um estímulo estressor é definido, como “*Síndrome Geral da Adaptação*” (SGA) (Selye, 1956). A SGA é a soma de todas as reações sistêmicas não específicas que surgem em resposta a uma longa e continuada exposição ao estresse, que é essencialmente diferente das reações adaptativas específicas (tal como a hipertrofia muscular resultante do exercício físico prolongado) e das alterações imunológicas.

#### **7.2.3.1. Tipos de estresse**

O estresse pode ser *agudo* ou *crônico* e apresenta três fases de evolução.

O **Estresse agudo** ocorre quando o indivíduo depara-se com uma situação muito intensa ou extrema, onde o organismo mostra-se incapaz de lidar com os estímulos estressores (Selye, 1956). Normalmente este quadro se inicia minutos após a ocorrência do estímulo, desaparecendo dentro de horas ou dias. O "Estresse Agudo" se caracteriza por atordoamento inicial; estreitamento do campo de consciência; diminuição da atenção; incapacidade de compreender estímulos; desorientação; retraimen-

to da situação circundante (estupor dissociativo); agitação e hiperatividade; sinais autonômicos de ansiedade de pânico; amnésia parcial ou completa para o episódio (Mcewen, 2000). O estresse agudo está geralmente associado com estimulação de várias respostas imunológicas (Dhabhar, 1998) .

Já o **estresse crônico**, implica em uma exposição mais prolongada ao estímulo estressor por um período de tempo mais longo que a SGA. Neste caso, os recursos de adaptação da pessoa são mantidos ativos durante longos períodos de tempo, mesmo depois de cessada a atuação do estressor, sendo este o tipo de estresse que causa problemas fisiológicos, emocionais e interpessoais. O estresse crônico está geralmente associado com reduções imunológicas (Kiecolt-Glaser, 1991; Kiecolt-Glaser, Dura *et al.*, 1991; Bauer, 1999).

Hans Seyle propôs em seus estudos que a evolução da resposta ao estresse pode ocorrer em três fases interdependentes: a *Fase de Alarme*, onde são experimentadas sensações características da alteração do equilíbrio interno do organismo; *Fase de Resistência* inicia-se, quando o organismo tenta a adaptação, devido à sua tendência de procurar a homeostase interna (Cannon, 1939). Nesta fase as reações são opostas àquelas que surgem na *Fase de Alerta* e muitos dos sintomas iniciais desaparecem dando lugar à sensação de desgaste e cansaço. Se o estressor é contínuo e o indivíduo não possui estratégias para lidar com ele, o organismo exaure suas reservas de energia adaptativa, dando-se início a *Fase de Exaustão* levando o indivíduo à exaustão e conseqüente surgimento de doenças mais sérias.

Embora Hans Seyle tenha identificado somente estas três fases, no decorrer de estudos de avaliação do estresse, foi proposta por Lipp, (Lipp, 2003) uma quarta fase, a qual fora identificada tanto clinicamente, como estatisticamente. Esta nova fase foi identificada como *Quase Exaustão*, por se situar entre a fase de resistência e exaustão. A

*Fase de Quase Exaustão* se caracteriza por um enfraquecimento do indivíduo que não está conseguindo adaptar-se ou resistir ao estressor.

Em todas as fases do estresse, os sintomas podem ser tanto de ordem *física* (somático) como *psicológica* (emocional). O estresse físico associa-se a eventos tais como, mudança drástica da temperatura ambiental, cirurgias, traumatismos, hemorragias etc., qualquer tipo de lesão na qual a regeneração tecidual assume níveis importantes (Selye, 1936). O estresse psicológico resulta de acontecimentos não relacionados com lesões orgânicas e que afetam o indivíduo psíquica ou emocionalmente como, por exemplo, a mudança de moradia ou de emprego, casamento, divórcio, viuvez, entre outros (Hellhammer, Buchtal *et al.*, 1997).

Porém, cabe salientar que, as tendências herdadas dos pais e as características de personalidade de cada indivíduo, adquiridas nos primeiros anos de vida, irão influenciar nas reações ao estresse (Ashman Sb, 2002; Essex Mj, 2002). Assim, como difere a reação de cada pessoa a uma determinada situação, da mesma forma o corpo reage de maneira peculiar em cada indivíduo.

Com vistas às diferenças individuais para as reações de estresse, à diversidade de estressores e os seus possíveis efeitos sobre a saúde física e mental em humanos, é imprescindível que o diagnóstico do estresse seja cada vez mais preciso.

A literatura aponta diferentes maneiras de como o estresse pode ser avaliado, como por exemplo, através da avaliação de grandes eventos estressores nos últimos meses (Holmes e Rahe, 1967); análise de eventos recorrentes do dia a dia que possuem um efeito cumulativo no organismo (Keller, Weiss *et al.*, 1981); análise das reações, a partir de aspectos cognitivos/emocionais (Everly, 1987); medidas fisiológicas por procedimentos eletromiográficos e cardiovasculares (Holmes e Rahe, 1967; Everly, 1987); por intermédio de doenças em algum órgão alvo ou ainda através de medidas

neuroendócrinas como a determinação de catecolaminas e/ou cortisol em amostras de plasma, urina ou saliva (Selye, 1976; McClelland, Ross *et al.*, 1985).

#### **7.2.4. Fatores estressores no envelhecimento**

As causas de estresse no envelhecimento estão associadas há vários fatores estressores intrínsecos e extrínsecos ao processo de envelhecimento. Os fatores intrínsecos incluem o histórico de vida de cada indivíduo, conflitos internos, presença de doenças infecciosas e doenças neurodegenerativas, como a doença de Alzheimer e a doença de Parkinson, bem como o perfil de enfrentamento às situações adversas da vida. Alguns estudos sugerem ainda que, o estresse no idoso também possa estar relacionado ao estresse do dia a dia e a depressão tardia (Glasser e Gravdal, 1997). Os fatores extrínsecos estão relacionados ao contexto social e das relações interpessoais da vida do idoso como, a viuvez, divórcio, perdas de pessoas queridas, familiares ou não, redução do poder socioeconômico, inaptidão ao trabalho, solidão e sentimento de rejeição (Campbell, 1984; Luz, Dornelles, Preissler, Collaziol, Da Cruz *et al.*, 2003).

Contudo, saber se, o estresse no envelhecimento prejudica a habilidade responder adequadamente a desafios estressantes e se o estresse prolongado acelera o processo de envelhecimento e ainda, se as diferenças individuais contribuem para diferenças no “envelhecimento bem sucedido”, é ainda tema para muitos estudos.

### **7.3. ALTERAÇÕES ENDÓCRINAS NO ENVELHECIMENTO**

O envelhecimento está associado com importantes alterações no sistema endócrino, a endocrinossenescência. Na endocrinossenescência, quatro sistemas hormonais apresentam diminuições significativas da concentração de seus hormônios circulantes: o sistema gonadal (menopausa e andropausa), metabolismo do cálcio, somatopausa e adrenopausa (Lamberts, Van Den Beld *et al.*, 1997; Straub, R.,



Konecna, L. *et al.*, 1998). Destes sistemas hormonais, as alterações mais evidentes estão relacionadas aos hormônios das gônadas e das glândulas adrenais. Porém, aqui será enfatizado particularmente nas alterações correlacionadas a adrenossenescência e somatossenescência.

### **7.3.1. Fisiologia do eixo Hipotálamo-Hipófise-Adrenal (HPA)**

O eixo HPA constitui um dos principais sistemas endócrinos, responsável pela manutenção da homeostase corporal quando um organismo é estressado ou desafiado. Ativação do eixo HPA é o evento mais importante na resposta do estresse. Os glicocorticóides são os produtos finais desta ativação e atuam na modulação das respostas imunes, limitado a hiper-ativação do sistema imune quando este é desafiado (Munck, Guyre *et al.*, 1984).

A ativação do eixo HPA ocorre sempre que houver um estímulo interno ou externo que ameace a homeostasia, não importando se a natureza do estímulo seja de ordem psicológica, fisiológica ou ambiental (Lipp, 2003). A preservação da homeostasia do organismo necessita de contínuas adaptações comportamentais, autonômicas e endócrinas para controlar os distúrbios causados por estressores internos ou externos (Aguilera, 1994). Todos os organismos desenvolvem mecanismos de adaptação para lidar com essas alterações. Em mamíferos o eixo HPA exerce essa função, integrando os vários sinais indicativos de estresse. Esses sinais convergem para uma via comum representada pelos neurônios da divisão parvocelular do núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo (Lilly e Gann, 1991).

Na ativação do eixo HPA ocorre o estímulo e a liberação do hormônio liberador da corticotropina (CRH) pelo núcleo de paraventricular (PVN) do hipotálamo no sistema porta hipotálamo – hipofisário que então estimula a liberação de adrenocorticotropina (ACTH) pela hipófise anterior (**Figura 1**).

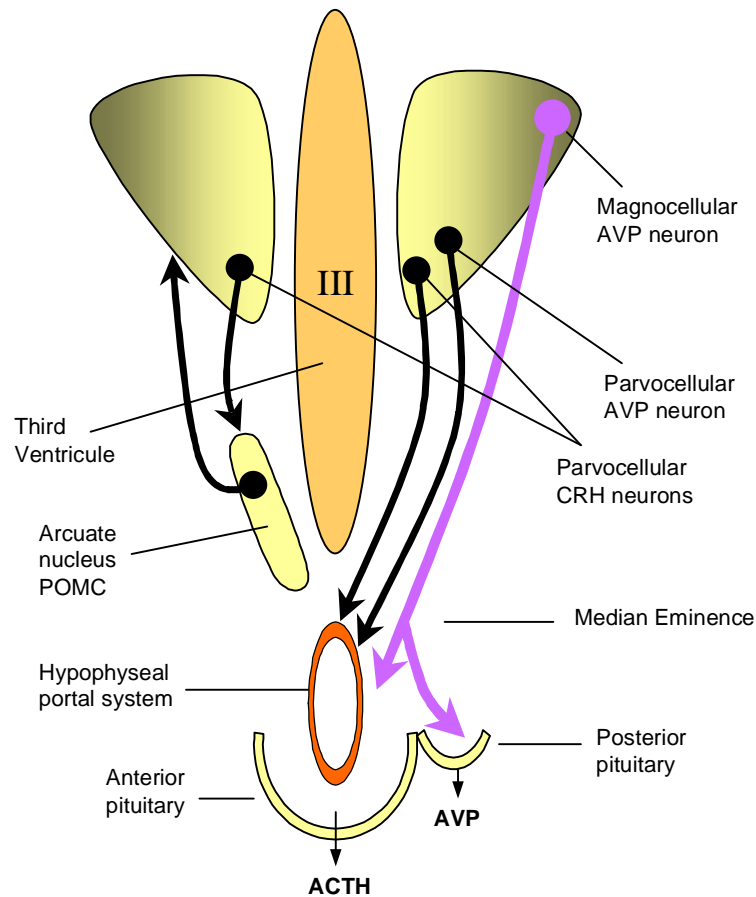


Figura 1. Núcleo paraventricular do hipotálamo. Adaptado de Bauer (1999).

A liberação do CRH pelos neurônios do núcleo paraventricular (PVN), ocorre tanto no ritmo basal como na resposta a situações de estresse. Além do CRH, outros peptídeos são liberados, os quais interagem com CRH ao nível da pituitária anterior, alterando a ação estimulatória da secreção do ACTH, particularmente vasopressina de arginina (AVP) que é co-secretada com CRH por um subconjunto de neurônios parvocelulares (Lilly e Gann, 1991).

O CRH liberado para o sistema porta hipotálamo-hipofisiário, através das ligações a receptores específicos, promove a síntese e liberação do ACTH. O ACTH, através da circulação sistêmica, atinge as adrenais, onde estimula a produção de glicocorticóides (corticosterona nos roedores e cortisol em humanos).

A atividade do eixo HPA é controlada principalmente pelos glicocorticóides, que inibem a sua própria liberação através de retroalimentação (Keller-Wood, Shinsako *et al.*, 1984). O *feedback* negativo do cortisol é mediado no CNS por receptores de dois tipos que possuem afinidades de ligação e distribuições diferentes. Os receptores de Tipo-I (mineralocorticóides) possuem alta afinidade por GC, ficando saturados mesmo através dos níveis basais de GC. São responsáveis pela resposta basal durante no ritmo circadiano, sua distribuição é limitada e relativamente alto no hipocampo (Reul, Van Den Bosch *et al.*, 1987). Os receptores do Tipo II (glicocorticóides) são de baixa afinidade por GC, a saturação destes receptores ocorre durante as fases de pico do ritmo circadiano e nas respostas ao estresse. São responsáveis por mediar a resposta ao estresse no sistema imune. Sua distribuição é mais difusa, e encontrado no hipocampo, amígdala, hipotálamo (Fuxe, Harfstrand *et al.*, 1985). Os receptores do Tipo-I podem estar envolvidos no controle da expressão basal de CRH e AVP no nadir diurno da secreção de ACTH (Dallman, Akana *et al.*, 1987) e controlam o pico de secreção do ACTH (Dallman, Darlington *et al.*, 1989). Os receptores do Tipo-II podem estar envolvidos no controle de secreção de ACTH induzido pelo estresse (Reul e De Kloet, 1985; Reul, Van Den Bosch *et al.*, 1987)

### **7.3.2. Ritmo circadiano do cortisol**

O ritmo circadiano da atividade do eixo de HPA é representado por uma onda secretória ao longo das 24 horas, formada por pulsos de liberação de CRH, ACTH e cortisol (Van Cauter, Leproult *et al.*, 1996). A liberação destes hormônios ocorre espontaneamente, com intervalos entre 1 a 2 horas e são essenciais para o seqüenciamento interno de fenômenos metabólicos e fisiológicos de funções interdependentes que se coordenam e se separam no tempo, os quais, são mediados por marca-passos centrais (Marques, 1999.). A manutenção da regularidade da ativação do eixo HPA ao longo do dia, fornece ao indivíduo, referências biológicas que lhe permite realizar suas atividades diárias (e.g sono / vigília).

No ritmo circadiano, o padrão secretório apresenta, um pico de liberação no início da manhã, que declina ao longo do dia (Kirschbaum e Hellhammer, 1994) e atinge seu ponto mais baixo (nadir) no final da noite, com níveis de cortisol quase indetectáveis (Sapolsky, 1992), seguido de uma elevação abrupta após as primeiras horas de sono (Van Cauter, Leproult *et al.*, 1996).

A regulação do ritmo circadiano está associada aos sistemas de temporização que recebem informações dos ciclos ambientais (e.g. ciclo claro / escuro) (Menna-Barreto, Isola *et al.*, 1996). A sincronização entre fatores ambientais e os ritmos endógenos são mediadas por relógios internos do SNC e pelo núcleo supraquiasmático (Marques, 1999.). O ciclo claro-escuro exerce potente papel sincronizador na espécie humana e em outros animais. Alterações nos estímulos fóticos são capazes de promover modificações na expressão dos ritmos biológicos (Marques, 1999.).

Na espécie humana, os estímulos luminosos ao final da fase clara simulam um efeito de prolongamento do dia e são capazes de provocar um atraso de fase na expressão dos ritmos biológicos. Por outro lado, estímulos fóticos ao final da fase de escuro, simulando um efeito de antecipação do amanhecer, provocam um adiantamento de fase na expressão dos ritmos biológicos (Marques, 1999.). As mudanças no fotoperíodo podem modificar a expressão da ritmicidade biológica, provocando atrasos ou avanços nos horários de início de sono, por exemplo. Isto significa que um mesmo estímulo luminoso, incidindo em diferentes momentos da fase circadiana provoca diferentes efeitos sobre o sistema de temporização.

No envelhecimento fisiológico, a ritmicidade circadiana do cortisol é mantida. Entretanto, é observado um aumento relacionado à idade dos níveis de cortisol sérico à noite no seu ponto mais baixo (nadir), paralelamente com o avanço de fase, no início da subida do cortisol circadiano (Krieger *et al.*, 1968). Devido a estas mudanças, ocorre uma redução do período inativo da secreção de cortisol e conseqüentemente um au-

mento do sinal de cortisol ao longo das 24h. O aumento relativo dos níveis de cortisol sérico à noite é responsável pelo achatamento do perfil de circadiano de cortisol observado em indivíduos idosos (Ferrari, Casarotti *et al.*, 2001).

### **7.3.3. Teoria neuroendócrina do envelhecimento**

A teoria neuroendócrina do envelhecimento foi postulada a partir do princípio de “uso e desgaste” do sistema neuroendócrino (Dilman, Revskoy *et al.*, 1986). A teoria sugere que uma rede complexa de moléculas que regulam a liberação de hormônios diretamente relacionados com o hipotálamo com o avançar da idade sofram um desgaste e a perda gradativa a sua habilidade e precisão regulatória. Isto faz com que haja um declínio na secreção de muitos hormônios e na ação efetiva nos órgãos alvos.

A consequência desta disfunção está diretamente associada com a diminuição da capacidade funcional do hipotálamo e o prejuízo na capacidade de resposta ao estresse. Sapolsky e colaboradores (Sapolsky, 1986; Sapolsky, Krey *et al.*, 1986) revisaram esta associação entre o sistema neuroendócrino e o estresse no envelhecimento e propuseram a “*Hipótese da Cascata de Glicocorticóides*”. Esta hipótese é baseada em duas considerações. Primeiramente, que a senescência diminuiria a capacidade adaptativa a fatores estressores com o avançar da idade, evidenciados por estudos que demonstraram que, as funções fisiológicas em níveis basais eram mantidas tanto em adultos jovens quanto em idosos. Entretanto, quando havia a exigência de resposta adicional a um desafio estressor, os idosos apresentavam menor adaptabilidade às mesmas. Um exemplo disto é a capacidade de termo-regulação. Neste caso, a temperatura basal é similar entre adultos e idosos, porém, em situações de temperaturas extremas (muito frio ou calor), os idosos apresentam uma maior dificuldade de adaptação.

A segunda condição postulava que o estresse crônico seria o responsável pela aceleração do processo de envelhecimento propriamente dito. Estudos realizados com

indivíduos cronicamente estressados que subsidiaram esta hipótese demonstraram que biomarcadores relacionados à idade podiam ser acelerados com o estresse como, por exemplo, a involução tímica (Bauer, 1999) , aumento dos níveis de glicocorticóides e a diminuição da concentração plasmática de DHEA e conseqüente redução da imunidade celular (Wick e Grubeck-Loebenstein, 1997; Bauer, 2005).

Baseado nestas evidências foi proposto que o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HPA) seja o sistema central, responsável pela adaptação à resposta ao estresse no envelhecimento. Os estudos experimentais realizados com ratos machos envelhecidos reforçaram tal hipótese uma vez que, níveis aumentados de glicocorticóides estavam associados a alterações degenerativas na região do hipotálamo (Sapolsky, 1985).

O aumento da liberação e secreção dos glicocorticóides promove importantes modificações no metabolismo dos carboidratos, aumento no tônus cardiovascular, alteração na cognição, inibição do crescimento e diminuição das respostas inflamatórias e imunes (Sapolsky, 1985; McEwen, Biron *et al.*, 1997a; Padgett e Glaser, 2003). Além disso, o excesso de glicocorticóides pode comprometer as respostas de adaptação em situações de estresse agudo, uma vez que aumenta a disponibilidade de energia circulante. Este mecanismo é fundamental para que haja uma resposta adaptativa do organismo ao estresse. Por outro lado, prejuízos no funcionamento, principalmente quando ocorre aumento nos níveis de glicocorticóides, pode ter conseqüências indesejáveis que podem resultar no aceleração dos processos metabólicos e subseqüentes alterações que levam ao envelhecimento do organismo. Assim, a exposição a níveis aumentados de glicocorticóides pode levar ao aumento da susceptibilidade para diversas patologias comuns no envelhecimento como: miopatias, diabetes, hipertensão, neoplasias, imunossupressão e doenças auto-imunes.

Deste modo, a teoria neuroendócrina do envelhecimento passou a ser objeto de diversos estudos. Porém apesar do crescente interesse, estudos sobre o impacto

das alterações psiconeuroendócrinas no sistema imune no envelhecimento saudável são ainda incipientes. No processo de envelhecimento são observadas inúmeras mudanças fisiológicas que promovem várias disfunções no sistema nervoso central, endócrino e imune. Para manutenção da homeostase destes sistemas no envelhecimento, são necessárias reestruturações fisiológicas, as quais nem sempre são favoráveis para saúde do idoso.

#### **7.3.4. Cortisol**

O cortisol é o principal hormônio glicocorticóide em humanos, é secretado na camada média (*zona fasciculada*) do córtex adrenal das glândulas supra-renais. Sob condições normais, o cortisol é secretado de forma pulsátil. Ocorrem aproximadamente 15 pulsos ao longo do dia, com um pico máximo de liberação pela manhã, com um declínio gradativo ao longo das 24 horas, atingindo seu ponto mais baixo (nadir) entorno da meia noite. A meia-vida do cortisol plasmático é em torno de 72 a 113 minutos (Kirschbaum, Strasburger *et al.*, 1989).

Na corrente sangüínea, cerca de 90% dos níveis de cortisol circulam ligadas as proteínas carreadoras (Kirschbaum, Strasburger *et al.*, 1989) sendo que 70 a 85% ligado a CBG – globulina transportadora de corticosteróide ou transcortina e em torno de 5 a 8% ligado a albumina. O cortisol ligado às proteínas carreadoras servem como reservatório para diminuir as rápidas flutuações das concentrações de cortisol livre, que ocorrem durante os períodos de estresse e de secreção episódica de ACTH. Apenas 5 a 10% do cortisol circulam de forma livre, não ligada (considerada a fração biologicamente ativa) (Kahn, J., Rubinow, D. *et al.*, 1988). Os níveis de cortisol livre representam o grau de exposição dos órgãos e os tecidos a este esteróide.

A determinação dos níveis de cortisol livre salivar tem sido uma ferramenta eficiente e muito utilizada nos estudos que objetivam a investigação da função do eixo HPA, devido as suas características e as condições de coleta. O cortisol é um hormô-

nio esteróide lipofílico que permite que este seja levado a saliva por difusão passiva, sem interferência do fluxo salivar. A coleta para determinação do cortisol livre salivar é um procedimento simples, não invasivo, livre do estresse da venopunção e que permite várias tomadas em diferentes tempos, necessários para avaliação do ritmo circadiano, cujo uso em pesquisas datam de 1986. Esta técnica tem sido proposta como método preditivo de sucesso na avaliação de doenças como a Doença de Cushing (Trilck, Flitsch *et al.*, 2005).

Existem evidências que o envelhecimento humano está associado com uma ativação do eixo HPA (Halbreich, U., Asnis, G. *et al.*, 1984; Van Cauter, Leproult *et al.*, 1996; Deuschle, Gotthardt *et al.*, 1997; Seeman, Singer *et al.*, 2001), elevando os níveis periféricos de cortisol. Contudo, não sabemos se a ativação do eixo HPA é uma característica do envelhecimento saudável ou é decorrente de patologias frequentemente observadas na terceira idade. Nesse sentido, níveis aumentados de cortisol foram descritos em pacientes idosos com osteoporose (Mancini, Doga *et al.*, 2005), depressão (Kalmijn, Launer *et al.*, 1998) ou demência (Maeda, Tanimoto *et al.*, 1991). Contudo, existem estudos na literatura que não observaram tais alterações nos níveis de cortisol durante o envelhecimento saudável (Waltman, Blackman *et al.*, 1991; Raff, Raff *et al.*, 1999; Kudielka, Schmidt-Reinwald *et al.*, 2000; Martinez-Taboada, Bartolome, Amado, Blanco, Garcia-Unzueta *et al.*, 2002).

### **7.3.5. Dehidroepiandrosterona (DHEA)**

Dehidroepiandrosterona (DHEA) e seu éster de sulfato (DHEAS) são hormônios mais abundantes da esteroidogênese adrenal nos humanos e de alguns primatas não-humanos (Ebeling P, 1994). As células da zona reticulada do córtex adrenal são as responsáveis pela síntese dos andrógenos precursores dos hormônios DHEA e DHEAS (Hornsby, 1997; Hornsby, 2000). Além de sua origem adrenal, o DHEA também é produzido em pequenas quantidades (10-20%) pelas gônadas (Nieschlag E.,



1973). Cerca de 98% do DHEA circulante na corrente sangüínea é ligado essencialmente à albumina e apenas 1 a 2% estão na forma livre, ou seja, biologicamente ativos.

A secreção de DHEA está sob controle do eixo HPA, sendo dessa forma, estimulada pela secreção de ACTH. Embora a concentração de DHEA no sangue oscile em paralelo com os níveis de cortisol, este hormônio parece não sofrer controle de feedback a nível do eixo HPA (Beishuizen A., 2002). O DHEA obedece um ritmo de circadiano e tem uma meia-vida curta (30 minutos ou menos), enquanto a sua forma sulfatada tem uma meia-vida biológica mais longa (7-10 h) (Sjoberg B, 1979; Belisle S, 1980; Bird C.E., 1984; Haning Jr. R.V., 1989; Longcope, 1996).

A liberação de DHEA exibe um padrão característico ao longo da vida, com uma onda secretória durante o período pré-puberal (adrenarca), alcançando o máximo entre os 25-35 anos, seguido por um declínio contínuo com o avançar da idade (adrenopausa) (Orentreich, Brind *et al.*, 1984; Belanger A, 1994). No envelhecimento, a produção de DHEA é apenas 10 a 20% do DHEA produzido quando jovens (17- 25 anos) (Orentreich, Brind *et al.*, 1992). Várias hipóteses procuraram explicar a dissociação que ocorre entre a secreção de cortisol e DHEA pelas adrenais, no envelhecimento. Porém, tal dissociação também é observada em várias condições médicas, por exemplo, queimados (Parker, Levin *et al.*, 1985), doença grave (Parker, Levin *et al.*, 1985; Wade, Lindberg *et al.*, 1988), anorexia nervosa (Winterer, Gwirtsman *et al.*, 1985) e na doença de Cushing (Cunningham e Mckenna, 1994). Estudos realizados em indivíduos idosos que observaram a diminuição dos níveis de DHEA (mas não de cortisol) após o estímulo com ACTH ou CRH (Pavlov E.P., 1986; Liu, Laughlin *et al.*, 1990) sugerem que o declínio de DHEA estejam associadas a alterações a nível das adrenais. Estas alterações podem incluir uma redução do número de células funcionais da zona reticulada na camada medular do córtex adrenal (Effros, 2001), uma redução na sensibilidade

de a ACTH por parte destas células (Castle, Wilkins *et al.*, 1995), uma alteração nas características do córtex adrenal (Kirschbaum, 1994 ) ou uma diminuição da atividade da enzima 17,20-desmolase (Liu, 1990 ).

Alterações nos níveis de DHEA são particularmente importantes no envelhecimento, uma vez que estudos demonstraram que DHEA antagoniza vários efeitos biológicos dos GC *in vivo* (Bauer, 1999) (Svec, 1998) inclusive protegendo os neurônios dos efeitos neurotóxicos deste esteróide. O fato do cortisol não ter a sua liberação suprimida pela idade, faz com que o ambiente neural fique mais exposto ao cortisol sem a ação moderadora do DHEA, uma vez que este sofre uma drástica redução com o envelhecimento. Isto poderia causar o surgimento de deficiências cognitivas, depressão, ansiedade e estresse (Herbert, 1997)

O DHEA também parece atuar como imunomodulador potente (Ebeling P,1994 ) no restabelecendo das funções das células imunes e na diminuição a suscetibilidade para a infecção (Oberbeck R, 2001). Contudo, os mecanismos de ação do DHEA e suas ações orgânicas específicas ainda não foram totalmente estabelecidos, não tendo sido identificado um receptor celular específico. Seu comportamento fisiológico é o de um andrógeno de ação fraca e que, provavelmente, usa o receptor de estrógenos para suas ações (Wolf e Kirschbaum, 1999).

### **7.3.6. Hormônio do crescimento (GH)**

A somatossenescência é representada por uma diminuição significativa dos níveis de hormônio de crescimento (hGH) bem como nos níveis circulantes de IGF-1 e IGFBP-3 (Rudman, 1985). A deficiência de hGH parece estar associada com a redução na síntese de proteínas, diminuição da massa magra, redução da massa mineral óssea e aumento percentual da gordura corporal (Rudman, 1985). Porém ainda não compreendemos até que ponto estas mudanças relacionadas à idade nos níveis de

GH/IGF-1 contribuem para as alterações na composição e função do corpo (e.g. resposta imune).

O GH é um polipeptídeo com cadeia de 191 aminoácidos produzido pelas células somatotróficas da hipófise anterior. Além de sua importância no crescimento linear em crianças, o GH também é um hormônio de anabólico importante de efeitos estimulatórios na síntese de proteínas (especialmente no fígado, baço, rim, timo) e na lipólise (Rudman, 1985). Sua secreção é pulsátil e controlada por dois peptídeos hipotalâmicos: GHRH (*GH-releasing hormone*) e somatostatina, os quais, respectivamente, estimulam e inibem sua liberação. A ação do GH pode ser tanto direta, através do acoplamento com um receptor de superfície com ativação da proteína G, quanto, via IGF-1 (Kelijman, 1991).

O declínio do eixo GH / IGF-1 no envelhecimento pode ser atribuído a diversos mecanismos potenciais como: redução na secreção de GHRH e / ou Grelina, aumento no tônus somatostatinérgico, redução na resposta hipofisária ao GHRH ou a Grelina, ou aumento da sensibilidade ao *feedback* negativo do IGF-1 (Ho, Evans *et al.*, 1987; Arvat E, 1994). Embora o padrão secretório do GH no envelhecimento seja similar ao do jovem, a amplitude dos pulsos de liberação de GH é dramaticamente reduzida (Ho, Evans *et al.*, 1987), ocorrendo também uma redução progressiva na liberação de GH induzida pelo sono (Ho, Evans *et al.*, 1987).

Os idosos podem apresentar um quadro clínico que lembra o déficit de GH com aumento de tecido adiposo abdominal, diminuição da força muscular e piora da cognição (Iranmanesh, Lizarralde *et al.*, 1991). Estudos revelam que adultos com déficit de GH, quando comparados com indivíduos saudáveis, mostram espessamento na camada interna dos vasos e o aumento na formação da placa ateromatosa, sugerindo uma acelerada taxa de aterogênese (Svensson J, 1997). Porém, estudos recentes têm demonstrado que indivíduos idosos com GH basal elevado podem apresentar menor

expectativa de vida, semelhante ao que ocorre na acromegalia, apresentando como causa da mortalidade por doenças cardiovasculares e neoplásicas (Maison P, 1998).

A ação do GH no sistema nervoso central é evidenciada, particularmente, em duas evidências: o GH atravessa a barreira cerebral (Shetty Kr, 1995) e apresenta sítios de ligação em áreas do córtex cerebral, hipocampo, hipotálamo, putâmen e plexo coróide. O hipocampo é uma estrutura importante que tem papel essencial em múltiplos processos cognitivos, principalmente aprendizado e memória. A redução de sítios de ligação para o GH associada ao envelhecimento pode contribuir para o declínio da função cognitiva e psicológica, incluindo quadros depressivos (Soares Cn, 1999).

Apesar de significativas, as alterações fisiológicas e cognitivas que ocorrem no envelhecimento associada ao déficit do eixo GH/IGF-1, alguns indivíduos idosos apresentam níveis normais de GH (Lissett, Thompson *et al.*, 1999). Tal evidência pode estar associada ao fato que, em humanos, a produção e secreção de GH não são exclusivamente realizadas pela glândula pituitária (Baumann, 1991) e que linfócitos humanos são capazes de produzir a maioria dos hormônios peptídeos (Blalock, 1990).

Hattori e colaboradores demonstraram que células mononucleares podem secretar GH, tanto espontaneamente (Hattori, Ikekubo *et al.*, 1994) como quando estimuladas por mitógenos (Hattori, Shimomura *et al.*, 1993) e que GH secretado por linfócitos é semelhante ao GH pituitário em termos de antigenicidade, peso molecular (Weigent, Baxter *et al.*, 1988) e atividade biológica (Hattori, Shimatsu *et al.*, 1990; Varma, Sabharwal *et al.*, 1993). Contudo, pouco sabemos sobre o papel do GH imunorreativo sobre a fisiopatologia do sistema imune. Estudos prévios demonstraram que o sistema imune é capaz de secretar níveis significativos de GH (Weigent, Baxter *et al.*, 1988; Varma, Sabharwal *et al.*, 1993; Hattori, Ikekubo *et al.*, 1994), principalmente quando indivíduos humanos são acometidos de doenças virais, antígenos e tumores. Estas evidências podem indicar que o GH imunorreativo possa ter efeito inibitório à

ação dos glicocorticóides e isto pode ser clinicamente significativo na resposta inflamatória.

### **7.3.7. Resistência adquirida a glicocorticóides**

A mensuração dos níveis periféricos determinados hormônios não é suficiente para determinar a função destes hormônios nos tecidos. Basicamente, o efeito de qualquer hormônio numa célula-alvo depende da concentração do hormônio, da potência do hormônio e da capacidade da célula em receber e transduzir o sinal (Rohleder, Wolf *et al.*, 2003). A sensibilidade a GCs varia nos diferentes tecidos do próprio organismo. Dessa forma, alguns tecidos podem se apresentar sensíveis aos GCs em comparação a outros tecidos que apresentam refratariedade. Dessa forma, diferentes métodos foram desenvolvidos para investigação da sensibilidade celular GCs. Por exemplo, pode-se avaliar a sensibilidade central a GCs, através da avaliação da capacidade de feedback negativo do eixo HPA (Bauer, Papadopoulos *et al.*, 2002). Nesta avaliação, os glicocorticóides sintéticos (e.g. DEX) são administrados *in vivo* e avalia-se a capacidade de supressão da produção endógena de cortisol. Além disso, pode-se avaliar a sensibilidade da pele a GCs, através da aplicação tópica de GCs sintéticos e mensuração do halo de vasoconstrição produzido (Ebrecht, Buske-Kirschbaum *et al.*, 2000). Por último, pode-se avaliar a sensibilidade dos linfócitos ou monócitos periféricos a GCs *in vitro* (Bauer, M., Vedhara, K. *et al.*, 2000; Bauer, Papadopoulos *et al.*, 2003) (Rohleder, Joksimovic *et al.*, 2004). Nesses ensaios, normalmente é avaliada a capacidade dos GCs em suprimir funções imunológicas como proliferação linfocitária e produção de citocinas.

Alguns estudos demonstraram estas alterações da sensibilidade aos GCs durante a ontogenia humana. Um estudo realizado em bebês recém-nascidos (Kavelaars, Zijlstra *et al.*, 1995) mostrou que, células T do cordão umbilical apresentam uma alta sensibilidade para inibição da resposta proliferativa para DEX nas duas primeiras se-

manas após o nascimento, seguida de uma redução gradual da proliferação celular, atingindo o padrão de resposta de adultos, em torno de 1 ano de idade. De forma, interessante, o aumento da sensibilidade do sistema imune nos recém-nascidos, ocorre quando níveis de cortisol endógenos, para esta faixa de idade, são muito baixos. As evidências deste estudo sugerem que, o aumento da sensibilidade para GCs possa ser um mecanismo compensatório, uma vez que a função regulatória dos GCs é mantida, apesar dos baixos níveis de cortisol circulantes. No envelhecimento foram observadas alterações na sensibilidade periférica a GCs. Entretanto, estes estudos foram realizados em indivíduos em estresse crônico (Bauer, M., Vedhara, K. *et al.*, 2000) e depressão (Bauer, Papadopoulos *et al.*, 2003), onde foi observada uma refratariedade linfocitária a GCs, porém, nenhum estudo ainda analisou sensibilidade linfocitária a GCs no envelhecimento saudável.

#### **7.4. ALTERAÇÕES IMUNOLÓGICAS NO ENVELHECIMENTO**

O sistema imune se altera substancialmente ao longo do envelhecimento (imunossenescência). Estas mudanças são complexas e incluem diminuição quantitativa de alguns marcadores imunológicos, alterações qualitativas na resposta imune e exacerbção de alguns eventos imunes específicos. Deste modo, podemos entender a imunossenescência como uma reestruturação ou remodelação de processos imunológicos ao longo da vida. A imunossenescência está associada ao aumento da incidência de infecções, doenças crônico-inflamatórias, cardiovasculares e câncer – principais causas que contribuem para a morbidade e mortalidade do idoso.

Gómez e colaboradores (Gomez, Boehmer *et al.*, 2005) realizaram recentemente uma revisão sobre o envelhecimento do sistema imune inato e destacam os seguintes aspectos: perda da capacidade fagocitária, redução do tráfego de células dendríticas e aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias (vide Tabela 1). Em relação a esta última, várias evidências sugerem que os idosos apresentam um estado crônico

inflamatório conhecido como “inflamação do envelhecimento” (*inflammaging*) (Ginaldi, Di Benedetto *et al.*, 2005). Este estado é reconhecido pelo aumento de diversos mediadores inflamatórios como as citocinas IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , prostaglandina E2 e mediadores anti-inflamatórios como o receptor antagonista da IL-1 (IL-1RA), o receptor solúvel de TNF e outras proteínas de fase aguda como a proteína C reativa e a proteína sérica amilóide A. Alguns estudos longitudinais sugerem que muitos destes mediadores são preditores de mortalidade no idoso (Kiecolt-Glaser, Preacher *et al.*, 2003) – sobre IL-6 e cuidadores publicado no PNAS).

**Tabela 1. Efeitos do envelhecimento sobre células do sistema imune inato.** Fonte Gómez et al. (2005).

<b>Tipo Celular</b>	<b>Principais mudanças associadas ao envelhecimento</b>
Neutrófilos	Não muda o número de células Diminuição moderada na fagocitose Diminuição na quimiotaxia Diminuição na produção das seguintes moléculas: p38, ERK MAPK e no influxo de cálcio Aumento na fluidez da membrana celular Aumento no conteúdo fosfolípido Não foram observadas mudanças nos níveis de receptores f-MLP. Aumento moderado na expressão do TLR4 Diminuição moderada na expressão do TLR2
Monócitos /Macrófagos	Não muda o número de células nos seres humanos Diminuição da fagocitose Diminuição da quimiotaxia Diminuição na expressão das moléculas do MHC classe II, p38, ERK MAPK, JAK/STAT Produção de muitas citocinas e quimiocinas diminuídas em humanos Aumento na produção de prostaglandina E2
Células NK	Aumento no número de células com a idade Diminuição moderada na citotoxicidade Diminuição na resposta proliferativa ao IL-2 Diminuição no fluxo do cálcio Diminuição na produção da IFN- $\gamma$
Células NKT	Aumento no número de células com a idade Diminuição na produção da IFN- $\gamma$ Diminuição na produção de quimiocinas

Além disso, existem mudanças no sistema imune adquirido ou adaptativo que ocorrem ao longo do envelhecimento. Essas mudanças incluem a diminuição da proliferação de células T e B, diminuição do número das células T virgens (*naïve*), aumento da degeneração de células B, aumento das células T de memória e aumento das respostas das células T *helper 2* (Th2) (Pawelec, Ouyang *et al.*, 2002). Além disso, a expressão de moléculas de superfície importantes para a cooperação intercelular, como B7-2, CD28 e HLA classe II, estão reduzidas no idoso (Straub, Cutolo *et al.*, 2001) .



De um modo geral, os estudos demonstraram que a redução da resposta imune celular no envelhecimento está fortemente associada com disfunções das células T (Pawelec, Effros *et al.*, 1999) . A capacidade de expansão clonal, que é a consequência final da ativação de células T durante uma resposta imune, encontra-se reduzida no idoso. Mudanças na capacidade de proliferação refletem uma perda importante da resposta imune adaptativa. Esta alteração parece estar associada com uma diminuição na produção de IL-2 (Gillis, Mertelsmann *et al.*, 1981), essencial para a divisão de células T. Por tal motivo, uma revisão mais aprofundada sobre células T e envelhecimento se torna imprescindível.

#### **7.4.1. Células T**

Uma recente revisão sobre o desenvolvimento das células T e a diversidade de receptores ao longo do desenvolvimento foi feita por Goronzy et al 2005 (Goronzy e Weyand, 2005). Estes autores comentam que a diversidade do repertório clonal de células T é uma das características definidoras do sistema adaptativo imune. Este paradigma tem a diversidade como pré-requisito para gerar respostas imunes a um grande universo de antígenos. Diversos estudos têm demonstrado que a geração de receptores de células T depende, em grande parte, da produção de novas células T no timo. A involução tímica é uma característica crítica no envelhecimento imune e que não é dependente somente de processos degenerativo que ocorrem neste órgão, mas também de um processo ativo e controlado por mecanismos que estão somente agora sendo elucidados. De qualquer forma, é claro que a involução tímica é considerada como um dos principais mecanismos subjacentes da imunossenescência. Contudo, ainda que isto pareça ser intuitivamente lógico, não está claro se a atividade tímica seria necessária na manutenção de um grande conjunto de células T altamente diversas que existe no organismo.

Entretanto, várias evidências sugerem que o envelhecimento está associado com alterações de subpopulações de células T periféricas (Pawelec, Barnett *et al.*, 2002b). Pesquisas em modelos animais têm mostrado uma relativa diminuição das células CD4 no sangue periférico em comparação com as células CD8 de ratos envelhecidos (Miller, 1997). Além disso, vários estudos relataram uma diminuição de células T periféricas com fenótipo CD45RA+ (naïve) com um respectivo acúmulo de células T de memória (CD45RO+) (Hannet, Erkeller-Yuksel *et al.*, 1992; Gabriel, Schmitt *et al.*, 1993). Esta mudança foi também observada em idosos saudáveis e independentemente do estado de saúde ou do estado nutricional (Mazari e Lesourd, 1998). A diminuição das células naïve (virgens) pode ocorrer devido à involução do timo, acarretando num acúmulo das células T de memória. Essa alteração pode estar associada com a reduzida resposta imune celular observada no envelhecimento. Em camundongos, por exemplo, o acúmulo de células T de memória foi associado com a redução na proliferação linfocitária induzida por mitógenos (Lerner, Yamada *et al.*, 1989) e pode contribuir para a redução da resposta imune *in vivo* contra novos antígenos. Entretanto, os mecanismos fisiológicos que regulam a proporção de células naïve / memória no envelhecimento ainda não são bem conhecidos.

Em síntese pode ser dito que a manutenção da homeostasia das células T ao longo do envelhecimento envolve dois desafios (Pawelec, Wagner *et al.*, 1999): (1) a manutenção no tamanho do compartimento, em que ocorre o influxo de novas células T e a expansão proliferativa de células T senescentes; (2) a geração da diversidade que pode ser acompanhada exclusivamente pela geração de novos rearranjos do receptor das células T no próprio timo. Provavelmente a falha nestes dois processos está relacionada com o mecanismo de contração do sistema imune adaptativo ao longo do envelhecimento.

### **7.4.2. Proliferação celular**

Uma das formas mais utilizadas de se avaliar a capacidade de expansão clonal e a sua capacidade funcional é através do ensaio de proliferação linfocitária. No ensaio de proliferação *in vitro* de linfócitos induzidos por mitógenos, os linfócitos do sangue periférico exibem propriedades semelhantes de quando os linfócitos *in vivo* reconhecerem peptídeos antigênicos, estimulando as células a proliferarem.

No conceito inicial da seleção de clonal da imunidade adaptativa, proposta por Burnet (Burnet, 1959) assume que, clones de linfócitos produzidos por casualidade reconhecem um antígeno, sofrem divisão e produzem anticorpos. Assim, a expansão clonal aumenta a resposta imune a um antígeno em particular. Em contraste, o estímulo antigênico específico, os mitógenos são considerados ativadores de linfócitos policlonais que estimulam clones de múltiplos linfócitos. A transformação morfológica de linfócitos pequenos em células maiores (i.e. linfoblastos) após o estímulo com mitógenos está associada com aumento da síntese de DNA e da divisão celular. Neste estudo, nós nos baseamos nesta propriedade para avaliar a proliferação celular.

Históricamente, um dos primeiros mitógenos descritos foi a fitohemaglutinina (PHA), extraída de *Phaseolus vulgaris* (feijão vermelho) (Nowell, 1960). Depois disso, foram descritos várias lectinas mitogênicas, como a concanavalina A (ConA) e “*pokeweed mitogen*” (PWM). Estes mitógenos são frequentemente utilizados em imunoenaios, e estão altamente correlacionadas as respostas proliferativas para estes mitógenos. Para isto foi demonstrados que a PHA e a ConA são mitógenos de células T e PWM, estimula as células B. Linfócitos estimulados por mitógenos apresentam várias atividades funcionais que são semelhantes a células estimuladas por antígenos, incluindo a secreção de imunoglobulinas, produção de citocinas (IFN- $\gamma$  e IL-2) por células T e um estímulo com células T citotóxicas (Abbas, 2005) - (todas podem ser medidas nos sobrenadantes das culturas de células estimuladas).

Uma importante alteração observada nas células T de idosos é redução da capacidade da expansão clonal. Estudos com modelos experimentais e humanos demonstraram de que a proliferação de células T está significativamente diminuída no envelhecimento – medidas realizadas *in vitro* através de culturas estimuladas com mitógenos (Murasko et al., 1987; Cheung et al., 1983) ou *in vivo* em respostas de hipersensibilidade tardias (DTH) (Vissinga, Hertogh-Huijbregts *et al.*, 1990). Contudo, não sabemos o papel das variáveis psiconeuroendócrinas nesta função no envelhecimento, já que o estresse crônico e a terapia crônica com GCs produzem a mesma alteração.

### **7.4.3. Citocinas**

As fases efetoras de imunidade natural e específica são mediadas, em grande parte, através de citocinas. As citocinas são moléculas de baixo peso molecular produzidas por leucócitos, neurônios e células endoteliais. A expressão da maioria das citocinas é estritamente regulada. Em geral, não se detecta uma produção significativa destas moléculas circulantes, sendo necessária uma ativação celular para que se produzam citocinas em quantidades suficientes para exercer seus efeitos biológicos. Em geral, as citocinas possuem uma vida média muito curta e atuam em baixas concentrações, da ordem de picogramas.

As citocinas exercem um efeito autócrino quando se unem a receptores presentes na própria célula produtora (ex. IL-2). Também podem ter um efeito parácrino, atuando sobre diferentes tipos celulares que se encontram em sua vizinhança (ex. IFN- $\gamma$ ). Em alguns casos podem liberar-se à circulação sanguínea ou linfática, exercendo seu efeito em outros órgãos e tecidos, atuando como os hormônios, de forma endócrina (ex. TNF- $\alpha$  e IL-6).

Diferentes são as ações e funções atribuídas para as citocinas, como, por exemplo, promover crescimento e diferenciação de várias populações de linfócitos (IL-

2), ativação e regulação de células inflamatórias (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), regulação da hematopoiese (IL-3), regulação de leucócitos de tráfico (quimiocinas) e mediar interações complexas entre os sistemas imune e endócrino (IL-1, IL-6, e TNF- $\alpha$ ).

Em especial, para esta tese, torna-se necessário revisar alguns aspectos funcionais das citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias. As citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 bem como o TNF- $\alpha$ ) são importantes no início da resposta imune inata. A ação principal das citocinas pró-inflamatórias é de atrair leucócitos para o local do trauma ou infecção, ativando-as para a eliminação do agente agressor. Secundariamente, atuam promovendo mudanças fisiológicas que promovem a inflamação, tais como alterações no metabolismo e o controle da temperatura corporal. As citocinas antiinflamatórias (IL-4, IL-10 e IL-13) refreiam a resposta imunológica, causando a diminuição na função celular e queda na síntese de outras citocinas (ex. IL-2 e IFN- $\gamma$ ). Os mecanismos associados à inflamação são críticos para a resolução de infecções e reparo de tecidos danificados. Entretanto, a recorrência de infecções ou a manutenção de processos inflamatórios pode estimular o sistema imune de forma persistente, aumentando o risco de ocorrências de diversas doenças associadas ao declínio das funções físicas, principalmente em indivíduos idosos (Kiecolt-Glaser e Glaser, 2002).

Nesta tese, estudamos as citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-6 envolvidas nos estados ativados dos sistemas imune e endócrino e o receptor da IL-2R, associado com o processo de ativação dos linfócitos T. A seguir segue uma pequena revisão sobre esses mediadores e suas respectivas alterações no envelhecimento.

#### **7.4.4. TNF- $\alpha$**

Em geral, o envelhecimento está associado com níveis séricos e celulares aumentados de TNF- $\alpha$  (Fagiolo, Cossarizza *et al.*, 1993). Essa alteração faz parte do

conjunto de mudanças compreendidas como *inflammaging* (revisado anteriormente). No entanto, não sabemos se esta alteração é uma característica do envelhecimento ou está relacionada com patologias observadas na terceira idade. Nesse sentido, torna-se importante salientar que os níveis séricos de TNF- $\alpha$  estão também elevados na sepsis, doenças auto-imunes e várias doenças infecciosas.

O TNF- $\alpha$  é o principal mediador da resposta imune contra bactérias gram-negativas (Abbas, 2005). Sua produção, quando induzida por LPS, está relacionada a várias manifestações tóxicas das infecções, doenças auto-imunes e neoplasias. O TNF- $\alpha$  é produzido principalmente por macrófagos. Dois tipos de receptores específicos de TNF podem ser identificados: o tipo TNFR- $\alpha$ , uma glicoproteína, com um peso molecular aproximadamente 75 kDa (Dembic, Loetscher *et al.*, 1990) e o tipo TNFR- $\beta$ , com peso molecular de 55 kDa (Schall, Bacon *et al.*, 1990). Potencialmente todos os tipos de células apresentam a presença de um ou ambos tipos destes receptores.

O TNF- $\alpha$  é o mediador da resposta imune inespecífica e específica e é um importante elo entre a resposta imune específica e a inflamação aguda. Uma das principais ações biológicas do TNF- $\alpha$  é aumentar a permeabilidade vascular. Além disso, o TNF- $\alpha$  promove o aumento da adesão e da ativação dos leucócitos (Plata-Salaman, 1991); aumenta a toxicidade dos eosinófilos; atua com quimiocina para monócitos; promove a maturação dos tímócitos e induz a liberação de outras citocinas pró-inflamatórias como, por exemplo, IL-1 e IL-6 (Abbas, 2005).

A ação biológica do TNF- $\alpha$  é, em grande parte, dose dependente. Em baixas concentrações (i.e. 1 nM), o TNF- $\alpha$  age de forma parácrina e como regulador autócrino de leucócitos e células endoteliais. Os efeitos sistêmicos de TNF- $\alpha$  são relacionados a sua capacidade de induzir macrófagos e linfócitos a liberar IL-1 e age também nos hepatócitos para induzir as proteínas de fase aguda (APP). A administração sistêmica prolongada de TNF- $\alpha$  em animais promove alterações metabólicas de caquexia (i.e.

característico da perda muscular e de células adiposas). Em grandes quantidades (i.e. 100 nM), esta citocina pode induzir o choque séptico que leva a morte por colapso circulatório e coagulação intravascular disseminada (Abbas, 2005).

É importante salientar que o TNF- $\alpha$  também pode interagir com o sistema neuroendócrino e estimular a secreção de CRH pelo hipotálamo e secreção de prolactina da glândula pituitária (Bateman, Singh *et al.*, 1989). O eixo de HPA tem um papel regulador importante neste processo, limitando a liberação de citocinas pró-inflamatórias através da secreção de glicocorticóides. Estudos prévios demonstraram que o choque com endotoxinas pode ser fatal, se adrenais forem retiradas (Ramachandra, Sehon *et al.*, 1992) , sugerindo então que os esteróides são importantes para sobrevivência no desafio inflamatório.

#### **7.4.5. IL-6**

O envelhecimento também está associado com níveis séricos aumentados de IL-6 (Straub, Westermann *et al.*, 1998). A elevação de IL-6, bem como TNF- $\alpha$ , faz parte do conjunto de mudanças compreendidas como *inflammaging* (revisado anteriormente).

A IL-6 é um mediador do sistema imune o qual inclui uma grande variedade de ações biológicas, incluindo febre, produção de proteínas de fase aguda pelo fígado e ativação de linfócitos (Abbas, 2005). Varias células são capazes de sintetizar a IL-6, incluindo macrófagos, fibroblastos, células endoteliais, queratócitos, células T e várias linhagens de células tumorais. Tanto *in vivo* como *in vitro*, a IL-6 atua como um fator de diferenciação para as células B e fator de ativação para as células T. Na presença da IL-2, dá-se a diferenciação das células T em células T citotóxicas e induz a proliferação de timócitos. Após a estimulação com a IL-4, o estímulo com a IL-6 é necessário para as células B se diferenciarem em células plasmáticas secretoras de IgG. Níveis eleva-

dos de IL-6 de soro ou plasma podem ocorrer em diferentes doenças, incluindo septicemia, doenças autoimunes, linfomas, AIDS, doença hepática por alcoolismo e doenças infecciosas.

#### **7.4.6. sIL-2R**

O receptor solúvel da interleucina 2 (sIL-2R) desempenha um papel importante na regulação da resposta imune. As ligações de IL-2 ao seu receptor (IL-2R) na superfície dos linfócitos T, desencadeiam uma série de eventos de sinalização intracelulares que resultam na ativação e proliferação das células T. O IL-2R é secretado ao longo do processo de ativação da célula T, para limitar a ativação da célula T através da redução dos níveis locais de IL-2.

No envelhecimento ocorre uma diminuição da liberação da IL-2 e do seu receptor solúvel, o sIL-2R por linfócitos T, em culturas *in vitro* (Sindermann, Kruse *et al.*, 1993); (Cakman, Rohwer *et al.*, 1996). Entretanto, a expressão IL-2R na superfície das células parece ser normal (Rink, Cakman *et al.*, 1998). As mudanças na liberação de IL-2R que ocorrem no envelhecimento estão associadas a alterações que ocorrem tanto em sua magnitude, bem como na sua cinética.

Em culturas, células T de indivíduos jovens saudáveis produzem quantidades mais altas de sIL-2R (Sindermann, Kruse *et al.*, 1993); (Cakman, Rohwer *et al.*, 1996) e apresentam uma liberação mais rápida e prolongada do receptor solúvel, quando comparada com as células T de indivíduos idosos. Nos indivíduos jovens, a liberação de sIL-2R aumenta durante os primeiros 7 dias de cultura e que em indivíduos idosos, o pico ocorre depois de 4 dias, diminuindo, ao longo do tempo restante de cultivo. Apesar das diferenças na liberação sIL-2R entre idosos e jovens, foi descrito que, a expressão do IL-2R era semelhante entre indivíduos idosos e jovens (Cakman, Rohwer *et al.*, 1996) ou aumentada no idoso (Huang, Pechere *et al.*, 1992; Born, Uthgenannt *et al.*, 1995).



Estudos com idosos SENIEUR (Huang, Pechere *et al.*, 1992) demonstraram que idosos que apresentavam uma diminuição significativa da produção *in vitro* de IL-2, tinham níveis aumentados de IL-2R no soro. Clinicamente, nível sérico aumentado de IL-2R é um marcador de estímulo antigênico forte (Abbas, Murphy *et al.*, 1996) e estão correlacionados incidência de doenças infecciosas e o aumento de neoplasias (Ford, 1986) (Saltzman e Peterson, 1987). Estes dados sugerem que a diminuição dos níveis de sIL-2R *in vitro* representa as alterações funcionais das células T no envelhecimento e que níveis de IL-2R séricos podem representar uma ferramenta importante para investigação de doenças orgânicas no envelhecimento.

## **7.5. INTERAÇÕES PSICONEUROIMUNOENDÓCRINAS**

O sistema nervoso pode modular o sistema imune através de uma comunicação bi-direcional entre os sistemas (Blalock, 1994), formando uma rede complexa de interações, onde neurotransmissores e hormônios regulam o sistema imune assim como as citocinas regulam o sistema nervoso. Essa troca mútua de mediadores químicos é indispensável para manter a homeostase do organismo e sua alteração já foi implicada em inúmeras patologias associadas ao estresse, incluindo o câncer.

O mecanismo de comunicação entre os sistemas nervoso e imune ocorre por três vias principais: o sistema nervoso autônomo (SNA), comunicação vagal e através do eixo HPA. A principal via de regulação imunológica durante o estresse é a ativação do eixo HPA, com conseqüente elevação dos níveis periféricos de cortisol. O cortisol liga-se aos receptores de membrana e citoplasmáticos nos leucócitos ocasionando, na maioria dos casos, uma imunossupressão. Embora os receptores de esteróides do tipo I (mineralocorticóides) possuem uma elevada afinidade para os GCs circulantes que os receptores do tipo II, quase todos os efeitos dos GCs no sistema imune são mediados via receptores adrenais do tipo II (glicocorticóides)(Mcewen, Biron *et al.*, 1997a). Essa imunossupressão pode ser caracterizada por alterações, tais como diminuição na con-

tagem de linfócitos e aumento de neutrófilos e mudanças funcionais. Estas últimas incluem diminuição da proliferação de linfócitos, atividade *Natural Killer* (NK) e produção de citocinas.

Uma segunda via de comunicação neuroimunoendócrina é através da liberação de catecolaminas da medula adrenal ou terminações nervosas do sistema nervoso autônomo (Figura 2). De fato, já foi demonstrado que os principais órgãos imunes (timo, baço e linfonódos) são abundantemente inervados por fibras nervosas autônomas e linfócitos possuem receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Felten, 1993). Inúmeras células do sistema imune também apresentam receptores adrenérgicos, tais como os linfócitos T e B, neutrófilos, monócitos e células NK (Madden, Sanders *et al.*, 1995). Entretanto, várias populações linfocitárias apresentam diferentes graus de sensibilidades à estimulação  $\beta$ -adrenérgica. A adrenalina e a noradrenalina circulantes inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como: IL-2 TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Além disso, adrenalina e a noradrenalina estimulam a produção de citocinas antiinflamatórias, tais como: IL-10 e o TGF- $\beta$ .

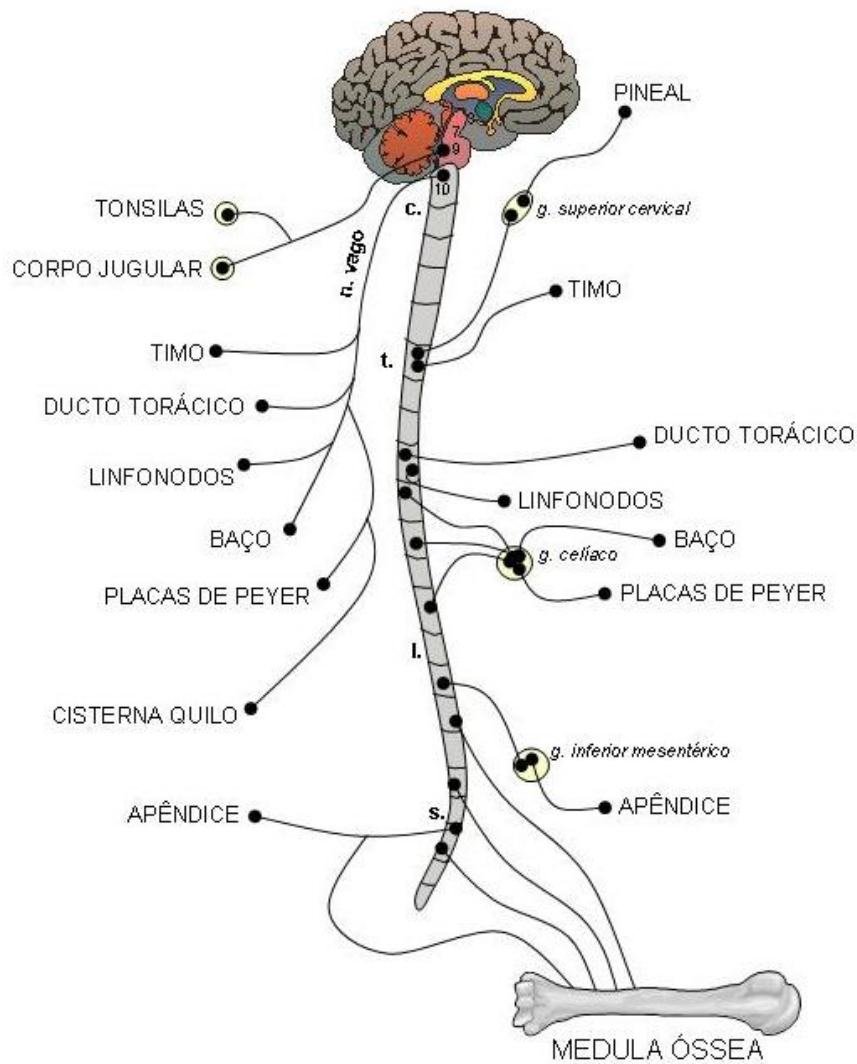


Figura 2. Inervação periférica dos principais órgãos linfóides. Inervação vagal (esquerda) e sistema nervoso autônomo (direita). Adaptado de McEwen e cols. (1997).

A ativação do sistema nervoso simpático através da injeção de adrenalina produz alterações no tráfego de leucócitos, incluindo aumento expressivo no número de linfócitos T (CD4 e CD8) e células NK (600%)(Schedlowski, Hosch *et al.*, 1996) . Essas alterações enumerativas são principalmente devidas às contrações do baço induzidas por inervações adrenérgicas. De uma forma geral, as respostas imunológicas celulares (como proliferação celular) estão temporariamente aumentadas nos tecidos linfóides após infusão com catecolaminas. Contudo, a regulação simpática não é tão importante

durante o estresse crônico, quando somente os níveis de glicocorticóides se mantêm continuamente elevados.

Além disso, existem evidências de que o nervo vago pode regular o sistema imune (Figura 2). Antonica e cols.(Antonica, Ayroldi *et al.*, 1996) observaram que a vagotomia monolateral aumenta o número de linfócitos T imaturos no baço e nos linfonodos comparado com os controles (*sham-operated*). Além disso, foi recentemente demonstrado que a vagotomia atenua o aumento dos níveis de glicocorticóides induzido pela administração de fator de necrose tumoral (TNF)- $\alpha$ . O nervo vago é responsável por captar os sinais periféricos de inflamação (citocinas pró-inflamatórias), levando informações até os núcleos do trato solitário, que reenvia os sinais para o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (Dantzer, 2001). Este promove uma sensibilização de regiões cerebrais à presença de citocinas no SNC. Esses dados sugerem que o nervo vago é uma importante via de condução da informação inflamatória para o SNC, capaz de ativar o eixo HPA.

A regulação do sistema imune sobre o SNC ocorre através da ação das citocinas (principalmente as citocinas pró-inflamatórias), que desempenham um papel crucial em mediar as respostas inflamatórias / imunes e também servem como mediadores entre o sistema imunológico e neuroendócrino. As citocinas pró-inflamatórias, liberadas na periferia, estimulam o SNC ativando o eixo HPA, conseqüentemente elevando à produção de glicocorticóides. O aumento de cortisol, por sua vez, funciona como mecanismo de *feedback* negativo para inibir a resposta imunológica exacerbada iniciada pela cascata de citocinas. As interrupções nessa alça regulatória desempenham um papel importante na susceptibilidade e resistência às doenças auto-imunes, inflamatórias, infecciosas e alérgicas. O sistema imune também desempenha um papel importante no sistema nervoso central em relação à sobrevivência e morte neuronal. As citocinas podem atuar no SNC como fatores de crescimento neuronal e como neurotoxi-

nas, desempenhando, portanto, um papel em doenças como, por exemplo, a demência de Alzheimer.

As citocinas produzidas podem funcionar como hormônios reguladores do SNC. Apesar de serem proteínas (moléculas grandes e hidrossolúveis), elas podem cruzar a barreira hematoencefálica de forma ativa ou passiva ou até mesmo, enviar diretamente sinais nervosos para o cérebro pelo nervo vago. As citocinas produzidas no local da inflamação (TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6) emitem sinais ao cérebro para liberar citocinas sintetizadas no próprio parênquima cerebral, promovendo um conjunto de mudanças de comportamento e mal estar associados à enfermidade, denominados de “*sickness behavior*”. Estas mudanças consistem em sintomas não-específicos que incluem a febre, fraqueza, mal-estar, apatia, incapacidade de concentração, sono, depressão, letargia, anedonia, perda do apetite e diminuição da libido (Kronfol e Remick, 2000) . Estas alterações comportamentais evitam o desgaste desnecessário do organismo, redirecionando energia para eliminar as infecções. No SNC, a IL-1 estimula os astrócitos, que por sua vez estimulam a produção de IL-6, TNF- $\alpha$  e IL-1. Ocorre também aumento na concentração de noradrenalina, serotonina e dopamina.

## **8. OBJETIVOS**

---

### **8.1. OBJETIVO GERAL**

Investigar os mecanismos psiconeuroendócrinos que regulam a resposta imune celular no envelhecimento estritamente saudável.

### **8.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar a carga emocional (estresse, ansiedade e depressão).
- Mensurar os níveis salivares de cortisol e DHEA.
- Avaliar a resposta imune celular.
- Analisar a sensibilidade linfocitária a glicocorticóides.
- Correlacionar as variáveis imunológicas, psicológicas, hormonais e nutricionais.

## 9. ARTIGO 01 - IMPACT OF PSYCHOLOGICAL AND ENDOCRINE FACTORS ON CYTOKINE PRODUCTION OF HEALTHY ELDERLY PEOPLE

---

Clarice Luz <sup>b,c</sup>, Fabiana Dornelles <sup>b</sup>, Thales Preissler <sup>b</sup>, Diego Collaziol <sup>b</sup>, Ivana M. da

Cruz <sup>c</sup>

and Moisés E. Bauer <sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> *Faculdade de Biociências*, <sup>b</sup> *Instituto de Pesquisas Biomédicas* and <sup>c</sup> *Instituto de Geriatria e Gerontologia*, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

## Abstract

Human ageing has been associated with immunological changes including blunted T-cell responses and increased production of pro-inflammatory cytokines. Here, we investigated the role of psychological and endocrine factors in the production of pro-inflammatory cytokines (tumor necrosis factor- $\alpha$  and interleukin (IL)-6) as well as soluble IL-2R $\alpha$ , associated with T-cell activation. Forty-six elderly subjects (60-91 yrs) and 33 young adults (20-40 yrs) were recruited accordingly the SENIEUR protocol. The emotional status was measured by structured clinical interviews. Salivary cortisol levels (09, 12 and 22h) and serum dehydroepiandrosterone (DHEA) were assessed by radio-immunoassays. The elderly were more stressed, depressed and anxious than the young subjects. Cortisol levels were increased whereas DHEA levels were significantly reduced in the elderly. Both groups showed equivalent production of pro-inflammatory cytokines as well as soluble IL-2R $\alpha$ . Psychological scores were positively correlated to evening cortisol levels and negatively correlated to morning DHEA levels. No relationships were noted between psychological factors and cytokines studied. However, evening cortisol levels were found positively correlated to TNF- $\alpha$  and sIL-2R $\alpha$  levels. These data indicate that healthy aging is associated with significant distress and activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Our data also suggest that there are complex psychoneuroendocrine relationships involved with cytokine production during ageing.

***Mechanisms of Ageing and Development, 124: 887-895. 2003.***

**Key words:** Ageing; Immunosenescence; Psychological stress; Psychoneuro-immunology; Cytokines; Hypothalamic-pituitary-adrenal axis.



## 9.1. INTRODUCTION

There is a complex bi-directional communication between the nervous, endocrine and immune systems that can be demonstrated by the presence of shared neurotransmitters, hormones and cytokines (Blalock, 1989). Data produced by recent studies demonstrates that ageing may impair this psychoneuroimmunologic cross-talk (Straub, R. H., Miller, L. E. *et al.*, 2000; Martinez-Taboada, Bartolome, Amado, Blanco, Garci *et al.*, 2002). In particular, ageing has been associated with several immunological changes (immunosenescence) including thymic involution, changes in cell trafficking, impaired T-cell functions (Pawelec, Barnett *et al.*, 2002b) and increased production of pro-inflammatory cytokines (Fagiolo, Cossarizza *et al.*, 1993; Gabriel, Cakman *et al.*, 2002). The latter are promptly produced by macrophages following stimulation with lipopolysaccharide (LPS, endotoxin). As well as altered cytokine levels, altered levels of cytokine antagonists might also influence cytokine networks during ageing. Indeed, there is some evidence for increased serum levels of soluble IL-2 receptor (sIL-2R) in the elderly (Franze, 1996; Rea, 1996), which could contribute to decrease of IL-2 function. These data suggest that ageing may be associated with significant immunological activation in parallel with impaired T-cell functions.

However, most immunological changes ascribed to immunosenescence can also be observed following chronic psychological stress (Mcewen, Biron *et al.*, 1997a) or glucocorticoid therapy (Sapolsky, Romero *et al.*, 2000). This led us to speculate that both psychological and endocrine factors could be involved during the immunosenescence. Psychological status may be such a risk factor for immunosenescence. Human aging has been associated with several psychological and behavioural changes, including difficulty to concentrate, progressive cognitive impairments and sleep disturbances (Salzman, C. e Shader, R.I., 1978). Although individually identified, these alterations may be associated with major depression. In addition, we have previously demon-

strated that major depression (Bauer, Gauer *et al.*, 1995) or psychological stress (Bauer, M., Vedhara, K. *et al.*, 2000) are also known to dampen cell-mediated immunity. In addition, ageing of the endocrine system (endocrinosenescence) may be another risk factor for immunosenescence. Endocrinosenescence can be demonstrated by a substantial decline in several hormones, including growth hormone, testosterone, progesterone, aldosterone and dehydroepiandrosterone (DHEA). DHEA and its sulfated metabolite (DHEAS) are hormones secreted by the adrenal cortex in response to adrenocorticotropin. DHEA is the most abundant adrenal steroid and has been shown to have immunomodulatory properties as well. There is also some evidence suggesting that ageing is associated with significant activation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis (Halbreich, U., Asnis, G. *et al.*, 1984; Van Cauter, Leproult *et al.*, 1996; Deuschle, Gotthardt *et al.*, 1997; Seeman, Singer *et al.*, 2001), resulting in increased production of cortisol and catecholamines that modulate several immune responses (Munck, Guyre *et al.*, 1984). Increased cortisol levels are also seen in demented patients (Maeda, Tanimoto *et al.*, 1991) or during chronic stress (Bauer, M., Vedhara, K. *et al.*, 2000). In particular, we have previously demonstrated that chronically stressed elderly subjects (caregivers of demented patients) had a blunted T-cell proliferation in association with increased cortisol levels (Bauer, M., Vedhara, K. *et al.*, 2000). Overall, these studies suggest that endocrinosenescence may be kept in close relationship with the immunosenescence.

Recent work suggests that cytokines and hormones could be considered as possible links between endocrinosenescence and immunosenescence (Straub, R., Miller, L. *et al.*, 2000). Indeed, it has long been known that pro-inflammatory cytokines can readily activate the HPA axis during infection in animals (Besedovsky, Sorkin *et al.*, 1977) or after administration in humans (Mastorakos, Chrousos *et al.*, 1993). Another studies have linked the age-related decline in DHEA production to increased serum levels of IL-6 (Daynes, Araneo *et al.*, 1993; Straub, R., Konecna, L. *et al.*, 1998). In

addition, increased plasma TNF- $\alpha$  levels were correlated to major depression in the elderly (Vetta, Ronzoni *et al.*, 2001). However, we do not know how the extent of these changes may be related to altered psychological and HPA axis functions in the elderly.

In this study, we investigated whether strictly healthy ageing is associated with (i) psychological and endocrine alterations and (ii) assessed the LPS-induced production of early (TNF- $\alpha$ ) and late (IL-6) pro-inflammatory cytokines as well as sIL-2R production *in vitro*. Finally, (iii) we analysed the impact of psychoneuroendocrine factors on cytokine production.

## **9.2. MATERIALS AND METHODS**

### **9.2.1. Subjects**

After receiving ethical approval from the University Committee (Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, Brazil), written informed consent was obtained from all subjects. Forty six non-institutionalised healthy elderly (31 females, 15 males), aged from 60 to 91 years (mean age  $72.0 \pm 8.5$  yrs), were recruited from an existing database of 1118 socially active elderly subjects who had previously participated in research at the Institute of Geriatrics and Gerontology (PUCRS). All subjects were registered at the Office for Social Care in Gravataí (RS) and took part in the GENESIS Program for the study on the genetic-environmental interactions on human ageing. Thirty three healthy young adults, (18 females, 15 males), aged from 20 to 40 years (mean age  $27.4 \pm 6.7$  yrs), also took part in this study and were all students or employees from the PUCRS.

All subjects were recruited according to the SENIEUR protocol (Ligthart, Corberand, Fournier, Galanaud, Humans, Kennes, M\_Ller-Hermelink *et al.*, 1984) that defines rigorous criteria for selecting healthy individuals in immunogerontological studies.

The health conditions were checked accordingly to accurate clinical investigations and to haematological and biochemical parameters. The exclusion criteria included: infections, acute or chronic inflammation, autoimmune diseases, heart disease, under nourishment, anaemia, leucopenia, clinical depression, caregiving, neurodegenerative disease, neoplasia and use of hormones (glucocorticoids) and drugs (alcohol, antidepressants, immunosuppressants, anticoagulants).

### **9.2.2. Psychological evaluation**

The psychological status was assessed by means of structured clinical interviews. Depression was evaluated by a Geriatric Depression Scale (Yesavage e Brink, 1983) with cut off point higher than five for the presence of depression symptoms (Shua-Haim, Sabi *et al.*, 2000). Anxiety was assessed by the Hamilton Anxiety Scale (HAM-A) with cut off point higher than 20 for the presence of anxiety (Hamilton, 1967). Moreover, symptoms of stress were monitored by the "Inventory of Stress Symptoms for Adults" (ISSL) (Lipp e Guevara, 1994). This scale includes a quadriphasic model for the study of stress that was based on Selye's model of stress (Selye, 1936). The Kuder-Richardson reliability coefficients for these scales were higher than 0.90. The ISSL is composed of four sections corresponding to the following phases of stress: alarm, adaptation, quasi exhaustion and exhaustion. The symptoms listed in the scale are specific for each phase of stress. The scoring was performed by means of three different stages related to the duration (Q1 = last 24h, Q2 = last week and Q3 = last month) and intensity of stress symptoms. The sum of all physical as well as psychological symptoms within each stage resulted in a score that is related to the presence of stress accordingly to the following criteria: Q1 > 6 or Q2 > 3 or Q3 > 8.

### **9.2.3. Collection of salivary samples and cortisol analysis**

Salivary cortisol was measured as an objective marker of the HPA axis function. The assessment of cortisol in saliva has proven to be a valid and reliable reflection of the unbound hormone in the blood (Walker, Riad-Fahmy *et al.*, 1978), with salivary cortisol concentrations corresponding to 5-10% of the levels present in the serum (Kahn, J., Rubinow, D. D., C.; Kling, M. *et al.*, 1988). Salivary cortisol, which represents the free component of plasma cortisol, is not affected by alterations in protein binding (Kirschbaum e Hellhammer, 1994), remains stable in saliva for several days and has been used in the investigation of HPA disorders (Bauer, M., Vedhara, K. *et al.*, 2000; Bauer, Papadopoulos *et al.*, 2003). Furthermore, compared to venepuncture, the collection of saliva is a simple, non-invasive and stress-free procedure. Samples can be readily collected by participants without supervision or the assistance of medical staff. The assessment of cortisol in saliva is, therefore, a powerful tool for investigating HPA function during ageing.

Salivary samples were collected as previously described (Bauer, M., Vedhara, K. *et al.*, 2000). Participants were asked to collect three saliva samples with the help of cotton rolls over the course of the experimental day at 9am, 12pm and 10pm, always before meals and venepuncture. Sampling was performed across the day to assess some aspects of circadian pattern. Upon arrival in the laboratory, the samples were centrifuged and frozen at -20°C. Following defrosting, samples were centrifuged (1500 rpm / 3 min) to allow precipitation of proteins and mucins. Salivary cortisol samples were then analysed by radioimmunoassay (RIA, DPC Medlab) using microtitre plates. The sensitivity of these assays was estimated in 0.1 nM/L. The intra- and inter-assay coefficients of variation were less than 10%. Results from each of the sampling times were expressed in nM per litre.

#### **9.2.4. Collection of peripheral blood and isolation of mononuclear cells**

Twenty millilitres of peripheral blood was collected by venepuncture in the morning (between 9-10am) and samples stored into lithium-heparin tubes prior to analyses. Samples were always collected at the same time of day to minimize circadian variations. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by centrifugation over a Ficoll-Hypaque (Sigma) gradient (900 g, 30 min). Cells were counted by means of microscopy (100 x) and viability always exceeded 95%, as judged from their ability to exclude trypan blue (Sigma).

#### **9.2.5. Serum DHEA**

Aliquots of peripheral blood were also collected without anticoagulant in order to measure serum DHEA. Hormone levels were assessed by a radioimmunoassay kit (DSL-CPEI) within 4 hrs following blood collection. The sensitivity of these assays was estimated in 0.09 pg/mL. The intra- and inter-assay coefficients of variation were less than 10%. Results from each of the sampling times were expressed in pg/mL.

#### **9.2.6. Cell cultures and cytokines**

To measure pro-inflammatory cytokines (i.e. TNF- $\alpha$  and IL-6), PBMCs ( $1.5 \times 10^5$  cells/mL) were stimulated with 0.2  $\mu$ g/mL of endotoxin (LPS, *E. coli*, Sigma) in complete medium (RPMI-1640, supplemented with gentamicin 0.5%, glutamine 1%, hepes 1%, and fetal calf serum 10%; all from Sigma) for 24h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. PBMCs were also stimulated with phytohemagglutinin 1% (PHA, Gibco) and cultured in complete medium for 96h to assess the sIL-2R  $\alpha$  chain (p55) production. After the incubation, supernatants were transferred to eppendorf tubes, centrifuged (900g, 15 min) collected and stored in freezer -70°C prior to the analyses by Immulite™ chemiluminescent assays (DPC Medlab, SP, Brazil). Immulite is a solid-phase, two-site, chemiluminescent enzyme immunometric assay (Berthier, Genin *et al.*, 1999). The solid phase, a polysty-

rene bead enclosed within an Immulite Test Unit, was coated with monoclonal murine antibody specific for the cytokines analyzed. The supernatant and a protein/buffer matrix were simultaneously introduced into the Test Unit, and incubated for approximately 30 min at 37°C with intermittent agitation. During this time, cytokine in the supernatant bound to the monoclonal antibody-coated beads. Unbound supernatant was then removed by a centrifugal wash. An alkaline phosphatase-labeled polyclonal sheep anti-cytokine antibody was introduced, and the Test Unit was incubated for another 30-min cycle. The unbound enzyme conjugate was removed by a centrifugal wash. Substrate was added, and the Test Unit was incubated for further 10 min. The chemiluminescent substrate, a phosphate ester of adamantyl dioxetane, underwent hydrolysis in the presence of alkaline phosphatase to yield an unstable intermediate. The continuous production of this intermediate resulted in the sustained emission of light, thus improving precision by providing a window for multiple readings. The bound complex – and thus also the photon output, as measured by the luminometer – was proportional to the concentration of cytokine in the sample. The cytokine concentration was calculated from the standard curve. The sensitivities for these assays are the following: TNF- $\alpha$  (0.7 pg/ml), IL-6 (5.0 pg/ml) and sIL-2R (5.0 pg /ml). The intra- and inter-assay coefficients of variation were less than 5%. The results are expressed in pg/mL.

#### **9.2.7. Statistical analysis**

All variables were tested for normality of distribution by means of the Kolmogorov-Smirnov test. Cortisol data was analyzed by repeated measures ANOVA that included one between-subjects variable (elderly versus young) and one within-subjects variable (cortisol levels). Multiple comparisons among group mean differences were checked with Tukey post hoc test. Differences between variables were also assessed by Student's t test. Differences in proportions between groups were compared by means of  $\chi^2$  test. Relationships between variables were assessed by means of Pear-

son's product moment correlations. Data are expressed as mean  $\pm$  SE in all figures and tables. All significance levels were two-tailed. A computer statistics package (SPSS 11.0, Chicago, USA) was used for statistical analyses in this study.

### **9.3. RESULTS**

#### ***9.3.1. Demographic data and psychological evaluation***

Table 2 lists the demographic and psychological data for the subjects enrolled in this study. When elders were classified into decades of age, 20 subjects were between 60-70 yrs, 18 subjects were between 71-80 yrs and 8 subjects were older than 80 yrs. Most elderly (95.6%) and young subjects (81.0%) were Caucasian. The female/male ratio did not differ significantly between elderly and young subjects.



**Table 2. Characteristics of the study sample.**

<b>Factors</b>	<b>Young (n=33)</b>	<b>Elderly (n=46)</b>
<b>Age (yrs)</b>	27.42 ± 1.16 (20-40 yrs)	72.00 ± 1.25 **** (60-91 yrs)
<b>Race</b>	81.00% Caucasian	95.60% Caucasian
<b>Gender</b>	54.54% F 45.45% M	67.39% F 32.61% M
<b>Weight (kg)</b>	67.14 ± 2.27	68.64 ± 1.95
<b>Height (m)</b>	1.71 ± 0.01	1.58 ± 0.01 ****
<b>Stress (Q1)</b>	2.10 ± 0.32	4.09 ± 0.37 ****
<b>Stress (Q2)</b>	2.65 ± 0.50	4.98 ± 0.41 ***
<b>Stress (Q3)</b>	3.77 ± 0.67	6.22 ± 0.63 **
<b>Anxiety</b>	3.29 ± 0.59	5.00 ± 0.35 ***
No anxiety: n (%)	21 (63.63%)	13 (28.26%)
Mild anxiety: n (%)	6 (18.18%)	10 (21.74%)
Moderate: n (%)	2 (6.06%)	12 (26.09%)
Severe anxiety: n (%)	4 (12.12%)	11 (23.91%)
<b>Depression</b>	17.94 ± 2.69	29.40 ± 1.87 **
No depression: n (%)	26 (78.78%)	23 (50.00%)
Symptoms of depression: n (%)	6 (18.18%)	21 (46.65%)
Depression: n (%)	1 (3.03%)	2 (4.34%)

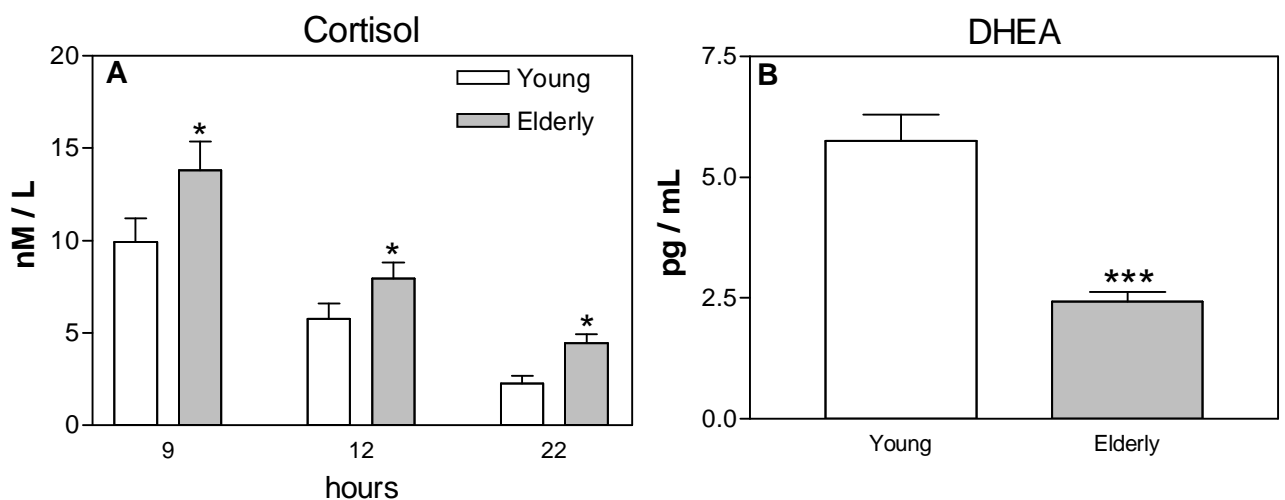
Stress scoring (Q1 = last 24h, Q2 = last week and Q3 = last month). Statistical significances are indicated: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  and \*\*\*\*  $p < 0.0001$  vs. young subjects.

We observed that healthy ageing is associated with important psychological alterations. In particular, it was observed that elderly reported greater depression ( $p = 0.005$ ), anxiety ( $p = 0.001$ ) and stress ( $p = 0.001$ ) than young adults (Table 2). Moreover, the majority of the elderly (76.1%) displayed stress symptoms in comparison to young adults (27.3%),  $p < 0.0001$ . Further analyses within the stressed subjects revealed that the majority of the elderly (67.4%) and young subjects (21.2%) were classi-

fied in the adaptation's stress phase, with only one elder (2.2%) classified in the exhaustion's stress phase,  $p < 0.0001$ . In addition, both groups presented similar stress symptoms (i.e. physical and psychological).

### 9.3.2. Endocrine evaluation

In this study we were able to assess HPA axis function by means of measuring salivary cortisol levels across the day. Salivary cortisol levels differed significantly over the three sampling times (Figure 3A),  $F(2,142) = 46.72$ ,  $p < 0.0001$ . Cortisol peaked in the morning and presented a nadir at night, with a regular circadian pattern for both groups. Interestingly, cortisol levels were significantly elevated in the elderly compared to young adults,  $F(1,71) = 5.04$ ,  $p = 0.02$  (Figure 3A).



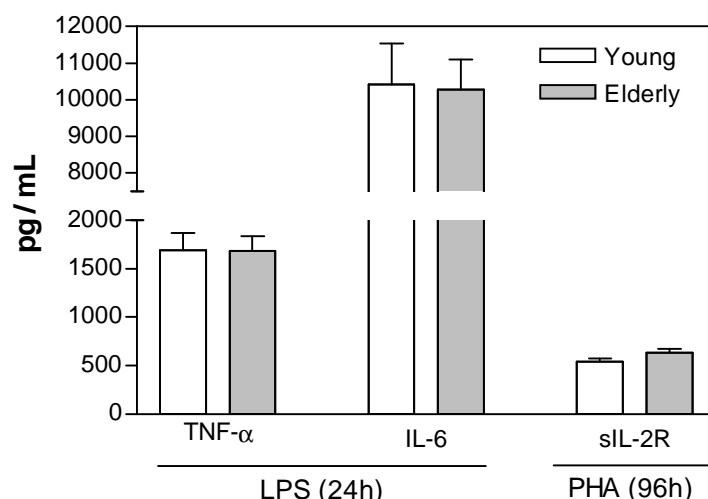
**Figure 3. Endocrine evaluation.** Human aging is characterized by higher salivary cortisol levels throughout the day (A) and reduced serum DHEA levels in the morning (B). Statistically significant differences are indicated: \*  $p < 0.05$  and \*\*\*  $p < 0.0001$ .

We also observed that elders had significantly lower serum DHEA levels compared to young subjects,  $t = 5.34$ ,  $p < 0.0001$  (Figure 3B). Although young men presented significantly higher DHEA levels than young women ( $7.23 \pm 0.59$  versus  $4.83 \pm 0.75$ ,  $p < 0.05$ ), there were no gender-related differences in the elderly group.

### **9.3.3. Cytokines**

Monocytes play a central role in innate immunity, participating during the processes of inflammation and in antigen presentation. We stimulated PBMCs with LPS, a potent monocyte activating agent, to evaluate the production of the pro-inflammatory cytokines. However, both TNF- $\alpha$  and IL-6 levels did not differ between young adults and elderly subjects (Figure 4).

Chronic T-cell activation leads to receptor shedding and shed sIL-2R $\alpha$  may bind free IL-2, limiting its function. Increased serum sIL-2R $\alpha$  levels were observed in the elderly and might be a clinical marker of strong antigenic stimulation. We thus stimulated PBMCs with PHA, a polyclonal mitogen that stimulates T cells only, to evaluate sIL-2R $\alpha$  production. In this study, however, the sIL-2R $\alpha$  production was found to be the same between young and elderly subjects (Figure 4).



**Figure 4. Cytokine production.** PBMCs were stimulated *in vitro* with either lipopolysaccharide (LPS) and cultured for 24h or phytohemagglutinin (PHA) for 96h. Cytokines were measured in the supernatants by quimioimmunoassays.

#### 9.3.4. Psychoneuroendocrine relationships on cytokine production

We further explored the complex relationships between psychological, endocrine and immune variables studied. We first investigated the impact of psychological factors on endocrine variables. Depression, anxiety and stress scores were found positively correlated to evening cortisol levels and negatively correlated to morning DHEA levels (Table 3).

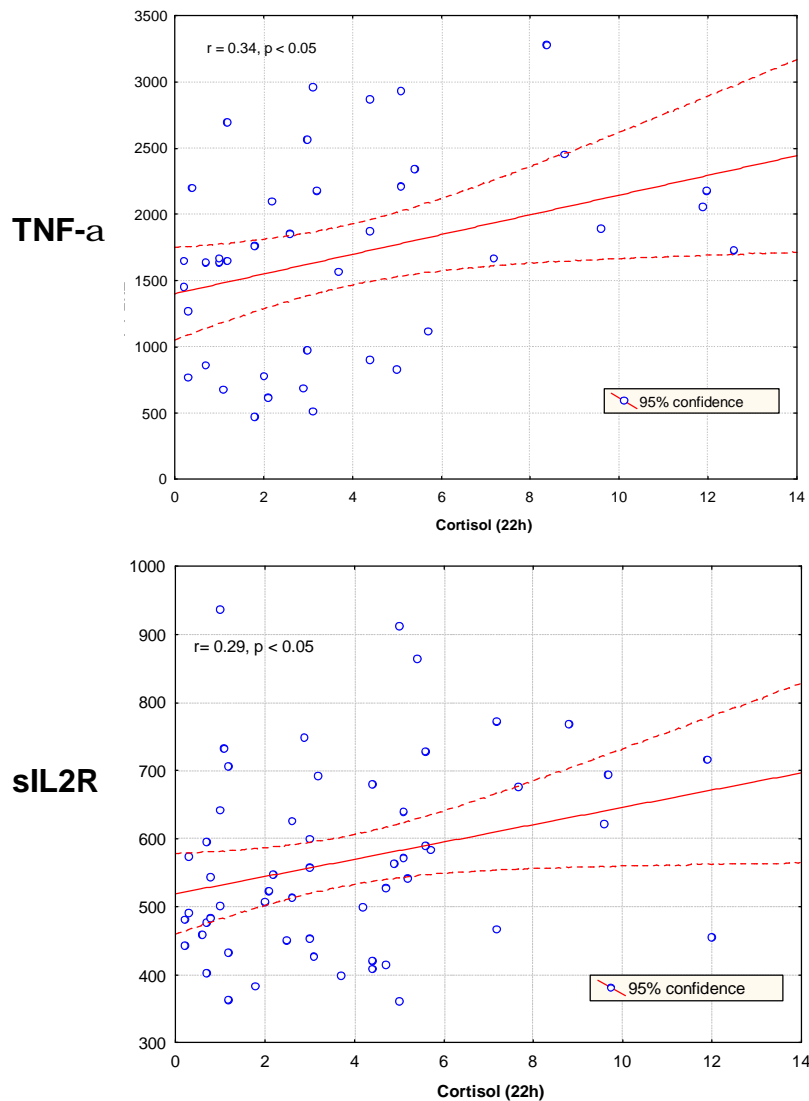
**Table 3. Impact of psychological factors on neuroendocrine variables.**

Pearson correlations are indicated (p).

Variables	Cortisol (9h)	Cortisol (12h)	Cortisol (22h)	DHEA (9h)
Depression	0.12 (0.30)	0.24 (0.04)	0.37 (0.001)	-0.43 (0.0001)
Anxiety	0.12 (0.29)	0.17 (0.16)	0.24 (0.04)	-0.42 (0.0001)
Stress (Q1)	0.21 (0.07)	0.22 (0.06)	0.37 (0.001)	-0.33 (0.005)
Stress (Q2)	0.10 (0.40)	0.15 (0.19)	0.39 (0.001)	-0.38 (0.001)
Stress (Q3)	0.22 (0.06)	0.19 (0.10)	0.33 (0.005)	-0.36 (0.002)

Stress scoring: Q1 = last 24h, Q2 = last week and Q3 = last month. NS = non-significant.

The relationships between psychoneuroendocrine factors and cytokines were then investigated. No significant correlations were found between psychological factors and cytokines studied ( $p > 0.17$ ). However, evening (22h) cortisol levels were found positively correlated to TNF- $\alpha$  ( $r = 0.34$ ,  $p < 0.05$ ) and sIL-2R $\alpha$  ( $r = 0.29$ ,  $p < 0.05$ ) levels (see Figure 5). DHEA levels, however, were not found statistically correlated to any cytokine measured ( $p > 0.14$ ).



**Figure 5. Correlations between evening cortisol (22h) and cytokines.** The 95% confidence interval of the regression line, the correlation coefficients, and the P values are indicated.

#### 9.4. DISCUSSION

There is a complex bi-directional communication between the nervous, endocrine and immune systems (Blalock, 1989). Although these systems are commonly studied separately by our fragmented Cartesian-based science, recent psychoneuro-immunologic research sheds some light into the importance of investigating systemic relationships. In this study, we investigated the impact of psychoneuroendocrine factors on cytokine production *in vitro* of strictly healthy (SENIEUR) elderly and young subjects. Ageing is associated with several immune-related diseases including cardiovascular, infectious and cancer. Therefore, to control for age-related diseases that would interfere with our cytokine measurements, strictly healthy individuals were recruited by means of the SENIEUR protocol (Ligthart, Corberand, Fournier, Galanaud, Humans, Kennes, M\_Ller-Hermelink *et al.*, 1984). However, we observed that SENIEUR elderly subjects were significantly more distressed than young adults. In particular, the healthy elderly were more depressed, anxious and stressed than young subjects. It is noteworthy to mention here, however, that the elderly subjects investigated in this study were not suffering from clinical depression or chronic stress. In fact, all were non-institutionalized and socially active individuals. The literature regarding age-related psychological changes is controversial and others did not find these changes (Nolen-Hoeksema e Ahrens, 2002a). This could be due to methodological issues, since specific clinical interviews are required to assess depression in the elderly. Taken together, our data suggest that healthy ageing is accompanied with psychological changes and that the SENIEUR protocol is limited to evaluate these changes.

In parallel with psychological changes, we observed that healthy elderly subjects had increased salivary cortisol levels and reduced serum DHEA levels. These data are in partial agreement with previous studies (Halbreich, U., Asnis, G. M. *et al.*, 1984; Straub, R., Konecna, L. *et al.*, 1998) and suggest that adreno-senescence is characterised with significant activation of the HPA axis in parallel with reduced serum DHEA

levels. The HPA axis activation could be related to a degeneration of the limbic structures (hypothalamus and hippocampus) and may be responsible for a decreased sensitivity to cortisol and hyperactivation of the HPA axis during ageing (Sapolsky, Krey *et al.*, 1986). Given the findings that even discrete HPA axis activation may impair cognitive function (Lupien, Lecours *et al.*, 1994) and induce sleep disturbances (Starkman, Scheingart *et al.*, 1981), conditions frequently associated in the elderly, psychological or pharmacological strategies attenuating or preventing increased HPA function during ageing might be of considerable benefit for the elderly. However, there are studies in the literature reporting that cortisol levels are unchanged during healthy aging (Waltman, Blackman *et al.*, 1991; Raff, Raff *et al.*, 1999; Kudielka, Schmidt-Reinwald *et al.*, 2000; Martinez-Taboada, Bartolome, Amado, Blanco, Garci *et al.*, 2002). These discrepancies could be related to small sample sizes, heterogeneity of subject populations in terms of gender distribution, age range, healthy status, differences in the analytical methods employed and psychological status. As regards to the latter, there is evidence suggesting the stress-related HPA axis activation may produce the very same neurological changes in the limbic region via the direct action of cortisol in these areas. Therefore, it becomes difficult to dissociate these neuroendocrine changes observed in the elderly with those induced by psychological stimuli. For instance, we have previously demonstrated that chronically stressed elders had increased salivary cortisol levels compared to non-stressed elderly (Bauer, M., Vedhara, K. *et al.*, 2000). In this study, psychological scores were positively correlated to cortisol levels and negatively correlated to DHEA levels. Taken together, these data indicated that psychological factors may be implicated in activating HPA axis during healthy ageing. DHEA may antagonise several biological effects of glucocorticoids including neuronal protection to damaging effects of glucocorticoids (Svec F, 1998). In addition, the fact that cortisol levels are higher and DHEA levels significantly reduced during ageing makes the neural environment more exposed to cortisol actions. This may lead to cognitive alterations

and psychological disturbances as demonstrated by mental diseases (Michael, Jenaway *et al.*, 2000).

No differences in LPS-induced production of pro-inflammatory cytokines were noted between young and elderly subjects. These data are in contrast to previous studies that found that ageing was associated with increased production of pro-inflammatory cytokines (Fagiolo, Cossarizza *et al.*, 1993; Straub, R., Konecna, L. *et al.*, 1998; Gabriel, Cakman *et al.*, 2002). In addition, previous work has linked the age-related decline in DHEA production to increased serum levels of IL-6 (Daynes, Araneo *et al.*, 1993; Straub, R., Konecna, L. *et al.*, 1998). This again was not found in our study. These apparent discrepancies could be explained by at least two methodological differences between this and previous studies: (a) whether cytokines were measured in serum or supernatants and (b) the psychological status of the elderly cohort. Levels of pro-inflammatory cytokines determined in serum may not necessarily reflect those found *in vitro* since cell types other than monocytes may also secrete them (e.g. endothelial cells). There are also soluble receptors circulating in serum that may antagonise their function and limit their detection. In this study, we have only assessed stimulated cytokine levels because recent work produced by our (Bauer, Papadopoulos *et al.*, 2003) or other's laboratories (Beharka, Meydani *et al.*, 2001) revealed that unstimulated and stimulated cytokine levels are correlated *in vitro*. In addition, considering that our cohort of elderly subjects was significantly distressed, we hypothesize this could have normalised the cytokines investigated in this study. However, the underlying mechanisms may be other than via HPA axis since cortisol levels were positively associated to TNF- $\alpha$  and sIL-2R $\alpha$  levels. Although correlation does not prove causal relationship, it indicates that this line of evidence should merit further investigation. On the other hand, there is also some evidence of increased pro-inflammatory cytokines during major depression (Maes, Bosmans *et al.*, 1995; Vetta, Ronzoni *et al.*, 2001). Therefore, it becomes difficult to dissociate the cytokine changes observed in the elderly with those



induced by psychological stimuli. In addition, our cohort of elderly subjects produced similar sIL-2R $\alpha$  levels following PHA stimulation compared to young adults. This result is contrasting with previous studies that have shown that ageing was associated with either increased serum sIL-2R $\alpha$  levels (Franze, 1996; Rea, 1996) or increased production of sIL-2R $\alpha$  *in vitro* (Liu, Wang *et al.*, 1997b; Rink, Cakman *et al.*, 1998) and will thus require further investigation.

In summary, we demonstrated here that healthy (SENIEUR) ageing is associated with significant psychological distress in parallel with higher cortisol levels and reduced DHEA levels. We demonstrated that it becomes difficult to dissociate these neuroendocrine changes observed in the elderly with those induced by psychological stimuli. No changes in cytokine production were observed in the elderly. Furthermore, we suggested that there are neuroendocrine interactions involved with the production of TNF- $\alpha$  and sIL-2R $\alpha$ . Additional research is necessary to further explore these interactions in both healthy and pathological ageing.

### **Acknowledgements**

The authors would like to acknowledge the excellent technical assistance of Ingrid Manfredi (Office for Social Care, Gravataí). We are grateful to the city hall of Gravataí for setting up special facilities for the recruitment of the elderly subjects. We are also indebted to DPC-Medlab (São Paulo, Brazil) for kind donations of kits. The work presented in this manuscript was supported by grants from FAPERGS (M.E.B., Proc. 00/0168.9) and CNPq (M.E.B., Proc. 551180/01-3).

## 10. ARTIGO 02 - HEALTHY AGEING IS ASSOCIATED WITH SIGNIFICANT DISTRESS AND IMPAIRED NEUROIMMUNOMODULATION

---

Clarice Luz <sup>2</sup>, Diego Collaziol <sup>2</sup>, Thales Preissler <sup>2</sup>, Ivana M. da Cruz <sup>3</sup>, Luiz Glock <sup>1</sup>

and

Moisés E. Bauer <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Faculdade de Biociências and <sup>2</sup> Instituto de Pesquisas Biomédicas, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre (RS), Brazil; <sup>3</sup> Centro Tecnologia, Universidade do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul (UNIJUI), Ijuí (RS), Brazil.

**Running title:** Neuroimmunomodulation of healthy ageing

## Summary

Ageing has been associated with immunological changes that resemble those observed following chronic stress or glucocorticoid treatment. In this study we evaluated the psychoneuroendocrine correlates of cellular immunity of strictly healthy elders. Forty-six elderly subjects and 33 young adults were recruited accordingly the health criteria of the SENIEUR protocol. The psychological status was measured by structured clinical interviews. Peripheral lymphocytes or monocytes were stimulated to assess production of immunoreactive growth hormone (GH). Mitogen-induced T cell proliferation was evaluated as an index of non-specific cell-mediated immunity. Peripheral sensitivity to steroids was assessed *in vitro* by dexamethasone, cortisol or dehydroepiandrosterone (DHEA) induced inhibition of proliferation. DHEA and GH levels were measured by radioimmunoassays. The elderly were more stressed, depressed and anxious than the young subjects. Healthy elders had lower salivary DHEA and serum GH levels and reduced T-cell proliferation and sensitivity to dexamethasone than young adults. Elders presented similar cellular sensitivities to cortisol and DHEA. Cells of elders produced similar levels of immunoreactive GH compared to cells of young adults. These data indicate that healthy ageing is associated with significant distress, adrenal and somatosenescence as well as impaired neuroendocrine-immunoregulation at the level of the lymphocyte. In addition, somatosenescence may not be associated with reciprocal decline in immunoreactive GH.

**Keywords:** ageing, psychological stress, immunosenescence, psychoneuroimmunology, glucocorticoids, lymphocytes

## 10.1. INTRODUCTION

Ageing is associated with several physiological alterations including changes in the immune system (immunosenescence). However, it remains controversial whether these changes cause or are caused by underlying disease in humans. Strenuous efforts have been made to circumvent this problem by separating “disease” from “ageing”, as exemplified by the application of the SENIEUR protocol (Ligthart, Corberand, Fournier, Galanaud, Humans, Kennes, Möller-Hermelink *et al.*, 1984) that defines rigorous criteria for selecting healthy individuals in immunogerontological studies. When diseased subjects are excluded, immunosenescence involves thymic involution, lower lymphocyte counts (e.g. naïve T cells), switch from Th1 to Th2 cytokines, impaired humoral responses to new antigens and blunted T-cell proliferation (Pawelec, Barnett *et al.*, 2002a). The latter is one of the most documented age-related change observed during aging (Murasko, Weiner *et al.*, 1987; Liu, Wang *et al.*, 1997a) and seems to be due to both numerical and functional cellular changes. There is considerable amount of evidence suggesting that aging impairs the signal transduction events that follow mitogen-induced T-cell activation and interleukin (IL)-2 secretion (Candore, Diloranzo *et al.*, 1992; Pawelec, Barnett *et al.*, 2002a). For instance, it has been shown that the frequency of T cells responding to phytohemagglutinin (PHA) by secreting IL-2 decreased with age in American SENIEUR donors (Jackola, Ruger *et al.*, 1994). The clinical consequences of immunosenescence include increased susceptibility to infectious diseases, neoplasias and autoimmune diseases (Castle, 2000). However, this altered morbidity is not evenly distributed and should be influenced by other immunomodulating factors. These data led us to consider that other factors may potentially contribute to the heterogeneity of these changes, including neuroendocrine pathways. Therefore, the understanding of the interplay between the immune, endocrine and nervous systems in the elderly is of paramount importance.

In addition to immunosenescence, the endocrine system also undergoes important changes during ageing. From both human and animal studies, it has been demonstrated a decline in growth hormone (GH), sex hormones and dehydroepiandrosterone (DHEA) with ageing (Roshan, Nader *et al.*, 1999). DHEA is the major secretory product of the human adrenal. The hormone is uniquely sulphated (DHEAS) before entering the plasma, and this prohormone is converted to DHEA and its metabolites in various peripheral tissues (Canning, Grotenhuis *et al.*, 2000). Serum DHEA levels decrease by the second decade of life reaching about 5% of the original level in the elderly (Migeon, Keller *et al.*, 1957a). However, it remains to be established whether this hormonal change can also be observed when stress-free collection procedures are employed (e.g. salivary samples). DHEA and its sulfated form have been reported to have immunomodulatory properties, including increased mitogen-stimulated IL-2 production (Daynes, Dudley *et al.*, 1990; Suzuki, Suzuki *et al.*, 1991), diminished TNF- $\alpha$  or IL-6 production (Di Santo, Sironi *et al.*, 1996; Straub, R. H., Konecna, L. *et al.*, 1998), inhibition of natural killer cell differentiation (Risdon, Moore *et al.*, 1991) or rodent mitogen-induced lymphocyte proliferation (Padgett e Loria, 1994). Furthermore, DHEA has been proposed as exerting restoring effects on immunosenescence, including important adjuvant effect on the immunization of aged mice with recombinant hepatitis B surface antigen (Araneo, Woods *et al.*, 1993) or influenza (Danenberg, Ben-Yehuda *et al.*, 1995). However, DHEA treatment did not produce any beneficial to the immune response to influenza vaccination in elderly subjects (Danenberg, Ben-Yehuda *et al.*, 1997). Although many workers have tested adrenal function in the elderly, none have studied the effect of ageing on salivary DHEA production and steroid immunomodulation between elderly people of defined health status and young subjects.

Previous studies have long demonstrated that serum GH levels are significantly reduced during ageing (Corpas, Harman *et al.*, 1993) – a process known as somatosenescence. However, GH is not exclusively produced by pituitary gland and human im-

mune cells are also able to secrete several neuropeptides including GH (Weigent, Baxter *et al.*, 1988; Hattori, Ikekubo *et al.*, 1994). Immunoreactive GH has several immunoenhancing properties and may be thus important in modulating both humoral and cellular immune function (Weigent, Baxter *et al.*, 1988; Malarkey, Wang *et al.*, 2002). However, it remains to be established whether reduced peripheral GH levels (i.e. somatosenescence) are capable of changing the production of immunoreactive GH.

The measurement of peripheral hormones may not be sufficient to finally determine the functional hormonal action in target tissues. Glucocorticoid immunomodulation is orchestrated by specific binding of glucocorticoids (GCs) on two distinct cytoplasmic receptors. Type I adrenal receptor is primary mineralocorticoid binding but also has a high binding affinity for GCs. The type II adrenal receptor binds to dexamethasone (DEX), a synthetic GC, with a greater affinity than natural GCs. Although the type I receptors have higher affinity for circulating GCs than the type II, most (if not all) effects on the immune system are mediated via type II adrenal receptors (Mcewen, Biron *et al.*, 1997b). The presence of these receptors indicates that the immune system is prepared for hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis activation and the subsequent elevation in endogenous GCs. However, it has been suggested that chronically elevated cortisol levels may produce a state of acquired steroid resistance enabling lymphocytes to respond with less intensity to GCs. This phenomenon has previously been observed during major depression (Bauer, Papadopoulos *et al.*, 2003) and chronic stress (Bauer, M. E., Vedhara, K. *et al.*, 2000). Although there is some evidence that this may also occur during ageing (Raskind, Peskind *et al.*, 1994; Ferrari, Cravello, Muzzoni, Casarotti *et al.*, 2001), we do not know to what extent this change may be associated to the psychological status of healthy elders.

We have recently demonstrated that healthy ageing was associated with significant psychological distress and increased salivary cortisol levels in parallel with changes in T-cell subsets (Collaziol, Luz *et al.*, 2004) and unaltered production of pro-

inflammatory cytokines (Luz, Dornelles, Preissler, Collaziol, Cruz *et al.*, 2003). In this study we evaluated both psychoneuroendocrine and immune functions of healthy elders by assessing dehydroepiandrosterone (DHEA) and growth hormone (GH) interactions with cellular immunity. We also investigated to what extent psychological status is related to somatosenescence and the production of immunoreactive GH. Finally, we investigated whether lymphocytes differed in sensitivity to steroids and so examined whether ageing was associated with alterations in neuroendocrine-immune regulation. This was achieved by investigating *in vitro* lymphocyte sensitivity to DEX, cortisol and DHEA.

## **10.2. METHODS**

### **10.2.1. Subjects**

Forty six non-institutionalized healthy elderly (31 females), aged from 60 to 91 years (mean  $\pm$  SD, 72.00  $\pm$  8.51 yrs), were recruited from an existing database of 1,118 community-dwelling elderly subjects who had previously participated in research at the Institute of Geriatrics and Gerontology (PUCRS). All subjects were recruited from local community centres and registered at the Office for Social Care in Gravataí (RS). This elderly population corresponded both ethically and socio-economically to the general population of our State (RS). All subjects took part in the GENESIS Program for the study on the genetic-environmental interactions on human ageing. Thirty three healthy young adults, (18 females), aged from 20 to 40 years (mean  $\pm$  SD, 27.40  $\pm$  6.70 yrs), also took part in this study and were all students or employees from the PUCRS.

All subjects were recruited accordingly to the SENIEUR protocol (Ligthart, Corberand, Fournier, Galanaud, Humans, Kennes, Möller-Hermelink *et al.*, 1984) that defines rigorous criteria for selecting strictly healthy individuals in immunogerontological studies. The health conditions were checked accordingly to accurate clinical investiga-

tions and to hematological and biochemical parameters. The exclusion criteria included: infections, acute or chronic inflammation, autoimmune diseases, heart disease, under nourishment, anemia, leucopenia, mood disorders, caregiving, neurodegenerative disease, neoplasias and use of hormones (steroids) and drugs (alcohol, antidepressants, immunosuppressants, anticoagulants).

### **10.2.2.Procedures**

Subjects reported to the laboratory between 7–8 h and were promptly examined by a geriatrician and psychologist. After the clinical examination, subjects were asked to collect the first saliva sample (9 h) and blood was immediately drawn for the immune measures. Before leaving the laboratory, subjects were asked to collect the second saliva sample (12 h) and were instructed to collect the third sample (20 h) at home. The latter was kept in the fridge and returned to lab within a week. The study protocol was approved by both scientific and ethics committees (Pontifical Catholic University of Rio Grande do Sul, PUCRS, Porto Alegre, Brazil) and written informed consent was obtained from all subjects.

### **10.2.3.Psychological evaluation**

The psychological status was assessed by means of structured clinical interviews and performed by a trained investigator (Luz, Dornelles, Preissler, Collaziol, Cruz *et al.*, 2003). Depression was evaluated by a Geriatric Depression Scale (Yesavage, Brink *et al.*, 1982) with cut-off point higher than five for the presence of depression symptoms (Shua-Haim, Haim *et al.*, 2001). Anxiety was assessed by the Hamilton Anxiety Scale (HAM-A) with cut-off point higher than 20 for the presence of anxiety (Hamilton, 1967). Moreover, symptoms of stress were monitored by the “Inventory of Stress Symptoms for Adults” (ISSL) (Lipp e Guevara, 1994). The Kuder-Richardson reliability coefficients for these scales were higher than 0.90. The ISSL is composed of



four sections corresponding to the following stress phases: alarm, adaptation, quasi exhaustion and exhaustion. The symptoms listed in the scale are specific for each phase of stress. The scoring was performed by means of three different stages related to the duration (Q1 = last 24h, Q2 = last week and Q3 = last month) and intensity of stress symptoms. The sum of all physical as well as psychological symptoms within each stage resulted in a score that is related to the presence of stress accordingly to the following criteria: Q1 > 6 or Q2 > 3 or Q3 > 8.

#### **10.2.4. Nutritional analyses**

Nutritional status was assessed in this investigation because it is known to influence immune function (Krause, Castro *et al.*, 2000). The assessments consisted of both body mass index (BMI: weight / height<sup>2</sup>) and serum proteins (total serum proteins, albumin, vitamin B12, folic acid and ferritin). These parameters have been used previously as markers of nutritional status in gerontological studies (Nikolaus, Bach *et al.*, 1995), as well as in previous work exploring the effects of stress on the immune system (Bauer, M. E., Vedhara, K. *et al.*, 2000). Albumin was also measured here as a major serum transport protein for DHEA (85% is bound to albumin) (Ganong, 1991) and alterations ascribed to this carrier may thus change the active free levels occurred in the tissue. Serum vitamin B12 and folic acid were measured by electrochemoluminescence kits (Elecsys 2010, Roche). Ferritin was assessed by chemoluminescence kits (Immulinite I, Diagnostic Products Corporation Medlab, São Paulo, Brazil). Albumin was measured by the standard enzymatic method of Biuret (540 nm) in combination with staining procedures (kit GT-Labs., Buenos Aires, Argentina). The measurement of these variables allowed us to examine the extent to which any observed immune impairment could be explained by these factors.

### **10.2.5. Collection of salivary samples and measurements of DHEA**

The assessment of steroids in saliva has proven to be a valid and reliable reflection of the unbound hormone in the blood (Walker, Riad-Fahmy *et al.*, 1978), with salivary cortisol and DHEA concentrations reflecting 5-10% of the levels present in serum (Kahn, J., Rubinow, D. D., C.; Kling, M. *et al.*, 1988; Bauer, Papadopoulos *et al.*, 2003). Participants were asked to collect three saliva samples with the help of cotton rolls over the course of the experimental day at 9, 12 and 20 h, always before meals and venepuncture. Sampling was performed across the day to assess some aspects of circadian pattern. Upon arrival in the laboratory, the samples were centrifuged and frozen at -20°C. Salivary DHEA was analyzed by a modified RIA (DPC Medlab) accordingly to previous work (Granger, Schwartz *et al.*, 1999). The sensitivity of this assay was estimated in 0.031 nmol/L. The intra and inter-assay coefficients of variation were less than 10%. Results from each of the sampling times were expressed in nmol/L.

### **10.2.6. DHEA and GH assessments**

Aliquots of peripheral blood were collected without anticoagulant in order to measuring serum DHEA. Hormonal levels were assessed by radioimmunoassay kits - DHEA (Diagnostic Systems Laboratories, Webster, TX, USA) and GH (DPC-Medlab, São Paulo, Brazil). The sensitivity of these assays was estimated in 0.31 pmol/L. The intra- and inter-assay coefficients of variation were less than 10%. Results from each of the sampling times were expressed in pmol/L.

### **10.2.7. Collection of peripheral blood and isolation of mononuclear cells**

Twenty millilitres of peripheral blood was collected by venepuncture in the morning (between 9–10 h) and samples stored into lithium-heparin tubes prior to analyses. Samples were always collected at the same time of day to minimize circadian variations. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by centrifugation over

a Ficoll-Hypaque (Sigma) gradient (900 g, 30 min). Cells were counted by means of microscopy (100 x) and viability always exceeded 95%, as judged from their ability to exclude trypan blue (Sigma).

#### **10.2.8. Cell cultures and steroid sensitivity assays**

To assess the production of immunoreactive GH, PBMCs ( $1.5 \times 10^5$  cells/mL) were stimulated with 0.2  $\mu\text{g/mL}$  of endotoxin (LPS, *E. coli*, Sigma) or PHA 1% (Gibco) in complete medium (RPMI-1640, supplemented with gentamicin 0.5%, glutamine 1%, hepes 1%, and fetal calf serum 10%; all from Sigma) for 24h and 96h respectively at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Supernatants were collected by aspiration at the end cultures and immunoreactive GH measured by radioimmunoassays.

Peripheral sensitivity to hormones was estimated by functional assays developed to measure the ability of steroids to suppress T-cell proliferation *in vitro*. T-cell proliferation was evaluated by incubating PBMCs ( $1.5 \times 10^5$  cells/well) with phytohemagglutinin (PHA 2, 1 and 0.5%, Gibco) in complete culture medium for 96 h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. DEX (selective type II adrenal receptor agonist) and cortisol (which binds to both types of adrenal receptors) were added in duplicates (50  $\mu\text{l/well}$ ; both water-soluble substances purchased from Sigma) to mitogen-stimulated lymphocyte cultures. Glucocorticoid concentrations were used in a range ( $10^{-9}$  to  $10^{-4}$  M) that free GCs would reach during resting state ( $10^{-8}$  M), stress ( $10^{-6}$  M), or under pharmacological treatment ( $10^{-5}$  M) *in vivo* (Kirschbaum, Prussner *et al.*, 1995; Wilckens e De Rijk, 1997). Only two optimal DHEA concentrations ( $10^{-6}$  and  $10^{-5}$  M) were used because of unresponsiveness of lower concentrations and toxicity of higher doses (i.e.  $> 10^{-5}$  M). One optimum PHA concentration (1%) was used for all steroid cultures. Fifty microlitres of culture medium were added to all stimulated cultures. In spontaneous (without lectin) cultures, mitogen was replaced by 150  $\mu\text{l}$  of culture medium. Data are presented as percentage of basal proliferation (0; PHA 1% without steroids).

### **10.2.9. Cell proliferation/viability assay**

The proliferative responses were determined by a modified colorimetric assay (Mosmann, 1983). In the last 4 h of culture, 100  $\mu$ l of the supernatant was gently discarded and 30  $\mu$ l of freshly prepared MTT (3-(4,5-diamethyl 2-thiazolyl) 2,5 diphenyl-2H-tetrazolium, Sigma) solution (5 mg/ml in RPMI-1640) was added to each well. The dehydrogenase enzymes in metabolically active cells convert this substrate to formazan, producing a dark blue precipitate. The cell cultures were incubated for 4h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. After completely removal of the supernatant, 100  $\mu$ l of dimethyl sulfoxide (Sigma) was added to each well. The optical density (OD) was determined using Biorad ELISA plate reader at a wavelength of 570 and 630 nm. Proliferation/viability was expressed as OD of stimulated – OD of nonstimulated cultures.

### **10.2.10. Statistical analysis**

All variables were tested for normality of distribution by means of the Kolmogorov-Smirnov test. The salivary DHEA levels were log-transformed to correct for skewed distributions. Proliferation and salivary DHEA data were analyzed by repeated measures ANOVA that included one between-subjects variable (elderly versus young) and one within-subjects variable (DHEA, mitogen or steroid levels). Multiple comparisons among levels were checked with Bonferroni post hoc test. Differences between demographic and nutritional variables were assessed by Student's *t* test and differences in proportions between groups were tested by means of  $\chi^2$  test. The area under the curve (AUC) of hormonal data and *in vitro* DEX responses was estimated using the trapezoidal rule. The dexamethasone concentration that provided 50% inhibition (IC<sub>50</sub>) of lymphocyte proliferation was estimated by non-linear regression (Prism 4.0, Graphpad software, USA). A sigmoidal dose-response equation was chosen to fit the data ( $R^2$  higher than 0.95). Interrelationships between variables were analyzed by both univariate (Pearson correlation) and multivariate analyses (multiple regression). For the corre-

lational analyses, psychological variables (depression, anxiety, stress) were grouped into a single score (EMOT) by means of principal components analysis (PCA) and corresponded to 73% of the variance. Data are expressed as mean  $\pm$  SE in all figures and tables. A statistical software (SPSS 11.5, USA) was used for the analyses.

### **10.3. RESULTS**

#### ***10.3.1. Demographic data and nutritional analyses***

This study included a robust screening for strictly healthy subjects to control for diseases that would be interfering with the neuroendocrine and immunological analyses. All subjects were recruited accordingly to the SENIEUR protocol (Ligthart, Corberand, Fournier, Galanaud, Humans, Kennes, Möller-Hermelink *et al.*, 1984) that defines rigorous criteria for selecting healthy individuals. Based on these criteria, 4.11% of strictly healthy elders were recruited and demographic and nutritional data are summarized in Table . Most elderly (95.6%) and young subjects (81.0%) were Caucasian and the female/male ratio ( $\chi^2 = 1.35$ ,  $p = 0.25$ ) or smoking habits ( $\chi^2 = 5.51$ ,  $p = 0.14$ ) did not differ between groups.

In order to ensure that only strictly healthy individuals were selected, the nutritional status was also investigated in this study. The elderly subjects had an elevated body mass index ( $27.18 \pm 0.84$ ) compared to young adults ( $22.89 \pm 0.63$ ),  $p = 0.0001$ . No statistically significant differences were noted for the total serum proteins, vitamin 12 or albumin levels between elders and young individuals (Table ). In contrast, elders had significant higher folic acid and ferritin levels compared to young adults. Nevertheless, both variables were found within the normal reference range (folic acid: 3-17 ng/ml and ferritin: 9-370 ng/ml). In addition, a complete hematological analysis in these cohorts revealed no age-related changes (i.e. lymphocyte counts, hemoglobin, etc.) (Collaziol, Luz *et al.*, 2004).

**Table 4.** Sample characteristics.

<b>Variable</b>	<b>Young Adults (n=33)</b>	<b>Elderly (n=46)</b>	<b>Significance</b>
Age (yrs)	27.42 ± 1.16	72.00 ± 1.25	p < 0.0001
Race	81.00%	95.60%	NS
	Caucasian	Caucasian	
Gender (female)	54.54%	67.39%	NS
Weight (kg)	67.14 ± 2.27	68.64 ± 1.95	NS
Height (m)	1.71 ± 0.01	1.58 ± 0.01	p < 0.0001
BMI	22.89 ± 0.63	27.18 ± 0.83	p = 0.0001
TSP (g/dL)	7.31 ± 0.12	7.05 ± 0.15	NS
Albumin (g/dL)	3.92 ± 0.11	3.80 ± 0.09	NS
Vitamin B12 (pg/mL)	495.31 ± 47.66	516.87 ± 29.73	NS
Folic acid (ng/mL)	5.02 ± 0.46	7.00 ± .44	p = 0.003
Ferritin (ng/mL)	112.30 ± 16.61	179.67 ± 21.34	p = 0.01
Stress (Q1)	2.10 ± 0.32	4.09 ± 0.37	p < 0.0001
Stress (Q2)	2.65 ± 0.50	4.98 ± 0.41	p < 0.001
Stress (Q3)	3.77 ± 0.67	6.22 ± 0.63	p < 0.01
Anxiety	3.29 ± 0.59	5.00 ± 0.35	p < 0.001
Depression	17.94 ± 2.69	29.40 ± 1.87	p < 0.01

BMI = body mass index. TSP = total serum proteins. NS = non-significant.  
Data expressed as mean ± SE.

### **10.3.2. Psychological assessment**

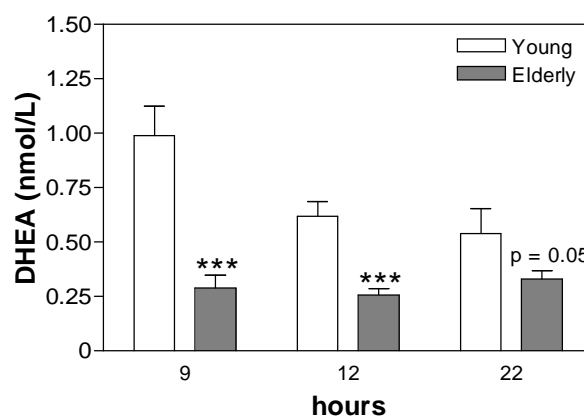
We have previously demonstrated that this healthy elderly population was significantly distressed (Luz, Dornelles, Preissler, Collaziol, Cruz *et al.*, 2003). In particular, it was observed that elders were more depressed (p = 0.005), anxious (p = 0.001) and stressed (p < 0.001) than young adults (Table 1). When questioned regarding the prevalence of the stressors (or life events), the stressed elderly reported the following complaints: 29% felt useless and with difficulties to do their house work, 22% complained of reduced libido, 21% were grieving for the loss of a relative or friend, 15% felt completely incompetent, 5% wanted to run away and restart their lives again and 3% reported of being rejected by the family or society. In contrast, the young stressed adults displayed a completely different set of stressors: 34% had work-related problems, 20% complained of university exams, 20% worried about their financial situation,

14% had problems in coping with their family and 12% had problems with their partners.

### 10.3.3. DHEA assessments

We have recently observed that elderly subjects had significantly higher (~45%) salivary cortisol levels during the day compared to young adults (Collaziol, Luz *et al.*, 2004). In this study, we further assessed the adrenal function of this cohort by means of reliably measurements of salivary (free) DHEA across the day (Fig. 6). Elders had significantly lower salivary DHEA levels compared to young adults,  $F(1,64) = 31.91$ ,  $p < 0.0001$ . Accordingly, we observed that elders presented significantly lower AUC DHEA levels compared to young adults ( $3.75 \pm 0.40$  nmol/L vs.  $8.15 \pm 0.86$  nmol/L, respectively),  $t = 5.28$ ,  $df = 67$ ,  $p < 0.0001$ .

In addition, there was a significant interaction between DHEA levels vs. group,  $F(2,128) = 12.02$ ,  $p < 0.0001$ . Post hoc analyses revealed that only the young adults displayed a regular circadian pattern, with peak DHEA levels in the morning and lower levels in the evening ( $p < 0.05$ ). In contrast, the elderly subjects presented a flat cir-



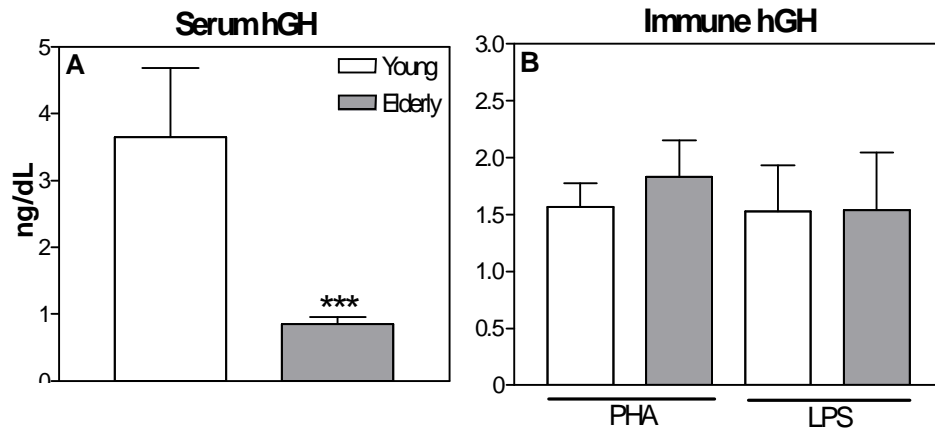
cadian pattern. Furthermore, morning serum (total) DHEA levels were found significantly reduced in the elderly ( $0.34 \pm 0.07$  pmol/L) compared to young subjects ( $1.19 \pm 0.19$  pmol/L),  $t = 5.63$ ,  $df = 70$ ,  $p < 0.0001$ .

**Figure 6.** Circadian pattern of salivary DHEA. Salivary DHEA levels were detected by RIAs. The mean ( $\pm$  SE) levels of DHEA at each time point are shown. Statistically significant differences are indicated: \*\*\*  $p < 0.001$ .

#### **10.3.4. Serum versus immunoreactive GH**

We investigated somatosenescence by evaluation of serum GH levels. We found that elders had significantly lower (-77%,  $p = 0.003$ ) serum GH levels compared to young adults. Peripheral immunoreactive GH levels were also measured to investigate whether immunosenescence could parallel somatosenescence. However, cells of elders produced similar immunoreactive GH when compared to young adults (Fig. 7). This was observed for both stimulated monocytes or lymphocytes.

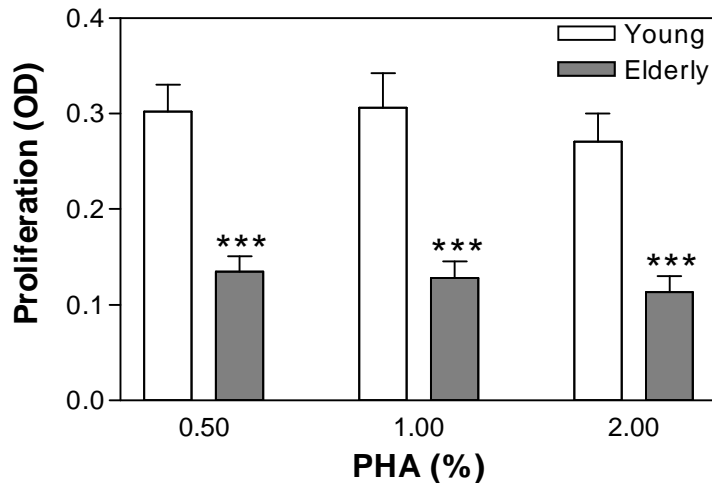




**Figure 7.** Serum (A) versus immunoreactive GH (B). PBMCs were isolated and cells were stimulated *in vitro* with phytohemagglutinin (PHA) or lipopolysaccharide (LPS) for 96 and 24h respectively. Growth hormone levels were checked by RIAs. Data are shown as mean  $\pm$  SE. \*\*\* = 0.003.

### 10.3.5. Lymphocyte proliferation and sensitivity to steroids

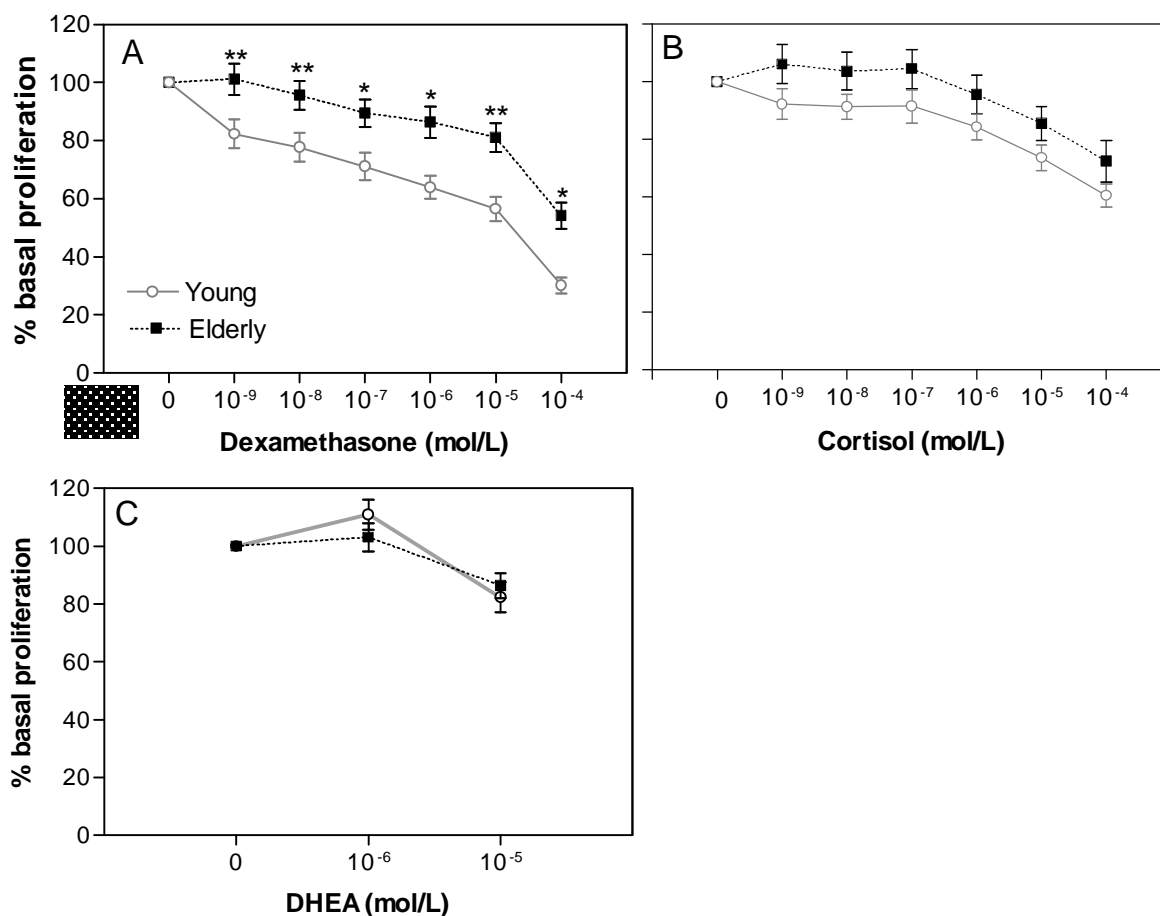
Mitogen-induced T cell proliferation was evaluated as an index of non-specific cell-mediated immunity. Basal proliferation/viability was found slightly increased in elderly (OD =  $0.20 \pm 0.007$ ) compared to young subjects (OD =  $0.17 \pm 0.10$ ),  $t = 2.28$ ,  $df = 50.41$ ,  $p = 0.03$ . PHA-induced proliferative responses differed significantly across the three mitogen concentrations (Fig. 8),  $F(2,134) = 7.57$ ,  $p = 0.001$ . Repeated measures ANOVA revealed that elderly had significantly lower PHA proliferation than young subjects,  $F(1,67) = 25.14$ ,  $p < 0.0001$ . There was not a statistically significant interaction between group (elderly vs. young) and mitogen concentration,  $F(2,134) = 0.18$ ,  $p = 0.83$ .



**Figure 8.** T-cell proliferation. Results are shown as OD stimulated – OD non-stimulated cultures. PHA = phytohemagglutinin. Statistical significance differences are indicated: \*\*\*  $p < 0.001$ .

In view of evidence that, during chronic GC exposure, lymphocytes appear to become resistant to the immunosuppressive effects of steroids (Bauer, M. E., Vedhara, K. *et al.*, 2000) we examined lymphocyte sensitivity to steroids in both elderly and young adults. This was explored by incubating PHA-stimulated peripheral lymphocytes with steroids. DEX, cortisol and DHEA produced significant dose-dependent suppression of T-cell proliferation (all  $p < 0.0001$ ). These data highlight the efficacy of these steroids in suppressing *in vitro* proliferation. Interestingly, we observed that lymphocytes from healthy elders were less sensitive to *in vitro* GC treatment compared with young subjects (Fig. 9A). In particular, it was observed that cells from elders required higher DEX concentrations to suppress PHA proliferation to the same extent as cells from young subjects,  $F(1,72) = 8.19$ ,  $p = 0.006$ . In particular, cells from elders required 3.14 times more DEX to suppress proliferation than cells of young subjects, as estimated by the pharmacological index  $IC_{50}$  ( $2.17 \times 10^{-5}$  versus  $6.90 \times 10^{-6}$  respectively). Although cortisol treatment produced a similar effect (Fig. 9B), it did not reach statistical significance,  $F(1,66) = 1.64$ ,  $p = 0.20$ . Lymphocytes from young adults and elders pre-

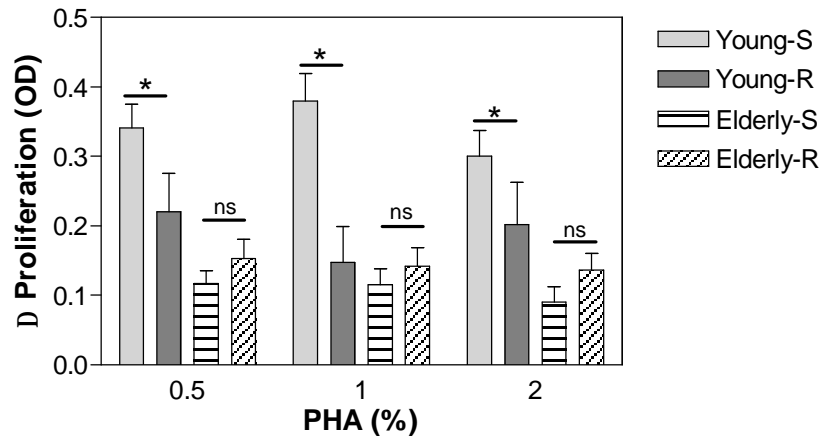
sented similar sensitivities to DHEA treatment *in vitro* (Fig. 4C),  $F(1,72) = 0.11$ ,  $p = 0.74$ .



**Figure 9.** Lymphocyte sensitivity to glucocorticoids *in vitro*. Data presented as percentage of basal proliferation (0 = PHA 1% without steroids). Statistical significance differences are indicated: \*\*  $p < 0.01$  and \*  $p < 0.05$  (Tukey).

We then investigated the proportion of individuals who were more sensitive or resistant to DEX effects. Subjects were classified as “resistant” when AUC DEX was higher than its median values (Elderly:  $> 400.4$  nmol/L/h; Young adults :  $> 352.1$  nmol/L/h). There was an increased proportion of DEX resistant subjects in the elderly group (48.9%) compared to young adults (28.6%), although this only approached statistical significance,  $\chi^2 = 2.94$ ,  $df = 1$ ,  $p = 0.08$ .

We then sought to investigate to what extent the peripheral cellular sensitivity to DEX is associated to lymphocyte proliferation. An interesting picture emerged when these sensitive/resistant subgroups were re-analyzed for PHA proliferation (Fig. 10).



**Figure 10.** T-cell proliferation and peripheral sensitivity to glucocorticoids. Subjects were classified into sensitive (S) and resistant (R) to *in vitro* DEX treatment. PHA = phytohemagglutinin. Statistical significance differences are indicated: \*  $p < 0.05$ .

T-cell proliferation of DEX “resistant” and “sensitive” subjects differed significantly,  $F(1,63) = 13.60$ ,  $p < 0.0001$ . Post hoc analyses revealed that cells of “resistant” elders displayed higher PHA proliferation than cells of “sensitive” elders, although it did not reach statistical significance. A remarkable different picture emerged for the young adults: “sensitive” subjects had higher proliferative responses than “resistant” individuals ( $p < 0.05$ ). In fact, proliferation of “resistant” young adults was as low as proliferation of “sensitive” or “resistant” elders.

### 10.3.6. Interrelationships

Interrelationships between psychological, endocrine and immunological variables were checked by means of univariate analyses. First, we investigated whether psychological distress was correlated with serum hormones and immunological variables. Psychological scores (EMOT) were negatively correlated to salivary AUC DHEA

( $r = -0.43$ ,  $p < 0.0001$ ) and serum GH levels ( $r = -0.26$ ,  $p < 0.05$ ). EMOT and AUC DHEA were not found statistically correlated to any immunological variable. However, serum GH was found positively associated to mitogen-stimulated T-cell proliferation ( $r = 0.31$ ,  $p < 0.01$ ). Somatosenescence was not found associated with cellular production of immunoreactive GH.

To further explore what characteristics were predictive of endocrine variables, multivariate analyses were also performed including those variables found to be statistically associated with peripheral hormones (Table 5).

**Table 5.** Multiple regression analyses for endocrine variables.  $R^2$  is the percentage of explained variance.

<i>Dependent Variables</i>	<i>Predictors</i>	<i>Standardized coefficients (b)</i>	<i>Significance</i>	<i>R<sup>2</sup> (%)</i>
<b>AUC DHEA</b>	Age	-0.36	0.003	54.0
	EMOT	-0.26	0.03	
<b>AUC GH</b>	Age	-0.32	0.01	38.0
	EMOT	-0.11	0.34	

AUC = area under the curve; EMOT = emotional score calculated by principal components analysis grouping stress, anxiety and depression

Multiple regression analyses were thus conducted using the Age and EMOT as predictors of both DHEA and GH variability. Multiple regression analyses revealed that both Age and EMOT contributed significantly ( $R^2 = 54\%$ ) for the variation observed in DHEA. However, it was found that only Age contributed for the serum GH variation ( $R^2 = 38\%$ ).

#### **10.4. DISCUSSION**

Ageing is associated with several immune-related diseases including neoplasias, autoimmune and infectious diseases. However, this altered morbidity is not evenly

distributed and should be thus influenced by other immune-modulating factors. It has repeatedly been shown that there is a bidirectional communication between the nervous system, endocrine and immune system (Blalock, 1989). In this study we explored the role of psychoneuroendocrine factors in regulating some parameters of cell-mediated immunity in the elderly. To control for age-related diseases that would interfere with our immunological analyses, strictly healthy individuals were recruited by means of the SENIEUR protocol (Ligthart, Corberand, Fournier, Galanaud, Humans, Kennes, Möller-Hermelink *et al.*, 1984) from 1,118 community-dwelling elders. We observed that SENIEUR elders had elevated BMI compared to young adults. Changes in BMI could be related to both obesity and lack of regular exercise that have been implicated to immunological changes (Pedersen e Toft, 2000; Lamas, Marti *et al.*, 2002). However, our elderly cohort did not seem to have nutritional changes as they reported no changes in serum vitamin B12 levels and significantly higher ferritin and folic acid levels compared to young adults. Nutritional analyses should be taken into consideration in future ageing studies to provide a further advantage to the SENIEUR protocol in recruiting strictly healthy individuals.

We demonstrated that healthy ageing is associated with significant psychological distress. It is noteworthy to address here, however, that the elderly subjects investigated in this study were not suffering from clinical depression or chronic stress. In fact, all were non-institutionalized and socially active individuals. The literature regarding age-related psychological changes is controversial and others did not find these changes (Nolen-Hoeksema e Ahrens, 2002b). This could be due to methodological issues, since specific clinical interviews are required to assess depression in the elderly. For instance, most elderly subjects do not clearly declare symptoms of sadness and tiredness and are more inclined to pretend their feelings in order to act more self-defensively towards questions that may threaten their self-esteem (Snowdon, 2001b).

We observed that healthy elderly subjects had reduced serum and salivary DHEA levels compared to young adults. These data are in agreement with previous studies (Migeon, Keller *et al.*, 1957b; Candore, Dilorenzo *et al.*, 1992; Deuschle, Gotthardt *et al.*, 1997). However, it should be noted that most studies have previously undertaken misleading one time point evaluation of peripheral hormones. In this study, multiple daily salivary sampling lead us to describe that elders presented a flat circadian pattern for salivary DHEA production. Healthy elders had also increased cortisol/DHEA ratios compared to young adults (data not shown). Indeed, we have recently observed that strictly healthy ageing was associated with increased salivary cortisol production (Luz, Dornelles, Preissler, Collaziol, Cruz *et al.*, 2003). Data presented here suggest that psychological distress contributed significantly to the variation observed for DHEA levels. Although correlation does not prove causal relationship, it indicates that this line of evidence should merit further investigation. Taken together these data suggest that healthy ageing is associated with significant neuroendocrine changes that may parallel psychological alterations observed during ageing.

In accordance to previous work (Corpas, Harman *et al.*, 1993), we reported here that healthy ageing is also associated with significant drop in serum GH levels (i.e. somatosenescence). Furthermore, we demonstrated here the psychological status has little effects on serum GH levels. The lack of peripheral GH-immune signalling may be detrimental for immunosenescence. In particular, in GH-deficient rodents, there is significant immune dysfunction, which is reversed after GH replacement (Kelley, 1990). In addition, treatment with recombinant human GH (rhGH) or rhIGF-I enhances immune function in monkeys (Leroith, Yanowski *et al.*, 1996). However, GH is not exclusively produced by pituitary gland and human immune cells are also able to secrete several neuropeptides including GH (Weigent, Baxter *et al.*, 1988; Hattori, Ikekubo *et al.*, 1994). Immunoreactive GH has immuno-enhancing proprieties, including increased INF- $\gamma$  production, and may be thus important in modulating both humoral and cellular immune

function (Weigent, Baxter *et al.*, 1988; Malarkey, Wang *et al.*, 2002). Here, we provided some evidence that reduced peripheral GH levels are possibly not capable of changing the production of immunoreactive GH. It was found that both stimulated lymphocytes and monocytes from elders were fully capable of secreting immunoreactive GH. Therapies designed to enhance immunoreactive GH production may be of clinical value for the elderly.

In accordance to previous studies (Murasko, Weiner *et al.*, 1987; Blauer, Poth *et al.*, 1991; Liu, Wang *et al.*, 1997a; Castle, Uyemura *et al.*, 1999; Douziech, Seres *et al.*, 2002; Schindowski, Frohlich *et al.*, 2002), we observed that healthy elders had significant lower (-53.6%) T-cell proliferation. Blunted lymphocyte proliferation is indeed one of the most documented age-related change observed across different species and may thus possible contribute to a poor *in vivo* immune response against new antigens. This specific change may be related to several underlying mechanisms, including: thymic involution, cytokine changes (i.e. lower IL-2 and higher IL-10 production), alterations in cell trafficking, decreased replicative senescence and accessory cell function (Pawelec, Barnett *et al.*, 2002a). In addition, elders had a minor but statistically significant increase of unstimulated PBMC viability/proliferation. This change could be attributable to monocytes as these cells remain viable in culture. However, no changes in peripheral counts of monocytes or lymphocytes were noted in this cohort (Collaziol, Luz *et al.*, 2004).

The measurement of peripheral hormones may not be sufficient to finally determine the functional hormonal action in target tissues. Therefore, to further examine the cross talk between peripheral hormones and immune system, we also investigated the lymphocyte sensitivity to both synthetic (DEX) and natural occurring steroids (cortisol and DHEA). We reported that strictly healthy (SENIEUR) ageing is associated with reduced lymphocyte sensitivity to DEX. These data indicated that healthy ageing is associated with alterations in neuroendocrine-immunoregulation. Furthermore, this age-



related change in steroid sensitivity seems to be type II adrenal receptor-specific since cells from elders and young adults showed a comparable lymphocyte sensitivity to cortisol (which binds to both type I and II receptors). There is considerable evidence for a shift in lymphocyte sensitivity to GCs during the ontogeny. For instance, peripheral T-cells of infants younger than 12 months have been reported to be highly sensitive to DEX treatment *in vitro* (Kavelaars, Cats *et al.*, 1996). After this period the lymphocyte sensitivity to steroids is gradually decreasing, reaching the adult levels at one year of life. A reduced sensitivity to GCs can also be observed at the central level during ageing. Indeed, higher cortisol levels in old than in young subjects have been described during some pharmacological challenges, such as the DEX suppression test, the stimulation by human or ovine corticotrophin-releasing hormone or by physostigmine (Raskind, Peskind *et al.*, 1994; Ferrari, Cravello, Muzzoni, Casarotti *et al.*, 2001).

The mechanisms underlying acquired steroid resistance are poorly understood. Based on our previous observations (Luz, Dornelles, Preissler, Collaziol, Cruz *et al.*, 2003) we suggest that higher cortisol levels would render lymphocytes to be less sensitive to the effects of GCs *in vitro*. Indeed, there is some evidence in the literature suggesting that changes in GC sensitivity could be the result of chronic GC treatment (Kloet, 1991; Chiappelli, Manfrini *et al.*, 1994). Reduced intracellular GC receptors may account for the putative underlying mechanisms of age-related GC resistance (Risdon, Moore *et al.*, 1991; Zovato, Simoncini *et al.*, 1996; Grasso, Lodi *et al.*, 1997) but changes in GC receptor affinity cannot be ruled out. Glucocorticoid-induced acquired resistance may have an important physiological significance of protecting cells from the dangerous effects of prolonged GC-related immunosuppression. Additionally, altered steroid immunoregulation may have important therapeutic implications in clinical situations where GCs are administered, including treatment of autoimmune diseases, organ transplantation, and allergies.

Our data also illustrate a functional cross-talk between cellular sensitivity to GCs and T-cell proliferation. In particular, we showed that T cells of young adults who were sensitive to DEX had the highest T-cell proliferation. Conversely, cells of elders sensitive to DEX had the lowest T-cell proliferation (Fig.4). These data indicate the physiological significance of GC sensitivity in the regulation of cell-mediated immunity. Our data are in accordance with recent work indicating the dual role of GCs on peripheral human lymphocytes – both immunostimulatory and immunosuppressive at the same time (Galon, Franchimont *et al.*, 2002). In addition, cellular sensitivity to GCs can be differentially modulated by cytokines. Franchimont *et al.* (1999) have shown that TNF- $\alpha$  decreases and IL-10 increases the sensitivity of human monocytes to dexamethasone via down or upregulation of GRs respectively. The functional cross-talk at the molecular level between immune signals and GCs is essential to determine the biological response to both mediators and constitutes the ultimate level of interaction between the immune and neuroendocrine mediators (Refojo, Liberman *et al.*, 2003). The functional cross-talk between immune signals and GCs could also be interpreted from an evolutionary perspective as being of adaptive significance. In a “low cortisol milieu” (young subjects), the net cortisol effects on the immune system may be stimulatory in subjects who are sensitive to steroids. Conversely, in a “high cortisol milieu” (stress or ageing), subjects who are sensitive to steroids would be of higher risk for steroid-related immunosuppression.

Overall, our data suggest that ageing is associated with changes in neuroendocrine-immunoregulation. We particularly demonstrated that lymphocyte responses were associated with altered lymphocyte sensitivity to a synthetic GC. However, the underlying mechanisms of acquired steroid resistance require further investigation. In addition, we do not know yet whether this altered GC sensitivity is associated with resistance to other medications and we are currently investigating this possibility.

## **Acknowledgements**

The authors would like to acknowledge the excellent technical assistance of Ingrid Manfredi (Office for Social Care, Gravataí). We are grateful to the city hall of Gravataí for setting up special facilities for the recruitment of the elderly subjects. We thank Dr Sidia Marques (Department of Genetics, UFRGS, Porto Alegre, Brazil) and Dr Luiz Glock (PUCRS) for statistical assistance. This study was supported by grants from FAPERGS (00/0168.9, M.E.B.) and CNPq (551180/01-3, M.E.B.).

## 11. DISCUSSÃO GERAL

---

As alterações do sistema imune no envelhecimento (*imunossenescência*) são as principais causas que contribuem para o aumento da morbidade e mortalidade em idosos, devido ao aumento da susceptibilidade às infecções, aumento de doenças autoimunes e maior incidência de neoplasias (Castle, 2000). Entretanto, esta susceptibilidade não é distribuída uniformemente nos idosos, devido a possível influência de outros fatores que alteram a imunidade, como as variáveis psiconeuroendócrinas. Baseado nisso, investigamos o papel das emoções e hormônios do estresse na imunidade celular de idosos estritamente saudáveis. De um modo geral, os resultados obtidos neste estudo sugerem duas implicações importantes para a imunogerontologia. Primeiro, as alterações imunológicas do envelhecimento não constituem necessariamente senescência já que algumas respostas imunes estão preservadas quando comparadas com amostras de adultos jovens. Esses achados vão ao encontro da teoria do envelhecimento bem sucedido ou “remodelling immunosenescence” (Franceschi, Monti *et al.*, 1996). Nossos dados sugerem que os fatores psiconeuroendócrinos estão implicados na regulação da resposta imune durante o envelhecimento humano. Apresento abaixo algumas considerações gerais sobre os nossos principais resultados.

### 11.1. ENVELHECIMENTO SAUDÁVEL VERSUS PATOLÓGICO

O envelhecimento é um fenômeno caracterizado por inúmeras mudanças morfofisiológicas que contribuem para morbidade e mortalidade do idoso. Contudo, o envelhecimento normal ou fisiológico, apesar de todas as vicissitudes impostas pela idade, possibilita o idoso ter vida plena, produtiva e socialmente ativa (Cangulhem, 1995). O envelhecimento patológico está associado ao acometimento inúmeras doenças (i.e, doenças cardiovasculares, diabetes e infecções) e disfuncionalidades que levam indivíduos idosos à incapacidade total ou parcial – tornando-os dependentes dos cuidados

de terceiros, limitado assim, o exercício de sua autonomia (Baltes, 1995) (Cangulhem, 1995).

Com o objetivo de controlar para as doenças relacionadas à idade que poderiam interferir em nossas análises neuroimunológicas, recrutamos indivíduos estritamente saudáveis através do protocolo SENIEUR (Ligthart, Corberand, Fournier, Galanaud, Humans, Kennes, MLLer-Hermelink *et al.*, 1984). Este protocolo estabelece critérios rigorosos para a seleção os indivíduos saudáveis, baseados em investigações clínicas, hematológicas e bioquímicas. Para garantir a qualidade de saúde dos indivíduos selecionados, realizamos ainda uma avaliação nutricional dos mesmos. A partir de uma população de 1118 idosos da comunidade de Gravataí (RS), conseguimos recrutar 46 idosos (4,1%) estritamente saudáveis. Estes critérios possibilitaram explorar as alterações específicas do envelhecimento saudável, sem as possíveis interferências de outras alterações relacionadas ao processo de envelhecimento. Dessa maneira, podemos entender o protocolo SENIEUR como um bom instrumento para identificar o “envelhecimento bem-sucedido”. No entanto, deve-se levar em consideração que os indivíduos recrutados pelo protocolo SENIEUR não representam a população de idosos em geral, já que estes não apresentam as doenças comumente observadas no envelhecimento.

As análises nutricionais garantiram o estudo de uma população estritamente saudável. Confirmando os critérios rigorosos do protocolo SENIEUR, nossa *coorte* de idosos não apresentava alterações nutricionais – com níveis de vitamina B12, ácido fólico e ferritina dentro da normalidade quando comparada com os jovens adultos. Apesar do controle rigoroso no recrutamento, outros comportamentos podem ter influenciado as análises imunogerontológicas. Por exemplo, existem evidências que as alterações do ciclo sono-vigília durante o envelhecimento são capazes de produzir alterações imunológicas (Vgontzas An, 1999). Neste estudo, nós também analisamos o ciclo sono-vigília nesta *coorte* de idosos através do instrumento PSQI (The Pittsburgh Sleep

Quality Index), que avalia a qualidade e o padrão de sono no envelhecimento (dados não apresentados). Os idosos apresentaram alterações significativas nas fases inicial e intermediária do sono, como a dificuldade conciliar o sono, fragmentação e uma redução da quantidade de horas dormidas, associados à fadiga, irritabilidade, incapacidade de se concentrar, dificuldades de atenção e memória, mal-estar e sonolência no dia seguinte. O sono é um processo restaurador, que influencia na regulação homeostática dos sistemas autonômico, neuroendócrino e imune (Horne, 1988; Dinges Df, 1995). Logo, as alterações de padrão e de qualidade do sono podem implicar em alterações nestes sistemas. Isso será explorado nos próximos estudos.

## **11.2. ALTERAÇÕES PSICOLÓGICAS NO ENVELHECIMENTO**

Apesar de serem estritamente saudáveis, nós observamos que os idosos estavam significativamente mais estressados, deprimidos e ansiosos que os jovens adultos. É importante salientar que os idosos não tinham diagnóstico clínico de depressão ou transtornos da ansiedade. Dessa forma, o envelhecimento está associado com mudanças emocionais que podem ser resumidas por vários fatores estressores: incapacidade para trabalhar e exclusão social, problemas para realizar suas atividades domésticas, problemas sexuais e perdas de parentes ou amigos (dados obtidos nas entrevistas).

Apesar de alguns estudos considerarem a alteração psicológica no envelhecimento uma questão controversa devido a sua comorbidade com outras patologias clínicas (Nolen-Hoeksema e Ahrens, 2002a), é provável que tais evidências possam estar relacionados à falhas metodológicas, uma vez que não são exigidos instrumentos clínicos específicos para avaliar a depressão no idoso. Por exemplo, muitos dos idosos não relatam sintomas de tristeza e fadiga claramente e tendem a omitir seus sentimentos para agir mais defensivamente as perguntas que podem constituir uma ameaça a sua auto-estima (Snowdon, 2001a)

Além da avaliação psicométrica, as estratégias de enfrentamento e os traços de personalidade devem influenciar a percepção dos estressores no envelhecimento. Nesse sentido, contudo, poucos estudos investigaram a reatividade dos idosos em situações de estresse agudo. Relatos de estudos que investigaram os mecanismos de enfrentamento utilizados por idosos frente a situações adversas, dividiram as formas de enfrentamento de duas maneiras distintas: o enfrentamento focalizado no problema ou na emoção (Lazarus Rs, 1991). Os mecanismos focalizados na emoção mais citados foram: a fé em Deus (Frankl, 2003), ajuda da família e de outros (Trentini M, 2003), o trabalho (Siqueira, 2001), o grupo de convívio de idosos (Cnbb, 2002), cuidado da estética do corpo (Monteiro, 2001). Já os mecanismos focalizados no problema incluíam o tratamento médico e a rejeição às perdas naturais conseqüentes do envelhecimento (Siqueira, 2001; Trentini M, 2003). Estes dados evidenciam que os idosos utilizam mecanismos diferentes frente às situações adversas da vida. Além disso, parece que o tipo de mecanismo utilizado depende principalmente da personalidade e das características individuais (nível de desenvolvimento, gênero, experiência prévia, temperamento), do tipo de estressor (tipo, nível de controlabilidade), do contexto (influência paterna, suporte social) bem como a interação entre esses fatores (Rudolph, 1995) .

Baseado nos achados psicométricos deste estudo, o entendimento de padrões individuais de enfrentamento pode ser aprendido e trazer benefícios para a saúde dos idosos. Nesse sentido, as terapias de relaxamento, incluindo a yoga e o biofeedback, podem ser efetivos em reduzir a carga emocional do idoso e promover a qualidade de vida. Porém, mais estudos são necessários para avaliar a efetividade destas terapias no envelhecimento.

### 11.3. ALTERAÇÕES NEUROENDÓCRINAS NO ENVELHECIMENTO

Paralelamente as mudanças psicológicas, os idosos saudáveis apresentaram um aumento significativo da razão cortisol / DHEA ao longo do dia em comparação com os jovens adultos. Estes dados apóiam estudos prévios (Ferrari, Cravello, Muzzoni, Casaritti *et al.*, 2001) que sugerem que o envelhecimento humano está associado com ativação significativa do eixo HPA .

Neste estudo, as variáveis psicológicas foram correlacionadas com os níveis de cortisol e DHEA onde foi evidenciado que os fatores psicológicos estão associados na ativação do eixo de HPA no envelhecimento saudável. Embora estas associações observadas não refletem relações de causa-efeito, elas podem direcionar os próximos estudos para uma investigação mais detalhada sobre o papel das emoções e alterações hormonais no envelhecimento.

A hiperativação do eixo HPA e conseqüente aumento dos níveis de cortisol, também são características observadas em indivíduos com estresse crônico e com depressão, o que sugere que a presença destas patologias no envelhecimento pode trazer conseqüências indesejáveis à saúde do idoso.

A relação cortisol/DHEA pode ser utilizada com um biomarcador do envelhecimento com ou sem alterações psicológicas, uma vez que é o método mais preciso para determinar o grau funcional de exposição dos tecidos para ação nociva do cortisol. A determinação dos níveis de cortisol isoladamente, sem considerar a ação antagonista do DHEA, pode prover uma estimativa incompleta de hipercortisolemia (Goodyer, Herbert *et al.*, 1998) e reais riscos à saúde.

Estudos previamente demonstraram a importância da determinação da relação cortisol/DHEA no surgimento, permanência ou exacerbação de inúmeras patologias, tanto fisiológicas como psicológicas. Por exemplo, valores aumentados da relação cortisol/DHEA foram descritos em estudos com indivíduos jovens com depressão



(Goodyear, Herbert *et al.*, 1996), demonstrando ser importante para diferenciação clara entre pacientes deprimidos e controles, onde o aumento da relação de cortisol/DHEA pela manhã era preditivo de Depressão Maior persistente (Goodyear, Herbert *et al.*, 2003) e a noite associada com a depressão unipolar em adultos (Young, Gallagher *et al.*, 2002). Outros estudos ainda demonstraram que a relação cortisol/DHEA em indivíduos não deprimidos e melancólicos poderia indicar prejuízos cognitivos e de memória (Young, Gallagher *et al.*, 2002). Valores aumentados da relação cortisol/DHEA também foram observados em indivíduos idosos com importantes perdas cognitivas (Kalmijn, Launer *et al.*, 1998) e prejuízo de memória espacial e episódica (Squire, 1992) (Lupien, Lecours *et al.*, 1994; Seeman, Mcewen *et al.*, 1997; Lupien, De Leon *et al.*, 1998) além de, alterações do humor (Goodyear, Herbert *et al.*, 1996; Reus, Wolkowitz *et al.*, 1997) e aumento da ansiedade (Van Niekerk, Huppert *et al.*, 2001). Estes dados evidenciam as alterações associadas a hipercortisolemia sem a devida ação neuroprotetora do DHEA no CNS (Kimonides, Spillantini *et al.*, 1999) sugerindo ainda que tais alterações poderiam ser atenuadas com a reposição de DHEA (Van Niekerk, Huppert *et al.*, 2001).

As alterações do metabolismo ósseo (e.g. osteoporose e osteopenia) também estão relacionadas ao aumento da relação cortisol/DHEA no envelhecimento. Nestas patologias, os níveis aumentados de cortisol podem promover um aumento da reabsorção e diminuição da formação óssea, além de causar a diminuição da absorção intestinal do cálcio, hipercalcemia e aumento da secreção de PTH (paratormônio), similar aos efeitos observados em indivíduos com Doença de Cushing (Mancini, Doga *et al.*, 2005). Além disso, são observados o aumento da relação cortisol/DHEA associados ao surgimento e / ou agravamento da diabetes (Findling, 2005). Os níveis aumentados de cortisol tornam o organismo menos sensível a insulina e níveis diminuídos de DHEA (Nestler e Jakubowicz, 1996) aumentam a intolerância à glicose (Shimokata, Muller *et al.*, 1991), condições freqüentemente observadas em indivíduos idosos. Es-

tudos recentes demonstraram que indivíduos idosos diabéticos apresentavam níveis de cortisol salivar aumentados (Liu, Bravata *et al.*, 2005) e níveis diminuídos de DHEA (Yamaguchi, Tanaka *et al.*, 1998) quando comparados com idosos não diabéticos. O aumento da relação Cortisol/DHEA em pacientes diabéticos é associado ainda à dificuldade de controle da doença (Couch, 1992) e ao aumento de comorbidades, como arteriosclerose, obesidade visceral, impotência, síndrome metabólica e aumento do risco cardiovascular (Kapoor, Malkin *et al.*, 2005).

#### **11.4. IMPLICAÇÕES DA IMUNOSSENESCÊNCIA PARA A SAÚDE HUMANA**

Na mesma magnitude das alterações hormonais, verificamos que os idosos saudáveis apresentavam uma redução significativa (~30%) na proliferação de células T quando estimuladas por mitógenos e comparados com jovens adultos. A diminuição da proliferação celular é uma mudança relacionada à idade observada em diferentes espécies e pode assim contribuir para uma resposta imune pobre contra novos antígenos. Esta mudança específica pode estar relacionada a vários mecanismos subjacentes, que incluem: a involução tímica, alterações das células de tráfego, diminuída da função das células adicionais, senescência replicativa e alterações na produção e secreção de citocinas (Pawelec, Adibzadeh *et al.*, 2000) A consequência clínica da imunossenescência incluem um aumento da susceptibilidade para doenças infecciosas, como a pneumonia, sepse, vírus influenza da gripe e as infecções do trato urinário, além de aumentar a predisposição de idosos a determinados tipos de neoplasias e a doenças auto-imunes.

Além da proliferação linfocitária, investigamos neste estudo algumas citocinas centrais da imunidade inata que participam de processos inflamatórios e apresentação de antígenos. Contudo, não observamos diferenças significativas na produção das citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-6) induzida por LPS entre os idosos e jovens adultos. Estes dados contrastam com estudos prévios que evidenciaram que o enve-

lhecimento está associado com produção aumentada de citocinas pró-inflamatórias (Fagiolo, Cossarizza *et al.*, 1993; Straub, R., Konecna, L. *et al.*, 1998; Gabriel, Cakman *et al.*, 2002) . Estas discrepâncias podem ser decorrentes de vários fatores, incluindo: diferenças metodológicas nos ensaios e estado geral de saúde dos sujeitos investigados. Em relação a esta última, por exemplo, especula-se que o aumento das citocinas pró-inflamatórias (e.g. IL-6) esteja associado com patologias freqüentemente associadas com o envelhecimento tais como: doenças cardiovasculares, depressão, osteoporose, artrite, diabetes tipo II, alguns tipos de câncer, doença periodontal e fraqueza geral (Vetta, Ronzoni *et al.*, 2001).

Alguns estudos, apontam para o fato que, o aumento dos níveis citocinas pró-inflamatórias (e.g. IL-6) no envelhecimento pode estar relacionado ao declínio dos níveis dos hormônios esteróides, em particular, o DHEA. Há evidências experimentais e epidemiológicas que o declínio de DHEA está diretamente associado com o aumento de IL-6 e que o DHEA inibe a secreção de IL-6 em humanos e nas células mononucleares de ratos (Straub *et al.*, 1998; Padgett e Loria, 1998). Vários outros estudos confirmaram também que a síntese de hormônios esteróides em células do sistema endócrino é influenciada especialmente por citocinas como a IL-6 (Mastorakos, Chrousos *et al.*, 1993)(Mastorakos *et al.*, 1993; Spath-Schwalbe *et al.*, 1994), o TNF- $\alpha$  (Jaattela *et al.*, 1991) e TGF- $\beta$  (Lebrethon *et al.*, 1994), entre outras. Da mesma forma, foram observados que vários hormônios podem modular a função imune, inibindo ou estimulando a produção de citocinas. Isso indica que os sistemas endócrino e imune têm ligações estreitas entre si e ambos com o envelhecimento. Logo, a diminuição significativa dos níveis de DHEA, estrógenos e testosterona que ocorre no envelhecimento poderiam estimular os aumento de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-6 e aumentar a suscetibilidade de várias doenças relacionada à idade. No nosso estudo, contudo, não houve alteração na produção de IL-6.

Nós observamos correlações significativas entre as variáveis psicológicas e a produção de citocinas. Logo, fica difícil de dissociar as mudanças da secreção de citocinas pró-inflamatórias observadas no idoso com àquelas induzidas por estímulos psicológicos. Além disso, observamos níveis similares de sIL-2Ra nas células dos idosos em comparação com os jovens adultos. Este resultado também contrasta com estudos prévios que demonstraram que o envelhecimento era associado o aumento dos níveis séricos sIL-2Ra (Franze, 1996; Rea, 1996) e aumento da produção de sIL-2Ra *in vitro* (Liu, Wang *et al.*, 1997b; Rink, Cakman *et al.*, 1998) , o que incita estudos adicionais.

Neste estudo, também investigamos a sensibilidade de linfócitos para DEX (esteróide agonista sintético para receptor tipo II) e o cortisol (esteróide endógeno). Com base nos resultados obtidos, evidenciamos que os idosos apresentavam uma sensibilidade reduzida para DEX *in vitro*, mas não para cortisol, quando comparados a jovens adultos. Estes dados sugerem que no envelhecimento, os linfócitos de indivíduos idosos parecem ser mais resistentes aos glicocorticóides. Além disso, a resistência a esteróides relacionada com a idade parece estar relacionada ao receptor-específico-adrenal do tipo II, uma vez que, as não foram observadas diferenças na sensibilidade das células entre os idosos e jovens adultos para cortisol – que se liga a ambos os receptores tipo I e tipo II. No estudo de Bauer e colaboradores. (Bauer, M., Vedhara, K. *et al.*, 2000) foi demonstrado que as células dos idosos cronicamente estressados são ainda mais resistentes para o tratamento *in vitro* com DEX, quando comparados com as células de idosos não estressados. Estes dados sugerem que a resistência dos linfócitos a glicocorticóides pode ser uma característica do envelhecimento fisiológico, a qual pode ser acelerada pelo estresse.

Estudos prévios têm demonstrado alterações da sensibilidade a GCs durante a ontogenia humana. Um estudo realizado com bebês recém-nascidos (Kavelaars, Cats *et al.*, 1996) demonstrou que as células T do cordão umbilical apresentavam uma alta

sensibilidade para inibição da resposta proliferativa para DEX nas duas primeiras semanas após o nascimento, seguida de uma redução gradual da sensibilidade, atingindo o padrão de resposta de adultos em torno de 1 ano de idade. É importante salientar que este aumento de sensibilidade do sistema imune dos recém-nascidos ocorre quando níveis de cortisol endógenos, nesta faixa de idade, são baixos. Estes dados sugerem que este aumento da sensibilidade para GCs possa ser um mecanismo compensatório, uma vez que a função regulatória dos GCs é mantida, apesar dos baixos níveis de cortisol circulantes.

Embora os mecanismos reguladores da resistência a GCs sejam pobremente compreendidos, nós sugerimos que níveis de cortisol aumentado produzem linfócitos menos sensíveis aos GCs *in vitro*. A resistência adquirida a induzida por GCs pode ter um significado fisiológico importante na proteção das células aos efeitos nocivos da inibição de prolongada dos GCs. Adicionalmente, a imunorregulação dos GCs alterada pode ter implicações terapêuticas importantes em situações clínicas onde são administrados GCs, como por exemplo, tratamento de doenças autoimunes, transplante de órgãos e alergias. Esses dados indicam que os clínicos devem considerar a idade e o status psicológico quando prescrever GCs aos seus pacientes.

### **11.5. O ESTRESSE E GLICOCORTICÓIDES ACELERAM O ENVELHECIMENTO**

O estresse crônico pode também acelerar o processo de envelhecimento (revisado por (Bauer, 2005). Um claro exemplo disso é o “envelhecimento programado” dos salmões ao subir as corredeiras dos rios para a desova (Mcewen, 1998). O estresse crônico sofrido por esses peixes, gerado pela pressão dos predadores e pela grande tensão física, produz aumento de tamanho das adrenais (devido à intensa produção de glicocorticóides), provocando úlceras, profunda involução do timo e imunossupressão. O animal geralmente morre por múltiplas infecções. No entanto, se as adrenais forem retiradas após a desova, o salmão vive por mais um ano! Esse fenômeno não é exclu-

sivo dos salmões e também ocorre em camundongos marsupiais da Austrália após a reprodução (McDonald, 1981).

Nas populações humanas, existem evidências de que o estresse crônico exacerba as alterações imunológicas observadas no envelhecimento. Indivíduos idosos que vivenciam o estresse crônico podem exibir imunossupressão e maior vulnerabilidade para doenças de que indivíduos idosos não estressados. Idosos que cuidam do seu cônjuge com demência são um modelo de estresse crônico em humanos. No estudo de Bauer (Bauer, M., Vedhara, K. *et al.*, 2000) foi demonstrado que os cuidadores de pacientes com demência do tipo Alzheimer apresentavam níveis aumentados de cortisol, uma diminuição da proliferação de células T e linfócitos mais resistentes ao tratamento *in vitro* com glicocorticóides, quando comparados com idosos não cuidadores. As alterações imunológicas apresentavam proporções semelhantes ao aumento dos níveis de cortisol. Estes dados sugerem que no estresse crônico, os níveis aumentados de cortisol podem acelerar a imunossenescência humana. De fato, foi recentemente demonstrado que o estresse crônico (estresse percebido e o grau de cronicidade do estresse) está significativamente associado com aumento do estresse oxidativo, diminuição da atividade da telomerase e o encurtamento dos telômeros – fatores determinantes da senescência celular e da longevidade (Epel, Blackburn *et al.*, 2004). Essa mesma equipe de investigadores calculou que os linfócitos dos idosos mais estressados eram de 9 - 17 anos mais envelhecidos do que linfócitos dos idosos menos estressados.

Recentes estudos sugerem que o estresse crônico é um importante fator de risco para saúde de populações idosas. Nos estudos prévios que avaliaram indivíduos cuidadores do cônjuge com demência, foi observado que os idosos estressados apresentavam respostas imunes mais pobres para a vacina do vírus da gripe (Kiecolt-Glaser, Glaser *et al.*, 1996; Vedhara, Cox *et al.*, 1999), pneumonia (Glaser, Sheridan *et al.*, 2000), além de apresentar uma cicatrização mais lenta de feridas (Kiecolt-Glaser e

Glaser, 1995), quando comparados com indivíduos controles. Além disso, os cuidadores apresentavam um risco maior para desenvolver hipertensão moderada (Shaw, Patterson *et al.*, 1999) e doenças coronarianas (Vitaliano, Scanlan *et al.*, 2002) – doenças comuns no envelhecimento. Um estudo longitudinal realizado verificou ainda, que o risco relativo de mortalidade entre cuidadores era significativamente mais alto (63%) de que em controles idosos não-cuidadores (Schulz e Beach, 1999).

Mais recentemente, um estudo apontou evidências de que a IL-6 pode estar envolvida no aumento da morbidade de populações de cuidadores (Kiecolt-Glaser, Preacher *et al.*, 2003). Para avaliar o impacto do estresse crônico na produção de IL-6 (Kiecolt-Glaser, Preacher *et al.*, 2003), foi investigado o padrão de mudanças de IL-6 por mais de seis anos em uma grande comunidade de idosos cuidadores de cônjuges com demência e em idosos não cuidadores. Foi observado que a média do aumento de IL-6 em idosos cuidadores era aproximadamente quatro vezes maior que dos não cuidadores. Estes dados evidenciam um mecanismo fundamental pelo qual estressores crônicos podem aumentar o risco exacerbação de doenças relacionadas à idade por envelhecimento prematuro do sistema imune.

## **11.6. OS CENTENÁRIOS**

Alguns idosos parecem gozar de uma saúde excepcional. Os centenários são os melhores exemplos de envelhecimento bem-sucedido, pois escaparam das várias doenças associadas com o envelhecimento e atingiram o limite extremo da vida humana. Em muitos casos, os centenários não têm câncer, diabetes, demências, doenças cardiovasculares ou cataratas. Esse grupo de idosos, logicamente, deve ser equipado com um excelente sistema imunológico, além de uma ótima combinação de estilo de vida e bagagem genética. Assim, os centenários são de grande interesse para a medicina e podem ajudar na identificação de genes envolvidos na prevenção de doenças.

Vários componentes imunológicos estão preservados nos centenários. Um exemplo está no fato de que, apesar de apresentarem diminuição do número de linfócitos T na circulação, eles têm uma proliferação linfocitária tão boa quanto à observada nos adultos (Franceschi, Monti *et al.*, 1996). Além disso, os centenários praticamente não apresentam auto-anticorpos na circulação e exibem uma excelente atividade das células *natural killer* (Mcarthur, 1998) - o que explica a ausência de câncer na maioria dos integrantes desse grupo.

### **11.7. TERAPIAS PARA ATENUAR A IMUNOSSENESCÊNCIA**

Inúmeras terapias já foram testadas com o intuito de atenuar ou reverter o impacto do envelhecimento sobre o sistema imune. Entre elas inclui, a restrição calórica em roedores, uso de antioxidantes e a terapia de reposição hormonal. De todas as tentativas para prolongar a longevidade em animais, a restrição calórica (RC) demonstrou-se a mais eficaz. A RC parece melhorar a proliferação das células T estimuladas com mitógenos, alterar a produção de citocinas (aumenta IL-2, diminui TNF- $\alpha$  e IL-6) e aumentar a proporção de células naíve quando comparados com os controles (Fernandes, Venkatraman *et al.*, 1997). Contudo, outros estudos produziram resultados inconsistentes com animais em RC, observando uma involução tímica acelerada ou resposta imune inalterada (ou mesmo diminuída).

Outros estudos em modelos experimentais testaram os efeitos do transplantes de órgãos imunes primários (timo e medula óssea) no processo de involução do timo. O transplante combinado de células da medula e do timo restaurava a imunidade celular nos animais velhos a níveis observados nos mais jovens. Entretanto, a técnica quando aplicada a humanos apresenta limitações importantes devido à dificuldade de obter doadores geneticamente compatíveis, para minimizar a rejeição às células transplantadas. Logo, outras terapias como, as drogas imunoestimulantes podem ser mais valiosas na redução desse processo fisiológico em humanos.



Através da terapia de reposição com DHEA, já foi possível reverter a imunossenescência em roedores. Foi demonstrado que o DHEA estimula a produção de citocinas associadas com perfil  $T_H1$ , revertendo assim os efeitos negativos do cortisol sobre estas respostas (Daynes e Araneo, 1994). Estudos em humanos, entretanto não forneceram resultados consistentes, apenas referências da melhora da disposição física, sexualidade, humor e da cognição (Wiebke A., 2001). Já a terapia de reposição com GH parecem reverter alguns aspectos da imunossenescência (Gelato, 1996), onde a administração de baixas doses de GH em humanos durante 6 meses resultou num aumento dos níveis de IGF-1 (insulin-like growth factor-1) e melhora de alguns parâmetros fisiológicos, incluindo a força muscular.

Contudo, são ainda inexpressivos os resultados de estudos para aplicação efetiva de conter ou reverter a imunossenescência humana. Porém as alterações imunológicas no envelhecimento estão associadas a múltiplos fatores, como os hormônios, fatores psicológicos e nutrição. As pesquisas desenvolvidas nesta Tese sugerem que uma melhora do funcionamento do sistema imune no envelhecimento pode ser obtida através de uma alimentação saudável e do apoio psicológico e / ou outras intervenções que podem levar a um aumento da qualidade de vida dos idosos. Porém, mais pesquisas são necessárias para promover um envelhecimento saudável.

## 12. CONCLUSÕES

---

- O envelhecimento saudável está associado com importantes alterações emocionais, incluindo níveis aumentados de estresse, ansiedade e depressão.
- Paralelamente às alterações emocionais, os idosos saudáveis apresentaram um aumento significativo da razão cortisol / DHEA em comparação com os jovens adultos – indicando uma ativação significativa do eixo HPA.
- Os idosos apresentavam níveis séricos de GH reduzidos em contrapartida com uma produção inalterada de GH imunorreativo. Isso indica que a somatossenescência não influencia diretamente a capacidade dos monócitos/linfócitos em produzir este neuropeptídeo.
- Os idosos saudáveis apresentavam uma redução significativa (~30%) na proliferação de células T quando estimuladas por mitógenos e comparados com jovens adultos. Isso sugere uma perda importante da imunidade celular.
- Os idosos apresentavam uma sensibilidade reduzida para DEX in vitro, mas não para cortisol e DHEA, quando comparados a jovens adultos. Estes dados sugerem uma desregulação da comunicação neuroimunoendócrina.
- As células dos idosos produzem níveis equivalentes de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-6) quando comparadas com as células dos jovens adultos.
- As células dos idosos também apresentavam níveis similares de liberação de sIL-2R $\alpha$  em comparação com os jovens adultos.
- Os escores emocionais foram correlacionados positivamente com os níveis de cortisol e negativamente com os níveis de DHEA matinais.

- Os níveis de cortisol a noite (22h) foram associados positivamente com os níveis de TNF- $\alpha$  e sIL-2R $\alpha$ .
- Os escores emocionais foram correlacionados negativamente com os níveis salivares de DHEA e GH no soro.
- Os níveis de GH séricos foram associados positivamente com a proliferação linfocitária.

### 13. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

Abbas, A., K. Murphy, *et al.* Functional diversity of helper T lymphocytes. Nature, v.383, p.787-793. 1996.

Abbas, A. L. E. J. P. Imunologia Celular e Molecular. Rio de Janeiro: Editora Revinter. 2005

Agarwal, N., F. Acevedo, *et al.* Predictive ability of various nutritional variables for mortality in elderly people. Am J Clin Nutr, v.48, n.5, p.1173-8. 1988.

Aguilera, G. Regulation of pituitary ACTH secretion during chronic stress. Front.Neuroendocrinol., v.15, p.321-350. 1994.

Almeida, O. P. e S. A. Almeida. Short versions of the geriatric depression scale: a study of their validity for the diagnosis of a major depressive episode according to ICD-10 and DSM-IV. Int J Geriatr Psychiatry, v.14, n.10, p.858-65. 1999.

Almeida, O. P., S. Tamai, *et al.* Sleep complaints among the elderly: results from a survey in a psychogeriatric outpatient clinic in Brazil. Int Psychogeriatr, v.11, n.1, p.47-56. 1999.

Antonica, A., E. Ayroldi, *et al.* Lymphocyte traffic changes induced by monolateral vagal denervation in mouse thymus and peripheral lymphoid organs. J.Neuroimmunol., v.64, p.115-122. 1996.

Araneo, B., M. Woods, *et al.* Reversal of the immunosenescent phenotype by dehydroepiandrosterone: hormone treatment provides an adjuvant effect on the immunization of aged mice with recombinant hepatitis B surface antigen. J.Infect.Dis., v.167, p.830-840. 1993.

Aromaa, A., R. Raitasalo, *et al.* Depression and cardiovascular diseases. Acta Psychiatr Scand, v.377, p.77-82. 1994.

Arvat E, G. L., Grottoli S, Imbimbo Bp, Lenaerts V, Deghenghi R, Et Al. A. Arginine and growth hormone-releasing hormone restore the blunted growth hormone-releasing activity of hexarelin in elderly subjects. J Clin Endocrinol Metab, v.79, n.5, p.1440-3. 1994.

Ashman Sb, D. G., Panagiotides H, Yamada E & Wilkinson Cw. S. 2002;333:340-14. Stress hormone levels of children of depressed mothers. Development and Psychopathology, v.333, p.340-344. 2002.

Baltes, M. M. S. S. A dinâmica da dependência-autonomia no curso de vida. In: L. O. Neri (Ed.). Psicologia do envelhecimento: tópicos selecionados numa perspectiva do curso de vida. Campinas: Papyrus, 1995. A dinâmica da dependência-autonomia no curso de vida

Bateman, A., A. Singh, *et al.* The immune-hypothalamic-pituitary-adrenal axis. Endocr Rev, v.10, n.1, p.92-112. 1989.

Bauer, M., G. Gauer, *et al.* Evaluation of immune parameters in depressed patients. Life Sci., v.57, p.665-674. 1995.

Bauer, M., K. Vedhara, *et al.* Chronic stress in caregivers of dementia patients is associated with reduced lymphocyte sensitivity to glucocorticoids. J.Neuroimmunol., v.103, p.84-92. 2000.

Bauer, M. E. Endocrine-immune interactions in major depression, acute and chronic stress. University of Bristol, Bristol (UK), 1999.

\_\_\_\_\_. Stress, glucocorticoids and ageing of the immune system. Stress, v.8, n.1, p.69-83. 2005.

Bauer, M. E., A. Papadopoulos, *et al.* Dexamethasone-induced effects on lymphocyte distribution and expression of adhesion molecules in treatment resistant major depression. Psychiat.Res., v.113, p.1-15. 2002.

\_\_\_\_\_. Altered glucocorticoid immunoregulation in treatment resistant depression. Psychoneuroendocrinol., v.28, p.49-65. 2003.

Bauer, M. E., K. Vedhara, *et al.* Chronic stress in caregivers of dementia patients is associated with reduced lymphocyte sensitivity to glucocorticoids. J.Neuroimmunol., v.103, p.84-92. 2000.

Baumann, G. Growth hormone heterogeneity: genes, isohormones, variants, and binding proteins. Endocr Rev, v.12, p.424-449. 1991.

Beharka, A. A., M. Meydani, *et al.* Interleukin-6 production does not increase with age. J.Gerontol.A Biol.Sci.Med.Sci., v.56, n.2, p.B81-B88. 2001.

Beishuizen A., T. L. G. A. V., I. Decreased levels of dehydroepiandrosterone sulphate in severe critical illness: a sign of exhausted adrenal reserve? Critical Care, v.6, n.5, p.434-438. 2002.

Belanger a, C. B., Dupont a, Et Al. Changes in serum concentrations of conjugated and unconjugated steroids in 40- to 80-year-old men. J Clin Endocrinol Metab, p.1086-1090. 1994.

Belisle S, S. I., Tulchinsky D. The use of constant infusion of unlabeled dehydroepiandrosterone for the assessment of its metabolic clearance rate, its half-life, and its conversion into estrogens. J. Clin. Endocrinol. Metab., v.50, p.117-121. 1980.

Benedict, R. H. e A. M. Horton, Jr. The construct validity of the Four Word Short-Term Memory Test: a preliminary study. Int.J.Neurosci., v.51, n.1-2, p.69-72. 1990.

Berthier, F., C. Genin, *et al.* Evaluation of an automated immunoassay method for cytokine measurement using the Immulite Immunoassay system. Clin Chem Lab Med, v.37, n.5, p.393-399. 1999.

Besedovsky, H., E. Sorkin, *et al.* Hypothalamic changes during the immune response. Eur.J.Immunol., v.7, p.323-325. 1977.

Bird C.E., M. V., Clark A.F. Dehydroepiandrosterone sulfate:kinetics of metabolism in normal young men and women. Clin. Invest. Med, v.7, p.119-122. 1984.

Blalock, J. A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine system. Physiol.Rev., v.69, p.1-32. 1989.

Blalock, J. E. Molecular mechanisms of bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. Int J Neurosci, v.51, n.3-4, p.363-4. 1990.

\_\_\_\_\_. The syntax of immune-neuroendocrine communications. v.15, n.11, p.504-510. 1994.

Blauer, K., M. Poth, *et al.* Dehydroepiandrosterone antagonizes the suppressive effects of dexamethasone on lymphocyte proliferation. Endocrinol., v.129, p.3174-3179. 1991.

Blazer, D., J. R. Bachar, *et al.* Major depression with melancholia: a comparison of middle-aged and elderly adults. J Am Geriatr Soc, v.35, n.10, p.927-32. 1987.

Blazer, D. G. Depression in the elderly. Hosp Pract (Off Ed), v.29, n.7, p.37-41; discussion 41, 44. 1994.

Blazer, D. G., R. C. Kessler, *et al.* The prevalence and distribution of major depression in a national community sample: the National Comorbidity Survey. Am J Psychiatry, v.151, n.7, p.979-86. 1994.

Born, J., D. Uthgenannt, *et al.* Cytokine production and lymphocyte subpopulations in aged humans. An assessment during nocturnal sleep. Mech Ageing Dev, v.84, n.2, p.113-26. 1995.

Botez Mi, R. E. Folic acid in neurology, psychiatry and internal medicine. Raven. New York. 1979

Bottiglieri T, G. R., Reynolds Eh. Folate and neuropsychiatry. In: Bailey L.B. Folate in health and disease. Marcel Dekker. New York, p.435-62. 1995

Broadhead, W. E., D. G. Blazer, *et al.* Depression, disability days, and days lost from work in a prospective epidemiologic survey. Jama, v.264, n.19, p.2524-8. 1990.

Brockner P., L. C., Maurin H., Lods Jc. Carences en folates chez les sujets ages: interet de leur correction dans le traitement des troubles du comportement. Hopital de Paris. 62: 2135-9 p. 1986.

Burnet, M. Auto-immune disease. I. Modern immunological concepts. Br Med J, v.5153, p.645-50. 1959.

Burns, A., R. Jacoby, *et al.* Psychiatric phenomena in Alzheimer's disease. I: Disorders of thought content. Br J Psychiatry, v.157, p.72-6, 92-4. 1990.

Cakman, I., J. Rohwer, *et al.* Dysregulation between Th1 and Th2 T cell subpopulations in the elderly. Mech.Ageing Dev., v.87, p.197-209. 1996.

Campbell, A. J. Assessment of elderly people prior to institutional care. N Z Med J, v.97, n.770, p.894-5. 1984.

Candore, G., G. Dilonzo, *et al.* The effect of age on mitogen responsive T cell precursors in human beings is completely restored by interleukin-2. Mech.Ageing Dev., v.63, p.297-307. 1992.

Cangulhem, G. O normal e o patológico. In: R. D. Janeiro (Ed.). O normal e o patológico. Rio de Janeiro: Forense Universitária, v.4, 1995. O normal e o patológico

Canning, M. O., K. Grotenhuis, *et al.* Opposing effects of dehydroepiandrosterone and dexamethasone on the generation of monocyte-derived dendritic cells. Eur.J.Endocrinol., v.143, n.5, p.687-695. 2000.

Cannon, W. B. The wisdom of the body. Norton. New York. 1939

Carmel, S., I. Koren, *et al.* Coping with the Gulf war: subculture differences among ischemic heart disease patients in Israel. Soc Sci Med, v.37, n.12, p.1481-8. 1993.

Carney, R. M., K. E. Freedland, *et al.* Major depression and medication adherence in elderly patients with coronary artery disease. Health Psychol, v.14, n.1, p.88-90. 1995.

Castle, S., K. Uyemura, *et al.* Age-related impaired proliferation of peripheral blood mononuclear cells is associated with an increase in both IL-10 and IL-12. Exp.Gerontol., v.34, p.243-252. 1999.

Castle, S., S. Wilkins, *et al.* Depression in caregivers of demented patients is associated with altered immunity: impaired proliferative capacity, increased CD8+, and a decline in lymphocytes with surface signal transduction molecules (CD38+) and a cytotoxicity marker (CD56+CD8+). Clin.Exp.Immunol., v.101, p.487-493. 1995.



Castle, S. C. Clinical relevance of age-related immune dysfunction. Clin.Infec.Dis., v.31, n.2, p.578-585. 2000.

Chiappelli, F., E. Manfrini, *et al.* Steroid receptor-mediated modulation of CD4+CD62L+ cell homing. Ann.N.Y.Acad.Sci., v.746, p.421-425. 1994.

Cnbb. Vida, dignidade e esperança. In: E. Salesiana (Ed.). Fraternidade e pessoas idosas. Campanha da Fraternidade. Texto Base CF 2003. São Paulo - SP, 2002. Vida, dignidade e esperança.

Collaziol, D., C. Luz, *et al.* Psychoneuroendocrine correlates of lymphocyte subsets during healthy ageing. Mech.Ageing Dev., v.125, p.219-227. 2004.

Corpas, S., M. Harman, *et al.* Human Growth Hormone and Human Aging. Endocr.Rev., v.14, n.1, p.20-39. 1993.

Corti, M. C., J. M. Guralnik, *et al.* Serum albumin level and physical disability as predictors of mortality in older persons. Jama, v.272, n.13, p.1036-42. 1994.

Couch, R. M. Dissociation of cortisol and adrenal androgen secretion in poorly controlled insulin-dependent diabetes mellitus. Acta Endocrinol (Copenh), v.127, n.2, p.115-7. 1992.

Cunningham, L. A. Depression & anxiety in the primary care setting. Compr Ther, v.23, n.6, p.400-6. 1997.

Cunningham, S. K. e T. J. Mckenna. Dissociation of adrenal androgen and cortisol secretion in Cushing's syndrome. v.41, p.795-800. 1994.

Dallman, M., D. Darlington, *et al.* Corticosteroids in homeostasis. Acta Physiol.Scand., v.136, p.27-34. 1989.

Dallman, M. F., S. F. Akana, *et al.* Characterization of corticosterone feedback regulation of ACTH secretion. Ann N Y Acad Sci, v.512, p.402-14. 1987.

Danenberg, H., A. Ben-Yehuda, *et al.* Dehydroepiandrosterone (DHEA) treatment reverses the impaired immune response of old mice to influenza vaccination and protects from influenza infection. Vaccine, v.13, p.1445-1448. 1995.

\_\_\_\_\_. Dehydroepiandrosterone treatment is not beneficial to the immune response to influenza in elderly subjects. J.Clin.Endocrinol.Metab., v.82, p.2911-2914. 1997.

Dantzer, R. Cytokine-Induced Sickness Behavior: Where Do We Stand? Brain Behav.Immun., v.15, p.7-24. 2001.

Daynes, R. e B. Araneo. The development of effective vaccine adjuvants employing natural regulators of T-cell lymphokine production in vivo., v.730, p.144-161. 1994.

Daynes, R., B. Araneo, *et al.* Altered regulation of IL-6 production with normal aging - possible linkage to the age-associated decline in dehydroepiandrosterone and its sulfated derivative. J.Immunol., v.150, p.5219-5230. 1993.

Daynes, R., D. Dudley, *et al.* Regulation of murine lymphokine production in vivo. II. Dehydroepiandrosterone is a natural enhancer of interleukin-2 synthesis by helper T cells. Eur.J.Immunol., v.20, p.793-802. 1990.

De Bree, A., W. M. Verschuren, *et al.* Association between B vitamin intake and plasma homocysteine concentration in the general Dutch population aged 20-65 y. Am J Clin Nutr, v.73, n.6, p.1027-33. 2001.

Dembic, Z., H. Loetscher, *et al.* Two human TNF receptors have similar extracellular, but distinct intracellular, domain sequences. Cytokine, v.2, n.4, p.231-7. 1990.

Deuschle, M., U. Gotthardt, *et al.* With aging in humans the activity of the hypothalamus-pituitary-adrenal system increases and its amplitude flattens. Life Sci., v.61, p.2239-2246. 1997.

Devins, G. M., S. M. Edworthy, *et al.* Illness intrusiveness in rheumatoid arthritis: differential impact on depressive symptoms over the adult lifespan. J Rheumatol, v.19, n.5, p.709-15. 1992.

Dhabhar, F. Stress-induced enhancement of cell-mediated immunity.

Ann.N.Y.Acad.Sci., v.840, p.359-372. 1998.

Di Santo, E., M. Sironi, *et al.* A glucocorticoid receptor independent mechanism for neurosteroid inhibition of tumor necrosis factor production. Eur.J.Pharmacol., v.299, p.179-186. 1996.

Dilman, V. M., S. Y. Revskoy, *et al.* Neuroendocrine-ontogenetic mechanism of aging: toward an integrated theory of aging. Int Rev Neurobiol, v.28, p.89-156. 1986.

Dinges Df, D. S., Hamarman S, Zaugg L, Kapon S. Sleep deprivation and human immune function. Adv Neuroimmunol, v.5, p.97-110. 1995.

Douziech, N., I. Seres, *et al.* Modulation of human lymphocyte proliferative response with aging. Exp.Gerontol., v.37, n.2-3, p.369-387. 2002.

Ebeling P, K. V. Physiological importance of dehydroepiandrosterone. Lancet, v.343, p.1479-1481. 1994.

Ebrecht, M., A. Buske-Kirschbaum, *et al.* Tissue specificity of glucocorticoid sensitivity in healthy adults. J.Clin.Endocrinol.Metab., v.85, n.10, p.3733-9. 2000.

Effros, R. B. Ageing and the immune system. Novartis Found Symp, v.235, p.130-9; discussion 139-45, 146-9. 2001.

Epel, E. S., E. H. Blackburn, *et al.* Accelerated telomere shortening in response to life stress. Proc Natl Acad Sci U S A, v.101, n.49, p.17312-5. 2004.

Ernst, C. e J. Angst. Depression in old age. Is there a real decrease in prevalence? A review., v.245, p.272-287. 1995.

Essex Mj, K. H., Choo Eunsuk & Kalin Nh. Maternal stress beginning in infancy may sensitize children to later exposure: effects on cortisol and behavior. Society of biological psychiatry, v.776, n.784-25. 2002.

Everly, G. S., H. The assessment of the human stress response: neurological, biochemical and psychological foundations. AMS Press. New York 1987.

Fa, C. A saúde dos idosos brasileiros às vésperas do século XXI: problemas, projeções e alternativas. Rev. Saúde Pub, v.31, n.2, p.184-200. 1997.

Fagiolo, U., A. Cossarizza, *et al.* Increased cytokine production in mononuclear cells of healthy elderly people. Eur J Immunol, v.23, n.9, p.2375-8. 1993.

Falsetti, S., Resnick, Hs, Dansky, Bs, Lydiard, Br, Kilpatrick, Dg. The relationship of stress to panic disorder: Cause or effects? In: A. P. Press (Ed.). Does stress cause Psychiatric Illness. Washington DC, 1995. The relationship of stress to panic disorder: Cause or effects?

Felten, D. Direct innervation of lymphoid organs: substrate for neurotransmitter signaling of cells of the immune system. Neuropsychobiology, v.28, p.326-334. 1993.

Fernandes, G., J. T. Venkatraman, *et al.* Effect of food restriction on life span and immune functions in long-lived Fischer-344 x Brown Norway F1 rats. J Clin Immunol, v.17, n.1, p.85-95. 1997.

Ferrari, E., D. Casarotti, *et al.* Age-related changes of the adrenal secretory pattern: possible role in pathological brain aging. Brain Res. Brain Res. Rev., v.37, n.1-3, p.294-300. 2001.

Ferrari, E., L. Cravello, *et al.* Age-related changes of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: pathophysiological correlates. European Journal of Endocrinology, v.144, p.319-329. 2001.

\_\_\_\_\_. Age-related changes of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis: pathophysiological correlates. Eur. J. Endocrinol., v.144, n.4, p.319-329. 2001.

Findling, J., Md and William F. Young, Jr, Md. El síndrome de Cushing. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, v.90, n.2a. 2005.

Ford, P. M. The immunology of ageing. Clin Rheum Dis, v.12, n.1, p.1-10. 1986.

Franceschi, C., D. Monti, *et al.* Successful immunosenescence and the remodelling of immune responses with ageing. Nephrol. Dial. Transplant., v.11, p.18-25. 1996.

Franchimont, D., H. Martens, *et al.* Tumor necrosis factor alpha decreases, and interleukin-10 increases, the sensitivity of human monocytes to dexamethasone: potential regulation of the glucocorticoid receptor. J Clin Endocrinol Metab, v.84, n.8, p.2834-9. 1999.

Frankl, V. Em busca de sentido. Um psicólogo no campo de concentração. Petrópolis - BR: Sinodal Vozes. 2003

Franze, C., Di Stefano, F., Motta, M., Maugeri, D., Stivala, F., Favetta, A., Carnazzo, G.,F. Comparison between serum interleukin-2 concentrations in healthy adult and elderly subjects. Arch. Gerontol. Geriat. 61, v.61, p.469-471. 1996.

Fuxe, K., A. Harstrand, *et al.* Immunocytochemical studies on the localization of glucocorticoid receptor immunoreactive nerve cells in the lower brain stem and spinal cord of the male rat using a monoclonal antibody against rat liver glucocorticoid receptor. Neurosci Lett, v.60, n.1, p.1-6. 1985.

Gabriel, H., B. Schmitt, *et al.* Age-related increase of CD45RO+ lymphocytes in physically active adults. Eur.J.Immunol., v.23, n.10, p.2704-2706. 1993.

Gabriel, P., I. Cakman, *et al.* Overproduction of monokines by leukocytes after stimulation with lipopolysaccharide in the elderly. Exp Gerontol, v.37, n.2-3, p.235-47. 2002.

Galon, J., D. Franchimont, *et al.* Gene profiling reveals unknown enhancing and suppressive actions of glucocorticoids on immune cells. FASEB J., v.16, p.61-71. 2002.

Ganong, W. Review of Medical Physiology. Norwalk: Appleton & Lange. 1991

Gelato, M. C. Aging and immune function: a possible role for growth hormone. Horm Res, v.45, n.1-2, p.46-9. 1996.

Gillis, S., R. Mertelsmann, *et al.* T-cell growth factor (interleukin 2) control of T-lymphocyte proliferation: possible involvement in leukemogenesis. Transplant Proc, v.13, n.4, p.1884-90. 1981.

Ginaldi, L., M. C. Di Benedetto, *et al.* Osteoporosis, inflammation and ageing. Immun Ageing, v.2, p.14. 2005.

Glaser, R., J. Sheridan, *et al.* Chronic stress modulates the immune response to a pneumococcal pneumonia vaccine. Psychosom Med, v.62, n.6, p.804-7. 2000.

Glasser, M. e J. A. Gravdal. Assessment and treatment of geriatric depression in primary care settings. Arch Fam Med, v.6, n.5, p.433-8. 1997.

Gomez, C. R., E. D. Boehmer, *et al.* The aging innate immune system. Curr Opin Immunol, v.17, n.5, p.457-62. 2005.

Goodyear, I., J. Herbert, *et al.* Adrenal secretion during major depression in 8 - 16 year old. Altered diurnal rhythms in salivary and dehydroepiandrosterone (DHEA)I. v.26, p.245-256. 1996.

Goodyer, I. M., J. Herbert, *et al.* Adrenal steroid secretion and major depression in 8- to 16-year-olds, III. Influence of cortisol/DHEA ratio at presentation on subsequent rates of disappointing life events and persistent major depression. Psychol Med, v.28, n.2, p.265-73. 1998.

\_\_\_\_\_. Psychoendocrine antecedents of persistent first-episode major depression in adolescents: a community-based longitudinal enquiry. Psychol Med, v.33, n.4, p.601-10. 2003.

Goronzy, J. J. e C. M. Weyand. T cell development and receptor diversity during aging. Curr Opin Immunol, v.17, n.5, p.468-75. 2005.

Granger, D., E. Schwartz, *et al.* Assessing dehydroepiandrosterone in saliva: a simple radioimmunoassay for use in studies of children, adolescents and adults. Psychoneuroendocrinology, v.24, p.567-579. 1999.

Grasso, G., L. Lodi, *et al.* Glucocorticoid receptors in human peripheral blood mononuclear cells in relation to age and to sport activity. Life Sci, v.61, n.3, p.301-308. 1997.

Halbreich, U., G. Asnis, *et al.* Effect of age and sex on cortisol secretion in depressives and normals. Psychiat.Res., v.13, p.221-229. 1984.

Halbreich, U., G. M. Asnis, *et al.* Effect of age and sex on cortisol secretion in depressives and normals. Psychiatry Res, v.13, n.3, p.221-9. 1984.

Hamilton, M. Development of a rating scale for primary depressive illness. Br.J.Soc.Clin.Psychol., v.6, n.4, p.278-296. 1967.

Haning Jr. R.V., C. M., Flood C.A., Hackett R., Longcope C. Metabolic clearance rate MCR of dehydroepiandrosterone sulfate DS, its metabolism to dehydroepiandrosterone, androstenedione, testosterone, and dihydrotestosterone, and the effect of increased plasma DS concentration on DS MCR in normal women. J. Clin. Endocrinol. Metab, v.69, p.1047-1052. 1989.

Hannet, I., F. Erkeller-Yuksel, *et al.* Developmental and maturational changes in human blood lymphocyte subpopulations. Immunol.Today, v.13, n.6, p.215, 218. 1992.

Hattori, N., K. Ikekubo, *et al.* Spontaneous Growth Hormone (GH) Secretion by Unstimulated Human Lymphocytes and the Effects of GH-Releasing Hormone and Somatostatin. J.Clin.Endocrinol.Metab., v.79, n.6, p.1678-1680. 1994.

Hattori, N., A. Shimatsu, *et al.* Immunoreactive growth hormone (GH) secretion by human lymphocytes: augmented release by exogenous GH. Biochem Biophys Res Commun, v.168, p.396-401. 1990.

Hattori, N., K. Shimomura, *et al.* Growth Hormone (GH) Secretion from Human Lymphocytes Is Up-Regulated by GH, but not Affected by Insulin-Like Growth Factor-I. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, v.76, n.4, p.937-939. 1993.

Hellhammer, D. H., J. Buchtal, *et al.* Social hierarchy and adrenocortical stress reactivity in men. Psychoneuroendocrinology, v.22, n.8, p.643-50. 1997.

Hirshfeld, D. R. The Neurobiology of childhood anxiety disorder. New York: Oxford University Press, v.cap. 63. 1999. 823-838 p. (Neurobiology of Mental Illness.)

Ho, K. Y., W. S. Evans, *et al.* Effects of sex and age on the 24-hour profile of growth hormone secretion in man: importance of endogenous estradiol concentrations. J Clin Endocrinol Metab, v.64, n.1, p.51-8. 1987.

Holmes, T. H. e R. H. Rahe. The Social Readjustment Rating Scale. J Psychosom Res, v.11, n.2, p.213-8. 1967.

Horne, J. Why we sleep: the function of sleep in humans and other mammals. In: O. U. Press (Ed.): Oxford, 1988. Why we sleep: the function of sleep in humans and other mammals.

Hornsby, P. Aging of the human adrenal cortex. Ageing Research Reviews, v.1, p.229-242. 2000.

Hornsby, P. J. DHEA: a biologist's perspective. J Am Geriatr Soc, v.45, n.11, p.1395-401. 1997.

Huang, T. L., S. C. Wu, *et al.* Correlation between serum lipid, lipoprotein concentrations and anxious state, depressive state or major depressive disorder. v.30, n.118(2), p.147-153. 2003.

Huang, Y. P., J. C. Pechere, *et al.* In vivo T cell activation, in vitro defective IL-2 secretion, and response to influenza vaccination in elderly women. J.Immunol., v.148, n.3, p.715-722. 1992.

Iranmanesh, A., G. Lizarralde, *et al.* Age and relative adiposity are specific negative determinants of the frequency and amplitude of growth hormone (GH) secretory bursts and the half-life of endogenous GH in healthy men. J Clin Endocrinol Metab, v.73, n.5, p.1081-8. 1991.

Jackola, D., J. Ruger, *et al.* Age-associated changes in human T cell phenotype and function. Aging, v.6, p.25-34. 1994.

Jain, U., M. A. Blais, *et al.* Five-factor personality traits in patients with seasonal depression: treatment effects and comparisons with bipolar patients. J Affect Disord, v.55, n.1, p.51-4. 1999.

Kahn, J., D. Rubinow, *et al.* Salivary cortisol: a practical method for evaluation of adrenal function. Biol.Psychiat., v.23, p.335-349. 1988.



- Kahn, J., D. D. Rubinow, C.; Kling, M., *et al.* Salivary cortisol: a practical method for evaluation of adrenal function. Biol.Psychiat., v.23, p.335-349. 1988.
- Kalmijn, S., L. J. Launer, *et al.* A prospective study on cortisol, dehydroepiandrosterone sulfate, and cognitive function in the elderly. J Clin Endocrinol Metab, v.83, n.10, p.3487-92. 1998.
- Kapoor, D., C. J. Malkin, *et al.* Androgens, insulin resistance and vascular disease in men. Clin Endocrinol (Oxf), v.63, n.3, p.239-50. 2005.
- Kavelaars, A., B. Cats, *et al.* Ontogeny of the response of human peripheral blood T cells to glucocorticoids. Brain Behav.Immun., v.10, p.288-297. 1996.
- Kavelaars, A., J. Zijlstra, *et al.* Increased dexamethasone sensitivity of neonatal leukocytes: different mechanisms of glucocorticoid inhibition of T cell proliferation in adult and neonatal cells. Eur.J.Immunol., v.25, n.5, p.1346-1351. 1995.
- Kelijman, M. Age-related alterations of the growth hormone/insulin-like growth factor 1 axis. J Am Geriatr Soc, v.39, p.295-307. 1991.
- Keller-Wood, M., J. Shinsako, *et al.* Interaction between stimulus intensity and corticosteroid feedback in control of ACTH. Am J Physiol, v.247, n.4 Pt 1, p.E489-94. 1984.
- Keller, S., J. Weiss, *et al.* Suppression of immunity by stress: effect of a graded series of stressors on lymphocyte stimulation in the rat. Science, v.213, p.1397-1399. 1981.
- Kelley, K. W. The role of growth hormone in modulation of the immune response. Ann N Y Acad Sci, v.594, p.95-103. 1990.
- Kiecolt-Glaser, J. Stress and Immune Function in Humans. Psychoneuroendocrinology, v.2nd ed, p.849-867. 1991.
- Kiecolt-Glaser, J., J. Dura, *et al.* Spousal caregivers of dementia victims: longitudinal changes in immunity and health. Psychosom.Med., v.53, p.345-362. 1991.
- Kiecolt-Glaser, J. K. e R. Glaser. Psychoneuroimmunology and health consequences: data and shared mechanisms. Psychosom Med, v.57, n.3, p.269-74. 1995.

\_\_\_\_\_. Depression and immune function: Central pathways to morbidity and mortality. Journal Psychomatic Research, v.53, p.873-876. 2002.

Kiecolt-Glaser, J. K., R. Glaser, *et al.* Chronic stress alters the immune response to influenza virus vaccine in older adults. Proc Natl Acad Sci U S A, v.93, n.7, p.3043-7. 1996.

Kiecolt-Glaser, J. K., K. J. Preacher, *et al.* Chronic stress and age-related increases in the proinflammatory cytokine IL-6. Proc Natl Acad Sci U S A, v.100, n.15, p.9090-5. 2003.

Kimonides, V. G., M. G. Spillantini, *et al.* Dehydroepiandrosterone antagonizes the neurotoxic effects of corticosterone and translocation of stress-activated protein kinase 3 in hippocampal primary cultures. Neuroscience, v.89, p.429-436. 1999.

Kirschbaum, C. e D. Hellhammer. Salivary cortisol in psychoneuroendocrine research: recent developments and applications. Psychoneuroendocrinol., v.19, p.313-333. 1994.

Kirschbaum, C., J. Prussner, *et al.* Persistent high cortisol responses to repeated psychological stress in a subpopulation of healthy men. Psychol.Med., v.57, p.468-474. 1995.

Kirschbaum, C., C. Strasburger, *et al.* Cortisol and behavior: adaptation of a radioimmunoassay kit for reliable and inexpensive salivary cortisol determination. Pharmacol.Biochem.Behav., v.34, p.747-751. 1989.

Klerman, G. L. Psychotherapies and somatic therapies in affective disorders. Psychiatr Clin North Am, v.6, n.1, p.85-103. 1983.

Kloet, E. Brain corticosteroid receptor balance and homeostatic control. Frontier Neuroendocrinol., v.12, p.95-164. 1991.

Klonoff-Cohen, H., E. L. Barrett-Connor, *et al.* Albumin levels as a predictor of mortality in the healthy elderly. J Clin Epidemiol, v.45, n.3, p.207-212. 1992.

Krause, D., A. Castro, *et al.* Immune function did not decline with aging in apparently healthy, well-nourished woman. Mech.Ageing Dev., v.112, n.1, p.43-57. 2000.

Krieger Dt, S. A., Rizzo F & Krieger Hp. Abolition of circadian periodicity of plasma 17-OH-cs levels in the cat. American Journal of Physiology, v.215, p.959-967. 1968.

Kronfol, Z. e D. G. Remick. Cytokines and the brain: implications for clinical psychiatry. Am J Psychiatry, v.157, n.5, p.683-94. 2000.

Kudielka, B., A. Schmidt-Reinwald, *et al.* Psychosocial stress and HPA functioning: no evidence for a reduced resilience in healthy elderly men. Stress, v.3, p.229-240. 2000.

Lamas, O., A. Marti, *et al.* Obesity and immunocompetence. Eur.J.Clin.Nutr., v.56 Suppl 3, p.S42-S45. 2002.

Lamberts, S. W., A. W. Van Den Beld, *et al.* The endocrinology of aging. Science, v.278, n.5337, p.419-24. 1997.

Lazarus Rs, F. S. The concept of coping. In: C. U. Press (Ed.). Stress and coping: an anthology. New York: (USA), 1991. The concept of coping

Lerner, A., T. Yamada, *et al.* Pgp-1hi T lymphocytes accumulate with age in mice and respond poorly to concanavalin A. Eur.J.Immunol., v.19, n.6, p.977-982. 1989.

Leroith, D., J. Yanowski, *et al.* The effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on the immune system of aged female monkeys. Endocrinology, v.137, n.3, p.1071-9. 1996.

Levine, S., Haltmeyer, G.C., Kaas, G.C., Penenberg, V.H. Physiological and behavioral effects of infantile stimulation. Physiol. Behav., v.2, p.55-63. 1967.

Ligthart, G., J. Corberand, *et al.* Admission criteria for immunogerontological studies in man: the SENIEUR protocol. Mech.Ageing Dev., v.28, p.47-55. 1984.

\_\_\_\_\_. Admission criteria for immunogerontological studies in man: the SENIEUR protocol. Mech.Ageing Dev., v.28, p.47-55. 1984.

Lilly, M. e D. Gann. The hypothalamic-pituitary-adrenal-immune axis: a critical assessment. Arch.Surg., v.127, p.1463-1474. 1991.

Lipp, M. e A. Guevara. Validação empírica do inventário de sintomas de stress. Estudos de Psicologia, v.11, n.3, p.43-49. 1994.

Lipp, M. E. N. Mecanismos neuropsicofisiológicos do stress:teoria e aplicações clínicas. São Paulo, v.1. 2003. 1-227 p.

Lissett, C. A., E. G. Thompson, *et al.* How many tests are required to diagnose growth hormone (GH) deficiency in adults? Clin Endocrinol (Oxf), v.51, n.5, p.551-7. 1999.

Liu, C. H., G. A. Laughlin, *et al.* Marked attenuation of ultradian and circadian rhythms of dehydroepiandrosterone in postmenopausal women: evidence for a reduced 17,20-desmolase enzymatic activity. v.71, p.900-906. 1990.

Liu, H., D. M. Bravata, *et al.* Elevated late-night salivary cortisol levels in elderly male type 2 diabetic veterans. Clin Endocrinol (Oxf), v.63, n.6, p.642-9. 2005.

Liu, J., S. Wang, *et al.* The monitoring biomarker for immune function of lymphocytes in the elderly. Mech.Ageing Dev., v.94, p.177-182. 1997a.

\_\_\_\_\_. The monitoring biomarker for immune function os lymphocytes in the elderly. Mech.Ageing Dev., v.94, p.177-182. 1997b.

Longcope, C. Dehydroepiandrosterone metabolism. J. Endocrinol., v.150, p.125-127. 1996.

Lupien, S., A. Lecours, *et al.* Basal cortisol levels and cognitive deficits in human aging. J.Neurosci., v.14, p.2893-2903. 1994.

Lupien, S. J., M. De Leon, *et al.* Cortisol levels during human aging predict hippocampal atrophy and memory deficits. Nat Neurosci, v.1, n.1, p.69-73. 1998.

Lupsakko, T., M. Mantyljarvi, *et al.* Combined hearing and visual impairment and depression in a population aged 75 years and older., v.17, p.808-813. 2002.

Luz, C., F. Dornelles, *et al.* Impact of psychological and endocrine factors on cytokine production of healthy elderly people. Mech.Ageing Dev., v.124, p.887-895. 2003.

\_\_\_\_\_. Impact of psychological and endocrine factors on cytokine production of healthy elderly people. Mech.Ageing Dev. 2003.

Lyness, J. M., E. D. Caine, *et al.* Cerebrovascular risk factors and later-life major depression. Testing a small-vessel brain disease model. Am J Geriatr Psychiatry, v.6, n.1, p.5-13. 1998.

Madden, K. S., V. M. Sanders, *et al.* Catecholamine influences and sympathetic neural modulation of immune responsiveness. Annu Rev Pharmacol Toxicol, v.35, p.417-48. 1995.

Maeda, K., K. Tanimoto, *et al.* Elevated urinary free cortisol in patients with dementia. Neurobiol Aging, v.12, n.2, p.161-3. 1991.

Maes, M., E. Bosmans, *et al.* Immunoendocrine aspects of major depression: relationships between plasma interleukin-6 and soluble interleukin-2 receptor, prolactin and cortisol. Eur.Arch.Psychiatry Clin.Neurosci., v.245, p.172-178. 1995.

Maison P, B. B., Simon D, Chanson P, Rosselin G, Eschwège E. Growth hormone as a risk for premature mortality in healthy subjects: data from the Paris prospective study. BJM, v.316, p.1132-1133. 1998.

Malaguarnera, L., L. Ferlito, *et al.* Immunosenescence: a review. Arch.Gerontol.Geriatr., v.32, p.1-14. 2001.

Malarkey, W. B., J. Wang, *et al.* Human lymphocyte growth hormone stimulates interferon gamma production and is inhibited by cortisol and norepinephrine. J.Neuroimmunol., v.123, n.1-2, p.180-187. 2002.

Mancini, T., M. Doga, *et al.* Cushing's Syndrome and Bone. Pituitary. 2005.

Marques, N. M.-B., L. Cronobiologia: princípios e aplicações. Edusp-São Paulo. 1999.

Martinez-Taboada, V., M. J. Bartolome, *et al.* Changes in peripheral blood lymphocyte subsets in elderly subjects are associated with an impaired function of the hypothalamic-pituitary- adrenal axis. Mech.Ageing Dev., v.123, n.11, p.1477-1486. 2002.

\_\_\_\_\_. Changes in peripheral blood lymphocyte subsets in elderly subjects are associated with an impaired function of the hypothalamic-pituitary- adrenal axis. Mech.Ageing Dev., v.123, n.11, p.1477-1486. 2002.

Mastorakos, G., G. P. Chrousos, *et al.* Recombinant IL-6 activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in humans. J.Clin.Endocrinol.Metab, v.77, p.1690-1694. 1993.

Mazari, L. e B. M. Lesourd. Nutritional influences on immune response in healthy aged persons. Mech.Ageing Dev., v.104, n.1, p.25-40. 1998.

Mcarthur, W. P. Effect of aging on immunocompetent and inflammatory cells. Periodontol 2000, v.16, p.53-79. 1998.

Mcclelland, D. C., G. Ross, *et al.* The effect of an academic examination on salivary norepinephrine and immunoglobulin levels. J Human Stress, v.11, n.2, p.52-9. 1985.

Mcdonald, I., Lee, A. And Bradley, A. Endocrine changes in dasyurid marsupials with differing mortality patterns. Gen.Comp.Endocrinol, v.44, p.292-294. 1981.

Mcewen, B. Stress, adaptation, and disease. Ann.N.Y.Acad.Sci., v.840, p.33-44. 1998.

Mcewen, B., C. Biron, *et al.* The role of adrenocorticosteroids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions. v.23, p.79-133. 1997a.

\_\_\_\_\_. The role of adrenocorticosteroids as modulators of immune function in health and disease: neural, endocrine and immune interactions. Brain Res.Rev., v.23, p.79-133. 1997b.

Mcewen, B. S. Effects of adverse experiences for brain structure and function. Biol Psychiatry, v.48, n.8, p.721-31. 2000.

Menna-Barreto, L., A. Isola, *et al.* Becoming circadian--A one-year study of the development of the sleep-wake cycle in children. Braz J Med Biol Res, v.29, n.1, p.125-9. 1996.

Michael, A., A. Jenaway, *et al.* Altered Salivary Dehydroepiandrosterone levels in major depression in adults. Biol Psychiatry, v.48, p.989-995. 2000.

Migeon, C., A. Keller, *et al.* Dehydroepiandrosterone and androsterone levels in human plasma: effects of age, sex, day to day diurnal variations. J.Clin.Endocrinol.Metab., v.17, p.1051. 1957a.

\_\_\_\_\_. Dehydroepiandrosterone and androsterone levels in human plasma: effects of age, sex, day to day diurnal variations. J.Clin.Endocrinol.Metab., v.17, p.1051-1054. 1957b.

Miller, R. Age-related changes in T cell surface markers: a longitudinal analysis in genetically heterogenous mice. Mech.Ageing Dev., v.96, p.181-196. 1997.

Mobarhan, S. e L. S. Trumbore. Nutritional problems of the elderly. Clin Geriatr Med, v.7, n.2, p.191-214. 1991.

Monteiro, P. Envelhecer: historias; encontros; transformações. In: Autentica (Ed.). Belo Horizonte (MG), 2001. Envelhecer: historias; encontros; transformações

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J.Immunol.Methods, v.65, p.55-63. 1983.

Munck, A., P. Guyre, *et al.* Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. v.5, p.25-44. 1984.

Murasko, D., P. Weiner, *et al.* Decline in mitogen induced proliferation of lymphocytes with increasing age. Clin.Exp.Immunol., v.70, p.440-448. 1987.

Murphy, E. The prognosis of depression in old age. Br J Psychiatry, v.142, p.111-9. 1983.

Murrell, S. A. e S. Himmelfarb. Effects of attachment bereavement and pre-event conditions on subsequent depressive symptoms in older adults. Psychol Aging, v.4, n.2, p.166-72. 1989.

Nestler, J. E. e D. J. Jakubowicz. Decreases in ovarian cytochrome P450c17 alpha activity and serum free testosterone after reduction of insulin secretion in polycystic ovary syndrome. N Engl J Med, v.335, n.9, p.617-23. 1996.

Newmann, J. P. Aging and depression. Psychol Aging, v.4, n.2, p.150-65. 1989.

Nieschlag E., L. D. L., Ruder H.J., Zucker I.R., M.A. Kirschner M.A., Lipsett M.B. The secretion of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulphate in man. J. Endocrinol., v.57, p.123-134. 1973.

Nikolaus, T., M. Bach, *et al.* Assessment of nutritional risk in the elderly. Ann.Nutr.Metabol., v.39, p.340-345. 1995.

Nolen-Hoeksema, S. e C. Ahrens. Age differences and similarities in the correlates of depressive symptoms. Psychol Aging, v.17, n.1, p.116-24. 2002a.

\_\_\_\_\_. Age differences and similarities in the correlates of depressive symptoms. Psychol.Aging, v.17, n.1, p.116-124. 2002b.

Nowell, P. C. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. Cancer Res, v.20, p.462-6. 1960.

Oberbeck R, D. M., Koch R, Van Griensven M, Emmendörfer a, Tscherne H, Pape Hc. Dehydroepiandrosterone decreases mortality and improves cellular immune function during polymicrobial sepsis. Crit Care Med, v.29, p.380-384. 2001.

Orentreich, N., J. L. Brind, *et al.* Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood. J Clin Endocrinol Metab, v.59, p.551-559. 1984.

\_\_\_\_\_. Long-term longitudinal measurements of plasma dehydroepiandrosterone sulfate in normal men. J Clin Endocrinol Metab, v.75, n.4, p.1002-4. 1992.



Padgett, D. A. e R. Glaser. How stress influences the immune response. Trends Immunol, v.24, n.8, p.444-8. 2003.

Padgett, D. A. e R. Loria. In vitro potentiation of lymphocyte activation by dehydroepiandrosterone, androstenediol, and androstenediol. J.Immunol., v.153, p.1544-1552. 1994.

Parker, L. N., E. R. Levin, *et al.* Evidence for adrenocortical adaptation to severe illness. v.60, p.947-952. 1985.

Passeri Jr., C. D., Abate G., Senin U., Ventura A. Oral 5-methyltetrahydrofolic acid in senile organic mental disorders with depression: results of double-blind multicenter study. Aging Clin Exp Res, v.5, p.63-71. 1993.

Pavlov E.P., H. S. M. Chrousos G.P., Loriaux D.L., Blackman M.R. Responses of plasma adrenocorticotropin, cortisol, and dehydroepiandrosterone to ovine corticotropin-releasing hormone in healthy aging men. J. Clin. Endocrinol. Metab., v.62, p.767-772. 1986.

Pawelec, G., M. Adibzadeh, *et al.* The T cell in the ageing individual. Mech.Ageing Dev., v.93, p.35-45. 2000.

Pawelec, G., Y. Barnett, *et al.* T cells and aging, January 2002 update. Front Biosci., v.7, p.d1056-d1183. 2002a.

\_\_\_\_\_. T cells and aging, January 2002 update. Front.Biosci., v.7, p.d1056-d1183. 2002b.

Pawelec, G., R. Effros, *et al.* T cells and aging. Front.Biosci., v.4, p.216-269. 1999.

Pawelec, G., Q. Ouyang, *et al.* Is human immunosenescence clinically relevant? Looking for 'immunological risk phenotypes'. Trends Immunol., v.23, n.7, p.330-332. 2002.

Pawelec, G., W. Wagner, *et al.* T cell immunosenescence in vitro and in vivo. Exp.Gerontol., v.34, p.419-429. 1999.

Pedersen, B. K. e A. D. Toft. Effects of exercise on lymphocytes and cytokines. Br.J.Sports Med., v.34, n.4, p.246-251. 2000.

Plata-Salaman, C. R. Dexamethasone inhibits food intake suppression induced by low doses of interleukin-1 beta administered intracerebroventricularly. Brain Res Bull, v.27, n.5, p.737-8. 1991.

Raff, H., J. Raff, *et al.* Elevated salivary cortisol in the evening of healthy elderly men and women: correlation with bone mineral density. J.Gerontol.A Biol.Sci.Med.Sci, v.54, p.M479-M483. 1999.

Ramachandra, R. N., A. H. Sehon, *et al.* Neuro-hormonal host defence in endotoxin shock. Brain Behav Immun, v.6, n.2, p.157-69. 1992.

Raskind, M., E. Peskind, *et al.* Hypothalamic-pituitary-adrenal axis regulation and human aging. Ann.N.Y.Acad.Sci., v.746, p.327-335. 1994.

Rea, I., Stewart, M., Campbell, P., Alexander, H., Crockard, A., Morris, T. Changes in lymphocyte subsets, interleukin 2, and soluble interleukin 2 receptor in old and very old age. Gerontology, v.42, p.69-78. 1996.

Refojo, D., A. C. Liberman, *et al.* Integrating systemic information at the molecular level: cross-talk between steroid receptors and cytokine signaling on different target cells. Ann N Y Acad Sci, v.992, p.196-204. 2003.

Refsum, H. Folate, vitamin B12 and homocysteine in relation to birth defects and pregnancy outcome. Br J Nutr, v.85 Suppl 2, p.S109-13. 2001.

Regier, D. A., I. D. Goldberg, *et al.* The de facto US mental health services system: a public health perspective. Arch Gen Psychiatry, v.35, n.6, p.685-93. 1978.

Reul, J. M. e E. R. De Kloet. Two receptor systems for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. Endocrinology, v.117, n.6, p.2505-11. 1985.

Reul, J. M., F. R. Van Den Bosch, *et al.* Differential response of type I and type II corticosteroid receptors to changes in plasma steroid level and circadian rhythmicity. Neuroendocrinology, v.45, n.5, p.407-12. 1987.

Reus, V. I., O. M. Wolkowitz, *et al.* Antigluocorticoid treatments in psychiatry. Psycho-neuroendocrinology, v.22 Suppl 1, p.S121-4. 1997.

Reynolds, E. Mental effects of anticonvulsants, and folic acid metabolism. Brain Behav.Immun., v.94, p.197-214. 1968.

\_\_\_\_\_. Folic acid, ageing, depression and dementia. v.324, p.1512-1515. 2002.

Reynolds, E. H., J. M. Preece, *et al.* Folate deficiency in depressive illness. Br J Psychiatry, v.117, n.538, p.287-92. 1970.

Riggs, K. M., A. Spiro, 3rd, *et al.* Relations of vitamin B-12, vitamin B-6, folate, and homocysteine to cognitive performance in the Normative Aging Study. Am J Clin Nutr, v.63, n.3, p.306-14. 1996.

Rink, L., I. Cakman, *et al.* Altered cytokine production in the elderly. Mech.Ageing Dev., v.102, p.199-209. 1998.

Risdon, G., T. Moore, *et al.* Inhibition of murine natural killer cell differentiation by dehydroepiandrosterone. Blood, v.78, p.2387-2391. 1991.

Rohleder, N., L. Joksimovic, *et al.* Hypocortisolism and increased glucocorticoid sensitivity of pro-inflammatory cytokine production in Bosnian war refugees with posttraumatic stress disorder. Biol.Psychiat., v.55, n.7, p.745-51. 2004.

Rohleder, N., J. M. Wolf, *et al.* Impact of oral contraceptive use on glucocorticoid sensitivity of pro-inflammatory cytokine production after psychosocial stress. Psychoneuroendocrinol., v.28, n.3, p.261-73. 2003.

Roshan, S., S. Nader, *et al.* Ageing and hormones. Eur.J.Clin.Invest., v.29, p.210-213. 1999.

Rudman, D. Growth hormone, body composition, and aging. J Am Geriatr Soc, v.33, p.800-807. 1985.

Rudman, D., A. G. Feller, *et al.* Relation of serum albumin concentration to death rate in nursing home men. JPEN J Parenter Enteral Nutr, v.11, n.4, p.360-3. 1987.

Rudolph, K. D., Denning, M. D., & Weisz, J. R. Determinants and consequences of children's coping in the medical setting conceptualization, review, and critique. Psychological Bulletin, v.118, p.328-357. 1995.

Salive, M. E., J. Cornoni-Huntley, *et al.* Serum albumin in older persons: relationship with age and health status. J Clin Epidemiol, v.45, n.3, p.213-221. 1992.

Saltzman, R. L. e P. K. Peterson. Immunodeficiency of the elderly. Rev Infect Dis, v.9, n.6, p.1127-39. 1987.

Salzman, C. e R. I. Shader. Depression in the elderly. I. Relationship between depression, psychologic defense mechanisms and physical illness. J Am Geriatr Soc, v.26, n.6, p.253-60. 1978.

\_\_\_\_\_. Depression in the elderly. II. Possible drug etiologies; differential diagnostic criteria. J.Am.Geriatr.Soc., v.26, n.7, p.303-308. 1978.

Salzman, L. The psychotherapy of anxiety and phobic states. Psychiatr Q, v.50, n.1, p.17-21. 1978.

Sapolsky, R. M. Glucocorticoid toxicity in the hippocampus: temporal aspects of neuronal vulnerability. Brain Res, v.359, n.1-2, p.300-5. 1985.

\_\_\_\_\_. Glucocorticoid toxicity in the hippocampus. Temporal aspects of synergy with kainic acid. Neuroendocrinology, v.43, n.3, p.440-4. 1986.

\_\_\_\_\_. Cortisol concentrations and the social significance of rank instability among wild baboons. Psychoneuroendocrinology, v.17, n.6, p.701-9. 1992.

Sapolsky, R. M., L. C. Krey, *et al.* The neuroendocrinology of stress and aging: the glucocorticoid cascade hypothesis. Endocr Rev, v.7, n.3, p.284-301. 1986.

- Sapolsky, R. M., L. M. Romero, *et al.* How do glucocorticoids influence stress responses? Integrating permissive, suppressive, stimulatory, and preparative actions. Endocr.Rev., v.21, n.1, p.55-89. 2000.
- Schall, T. J., K. Bacon, *et al.* Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of the memory phenotype by cytokine RANTES. Nature, v.347, n.6294, p.669-71. 1990.
- Schedlowski, M., W. Hosch, *et al.* Catecholamines modulate human NK cell circulation and function via spleen-independent beta2-adrenergic mechanisms. J.Immunol., v.156, p.93-99. 1996.
- Schindowski, K., L. Frohlich, *et al.* Age-related impairment of human T lymphocytes' activation: specific differences between CD4(+) and CD8(+) subsets. Mech.Ageing Dev., v.123, n.4, p.375-390. 2002.
- Schulz, R. e S. R. Beach. Caregiving as a risk factor for mortality: the Caregiver Health Effects Study. Jama, v.282, n.23, p.2215-9. 1999.
- Seeman, T., B. McEwen, *et al.* Increase in urinary cortisol excretion and memory declines: MacArthur studies of successful aging. J.Clin.Endocrinol.Metab., v.82, p.2458-2465. 1997.
- Seeman, T., B. Singer, *et al.* Gender differences in age-related changes in HPA axis reactivity. Psychoneuroendocrinol., v.26, p.225-240. 2001.
- Selye, H. A syndrome produced by diverse nocuous agents. Nature, v.138, p.32. 1936.
- \_\_\_\_\_. The stress of Life. McGraw-Hill. New York. 1956
- \_\_\_\_\_. Stress in healthand disease. Butterworth. Boston. 1976
- Shaw, W. S., T. L. Patterson, *et al.* Accelerated risk of hypertensive blood pressure recordings among Alzheimer caregivers. J Psychosom Res, v.46, n.3, p.215-27. 1999.
- Shetty Kr, D. E. Anterior pituitary function and growth hormone use in the elderly. Endocrinol Metab Clin N Amer, v.24, n.2, p.213-231. 1995.

Shimokata, H., D. C. Muller, *et al.* Age as independent determinant of glucose tolerance. Diabetes, v.40, n.1, p.44-51. 1991.

Shua-Haim, J., M. Sabi, *et al.* Depression in the Elderly. Hospital Med., v.33, n.7, p.45-58. 2000.

Shua-Haim, J. R., T. Haim, *et al.* Depression among Alzheimer's caregivers: identifying risk factors. Am.J.Alzheimers.Dis.Other Demen., v.16, n.6, p.353-359. 2001.

Sindermann, J., A. Kruse, *et al.* Investigations of the lymphokine system in elderly individuals. Mech Ageing Dev, v.70, n.1-2, p.149-59. 1993.

Siqueira, M. Desenvolvimento e envelhecimento: perspectivas biológicas, psicológicas e sociológicas. In: O. Neri AI (Ed.). Teorias sociológicas do envelhecimento. Campinas (SP): Papirus, 2001. Desenvolvimento e envelhecimento: perspectivas biológicas, psicológicas e sociológicas

Sjoberg B, T. B. D. L., Hedman M. Falkay G., Diczfalusy E. ". Circadian variation in systemic hormone levels in healthy men. J.Endocrinol. Invest, v.2, p.131-137. 1979.

Snowdon, J. Prevalence of depression in old age. Br J Psychiatry, v.178, p.476-7. 2001a.

\_\_\_\_\_. Prevalence of depression in old age. Br.J.Psychiat., v.178, p.476-477. 2001b.

Soares Cn, M. N., Cunha Neto M, Caires Ma, Rosenthal Mc, Camargo Cp, Et Al. Impact of recombinant human growth hormone (RH-GH) treatment on psychiatric, neuropsychological and clinical profiles of GH deficient adults. A placebo-controlled trial. Arq Neuropsiquiatr, v.57, n.2A, p.182-189. 1999.

Squire, L. R. Memory and the hippocampus: a synthesis from findings with rats, monkeys, and humans. Psychol Rev, v.99, n.2, p.195-231. 1992.

Starkman, M., D. Schteingart, *et al.* Depressed mood and other psychiatric manifestations of Cushing's syndrome: relationship to hormone levels. Psychosom.Med., v.43, p.3-18. 1981.

Straub, R., L. Konecna, *et al.* Serum dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate are negatively correlated with serum interleukin-6 (IL-6), and inhibits IL-6 secretion from mononuclear cells in vitro: possible link between endocrinesenesence and imunosenescence. J.Clin.Endocrinol.Metab., v.83, p.2012-2017. 1998.

Straub, R., L. Miller, *et al.* Cytokines and hormones as possible links between endocrinosenescence and immunosenescence. J.Neuroimmunol., v.109, p.10-15. 2000.

Straub, R. H., M. Cutolo, *et al.* The process of aging changes the interplay of the immune, endocrine and nervous systems. Mech.Ageing Dev., v.122, n.14, p.1591-1611. 2001.

Straub, R. H., L. Konecna, *et al.* Serum dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA sulfate are negatively correlated with serum interleukin-6 (IL-6), and DHEA inhibits IL-6 secretion from mononuclear cells in man in vitro: possible link between endocrinosenescence and immunosenescence. J.Clin.Endocrinol.Metab., v.83, n.6, p.2012-2017. 1998.

Straub, R. H., L. E. Miller, *et al.* Cytokines and hormones as possible links between endocrinosenescence and immunosenescence. J Neuroimmunol, v.109, n.1, p.10-5. 2000.

Straub, R. H., J. Westermann, *et al.* Dialogue between the CNS and the immune system in lymphoid organs. Immunol Today, v.19, n.9, p.409-13. 1998.

Suzuki, T., N. Suzuki, *et al.* Dehydroepiandrosterone enhances IL2 production and cytotoxic effector function of human T cells. Clin.Immunol.Immunopathol., v.61, p.202-211. 1991.

Svec F, P. J. The actions of exogenous dehydroepiandrosterone in experimental animals and humans. Proc Soc Exp Biol Med, v.218, p.174-191. 1998.

Svensson J, J. G. Insulin-like growth factor-I in growth hormone-deficient adults: relationship to population-based normal values, body composition and insulin tolerance test. Clin Endocrinol (Oxf), v.46, p.579-586. 1997.

Swartz, C. M. Albumin decrement in depression and cholesterol decrement in mania. J Affect Disord, v.19, n.3, p.173-176. 1990.

Teri, L. e A. W. Wagner. Assessment of depression in patients with Alzheimer's disease: concordance among informants. Psychol Aging, v.6, n.2, p.280-5. 1991.

Tom, T. e J. L. Cummings. Depression in Parkinson's disease: pharmacological characteristics and treatment. Drugs & Aging, v.12, p.55-74. 1998.

Trentini M, E. R., Álvares Lh, Albuquerque Lm, Paim L, Tigrinho Fc. Retrato falado do trabalho vivo em alto de uma unidade do programa de saúde da família (PSF). Texto & Contexto Enfermagem, v.12, n.3, p.351-360. 2003.

Trilck, M., J. Flitsch, *et al.* Salivary cortisol measurement--a reliable method for the diagnosis of Cushing's syndrome. Exp Clin Endocrinol Diabetes, v.113, n.4, p.225-30. 2005.

Troen, B. R. The biology of aging. Mt Sinai J Med, v.70, n.1, p.3-22. 2003.

Tuma, T. A. Outcome of hospital-treated depression at 4.5 years. An elderly and a younger adult cohort compared. Br J Psychiatry, v.176, p.224-8. 2000.

Van Cauter, E., R. Leproult, *et al.* Effects of gender and age on the levels and circadian rhythmicity of plasma cortisol. J.Clin.Endocrinol.Metab, v.81, n.7, p.2468-2473. 1996.

Van Niekerk, J. K., F. A. Huppert, *et al.* Salivary cortisol and DHEA: association with measures of cognition and well-being in normal older men, and effects of three months of DHEA supplementation. Psychoneuroendocrinology, v.26, n.6, p.591-612. 2001.

Varma, S., P. Sabharwal, *et al.* Growth hormone secretion by human peripheral blood mononuclear cells detected by an enzyme-linked immunoplaque assay. J Clin Endocrinol Metab, v.76, p.49-53. 1993.

Vedhara, K., N. Cox, *et al.* Chronic stress in elderly carers of dementia patients and antibody response to influenza vaccination. Lancet, v.353, p.627-631. 1999.



Vetta, F., S. Ronzoni, *et al.* Tumor necrosis factor-alpha and mood disorders in the elderly. Arch Gerontol Geriatr Suppl, v.7, p.435-42. 2001.

Vgontzas an, P. D., Bixler Eo, Et Al. Circadian interleukin-6 secretion and quantity and depth of sleep. J Clin Endocrinol Metab, v.84, p.2603-2607. 1999.

Vissinga, C., A. Hertogh-Huijbregts, *et al.* Analysis of the age-related decline in alloreactivity of CD4+ and CD8+ T cells in CBA/RIJ mice. Mech Ageing Dev, v.51, n.2, p.179-94. 1990.

Vitaliano, P. P., J. M. Scanlan, *et al.* A path model of chronic stress, the metabolic syndrome, and coronary heart disease. Psychosom Med, v.64, n.3, p.418-35. 2002.

Wade, C. E., J. S. Lindberg, *et al.* Upon-admission adrenal steroidogenesis is adapted to the degree of illness in intensive care unit patients. v.67, p.223-227. 1988.

Walker, R., D. Riad-Fahmy, *et al.* Adrenal status assessed by direct radioimmunoassay of cortisol in whole saliva or paratid saliva. Clin.Chem., v.24, p.1460-1463. 1978.

Waltman, C., M. R. Blackman, *et al.* Spontaneous and glucocorticoid-inhibited adrenocorticotrophic hormone and cortisol secretion are similar in healthy young and old men. J.Clin.Endocrinol.Metab, v.73, n.3, p.495-502. 1991.

Wang Ba, W. Å., Basun H, Fastbom J, Winblad B, Fratiloni L. Vitamin B12 and folate in relation to the development of Alzheimer's disease. Neurology, v.56, p.1188-94. 2001.

Weigent, D. A., J. B. Baxter, *et al.* Production of immunoreactive growth hormone by mononuclear leukocytes. FASEB J., v.2, n.12, p.2812-8. 1988.

Wick, G. e B. Grubeck-Loebenstein. Immunity and aging. Dev Comp Immunol, v.21, n.6, p.455-60. 1997.

Wiebke A., F. C., Ines Koehler, Jan Christoph Van Vlijmen, Martin Fassnacht, Christian J. Strasburger, Markus J. Seibel, Doris Huebler, Michael Ernst, Michael Oettel, Martin Reincke, Heinrich M. Schulte, and Bruno Allolio. Dehydroepiandrosterone Supplemen-

- tation in Healthy Men with an Age-Related Decline of Dehydroepiandrosterone Secretion. J Clin Endocrinol Metab, v.86, n.10, p.4686-4692. 2001.
- Wilckens, T. e R. De Rijk. Glucocorticoids and immune function: unknown dimensions and new frontiers. Immunol.Today, v.18, p.418-424. 1997.
- Winterer, J., H. E. Gwirtsman, *et al.* Adrenocorticotropin-stimulated adrenal androgen secretion in anorexia nervosa: impaired secretion at low weight with normalization after long-term weight recovery. J.Clin.Endocrinol.Metab., v.81, p.693-697. 1985.
- Wolf, O. T. e C. Kirschbaum. Actions of dehydroepiandrosterone and its sulfate in the central nervous system: effects on cognition and emotion in animal and humans. Brain Res.Rev., v.30, p.264-288. 1999.
- Xavier, F. M., M. P. Ferraz, *et al.* [Generalized anxiety disorder in a population aged 80 years and older]. Rev Saude Publica, v.35, n.3, p.294-302. 2001.
- Yamaguchi, Y., S. Tanaka, *et al.* Reduced serum dehydroepiandrosterone levels in diabetic patients with hyperinsulinaemia. Clin Endocrinol (Oxf), v.49, n.3, p.377-83. 1998.
- Yesavage, J. e T. Brink. Development and validation of a geriatric depression screening scale: a preliminary report. v.17, n.1, p.37-49. 1983.
- Yesavage, J. A., T. L. Brink, *et al.* Development and validation of a geriatric depression screening scale: a preliminary report. J.Psychiatr.Res., v.17, n.1, p.37-49. 1982.
- Young, A. H., P. Gallagher, *et al.* Elevation of the cortisol-dehydroepiandrosterone ratio in drug-free depressed patients. Am J Psychiatry, v.159, n.7, p.1237-9. 2002.
- Zovato, S., M. Simoncini, *et al.* Dexamethasone suppression test: corticosteroid receptors regulation in mononuclear leukocytes of young and aged subjects. Aging Clin.Exp.Res, v.8, p.360-364. 1996.



## **14. ANEXOS**

---

### **14.1. ARTIGO COMPLETO**

## 14.2. ARTIGO COMPLETO

### 14.3. ARTIGO DE REVISÃO

## 14.4. PROTOCOLO SENIEUR

O protocolo SENIEUR foi desenvolvido pelo grupo EURAGE (Programa de Ação Combinada em Envelhecimento da Comunidade Européia), dirigido para o estudo dos cidadãos mais velhos na Europa. É importante mencionar que, na ausência de uma série completa de valores de referência para os grupos de idade mais avançada, foram usados vários limites arbitrários. É recomendável a revisão periódica deste protocolo.

### 1. IDADE

Os grupos de idade são melhores escolhidos por décadas, iniciando na idade em que o sistema imune pode ser considerado maduro. A padronização do grupo comparativo de jovens é tão importante quanto a do grupo de idade a ser estudado. Para grupo comparativo, nos propusemos entre 25-34 anos e para grupos de estudo 65-74, 75-84, 85-94 e 95 anos em diante.

### 2. DADOS A SEREM COLETADOS

As seguintes informações são para serem coletadas de todos participantes:

- a) Idade, sexo, grupo étnico, peso e altura, gestações, cirurgia mais importante, transfusões de sangue, uso de drogas, cigarro, bebidas e hábitos alimentares, profissão, condições de vida, atividades diárias.
- b) Conclusões de exames médicos, preferencialmente feitos pelo próprio clínico geral do sujeito, isso por razões de tempo e privacidade.

### 3. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Os critérios de exclusão podem ser agrupados em três grandes grupos, apresentados na tabela 1. Estes critérios são válidos para os dois grupos do estudo (controle e amostra).

- A. Informações clínicas
- B. Dados laboratoriais
- C. Interferência farmacológica

#### 3. A. Informações clínicas

3 A.1. *Infecção*. Isso inclui todas infecções bacterianas, por fungos, virais, por clamídia, rickettsia e parasitárias.

Com frequência aparecem infecções respiratórias e urogenitais, que devem ser excluídas. Um exame de acompanhamento após duas semanas incluindo o diagnóstico médico é importante para assegurar que a investigação primária não foi durante o

período de incubação do processo infeccioso. Neste caso, um intervalo de seis semanas deve ser observado depois de todos os sintomas terem diminuído, antes de se reconsiderar a inclusão no estudo.

3. A.2. *Inflamação.* É definida como qualquer reação local de um tecido vascularizado à injúria. Isso inclui todos os processos inflamatórios agudos e crônicos, assim como, por exemplo, a doença do colágeno vascular ou doença de Crohn. Essas são usualmente reveladas pelo histórico clínico, exame físico e testes laboratoriais.

3. A.3. *Neoplasias.* Inclui todas neoplasias malignas e tumores indefinidos que não podem ser classificados definitivamente como benignos.

Todas as neoplasias, passadas ou atuais levam à exclusão. Há consciência de que nem sempre conseguimos excluir as doenças silenciosas, e um exemplo típico disso é o carcinoma de próstata. Esta neoplasia é freqüentemente assintomática, mas provavelmente deve estar presente na autopsia em mais de 50% dos casos dos homens acima de 80 anos de idade.

*Doenças linfoproliferativas.* Podem ser reconhecidas por sintomas clínicos, mas um problema particular é representado pelos diagnósticos de mieloma múltiplo silencioso e macroglobulinemia de Waldenströms. A idade avançada pode ser acompanhada pela ocorrência de gamopatia monoclonal benigna. A freqüência de paraproteíemia é aproximadamente 10% na idade de 80 anos e por volta de 20% acima dos 95 anos. Cerca de 1% desses componentes-M pode ser resultado de uma dessas duas doenças malignas e, dessas, um pequeno número poderia ser clinicamente silenciosa, isto é, não apresenta sintomas clínicos, apresenta razão normal de sedimentação de eritrócitos (ESR), nível normal de hemoglobina e não apresenta proteinúria. Assim isso é claro o risco de incluir uma pessoa com mieloma múltiplo silencioso ou macroglobulinemia de Waldenströms pode ser mínimo. Por isso, a constatação de paraproteína somente levará a exclusão se o restante de imunoglobulinas estiver significativamente diminuído. Se este não for o caso, a pessoa pode ser incluída no estudo.

3. A.4. *Outras condições que influenciam o sistema imune.* Esse grupo inclui todas doenças declaradas que podem influenciar o sistema imune. As seguintes merecem ser especialmente mencionadas:

- (a) *Arteriosclerose* - Deve ser considerada como virtualmente presente em qualquer pessoa com idade acima de 65 anos e por isso não pode ser considerada uma condição que justifique a exclusão do grupo de estudo. A manifestação da arteriosclerose no histórico médico para esse propósito, por exemplo, infarto do miocárdio, derrame ou recanalização da artéria femoral por claudicação não são razões para a exclusão se já se passaram seis meses desde o evento agudo. Se medicamentos foram prescritos por razões profiláticas, assim como, por e-



xemplo, terapia anticoagulante, isso pode ser aceito se o medicamento por si mesmo não há influência conhecida sobre o sistema imunológico. Se isso for demonstrado, a exclusão segue de acordo com § 3.C.2. Se essa medicação puder ser interrompida pelo tempo necessário para que todos os efeitos sobre o sistema imune desapareçam, a pessoa poderá ser incluída no estudo. Essa decisão cabe ao clínico geral.

- (b) Insuficiência cardíaca** - Se tratado, pode ser excluído (§ 3.C.1). Se nenhum medicamento está prescrito e o paciente está estável somente com dieta com pouco sal a pessoa não deverá ser excluída.
- (c) Hipertensão** - Não é critério de exclusão por si mesma. No entanto se for de origem imunológica, a exclusão será feita a partir da constatação de uréia no sangue ou uma relevante proteinúria na análise da urina, leucócitos ou eritrócitos no sedimento. Se a hipertensão é de origem arteriosclerótica ou diabética deve ser excluído, quando revelados níveis aumentados de uréia e glicose séricos ou se desenvolverem proteinúria ou glicosúria.
- (d) Demência** - É uma razão para a exclusão porque a doença interfere com o aceite de registros pessoais e torna impossível o propósito de entender o consentimento informado.
- (e) Gravidez** - Incluindo um período de seis meses após o parto, bem como a amamentação, levam à exclusão.
- (f) Má nutrição** - Constatada por exame clínico exclui a participação. Como parâmetro propusemos o índice de Quetelet, calculado como o peso corporal em quilogramas dividido pelo quadrado da altura (IMC). O índice mínimo requerido é 20 para mulheres e 22 para homens.
- (g) Alcoolismo e abuso de drogas** - Levam à exclusão.

### 3. B. Dados laboratoriais

O teste requerido é apresentado na tabela II.

Para o grupo controle jovem podem ser usados os valores de referência do laboratório local, para isso são geralmente determinados por exames de sangue de doadores saudáveis entre 20 e 60 anos de idade. Faltam este tipo de informações para o grupo de idosos e há uma necessidade urgente de estabelecimento dos valores de referência para cada década.

Para esse protocolo, decidiu-se usar valores de referência estabelecidos por LANDAHL em um grupo de voluntários saudáveis de 70 anos admitidos no estudo longitudinal de Göteborg. Para cada variável a faixa cobre os valores entre o 2,5<sup>o</sup> e 97,5<sup>o</sup>

percentis. Valores fora desta faixa são considerados anormais e levam à exclusão. Essas faixas de referência estão na tabela II. Alguns comentários são dados abaixo.

- (a) Enquanto não há valores de referência por décadas, propusemos usar as referências de LANDAHL para todos os estudos de indivíduos acima de 65 anos de idade.
- (b) A metodologia dos testes pode variar entre os laboratórios particularmente no caso de determinação de enzimas do fígado. Isso deve ser levado em conta e, se necessário, devem ser aplicados os fatores de correção e feitos os estudos de controle de qualidade.
- (c) Para análise de urina escolhemos limites arbitrários porque faltam informações adequadas na literatura.

### 3. C. *Interferência farmacológica*

A interferência farmacológica nos estudos imunogerontológicos será sempre um problema porque a maioria das pessoas de idade usa drogas prescritas ou se automedicam. Essa parte das informações sobre medicamentos deve ser elucidada minuciosamente, repetindo as perguntas e com bastante jeito. Para uma pessoa de idade, o uso crônico de um medicamento pode fazer parte do estilo de vida normal, sem considerá-lo como medicamento e, conseqüentemente, não o mencionando ao investigador.

A exclusão de todos os usuários de medicamentos poderia ser a medida mais precisa, porém o receio de que esta não seria uma decisão realista, levou a especificação de duas categorias de uso de medicamentos que levariam à exclusão:

*3.C.1. Medicamentos prescritos para tratamento de uma determinada doença :* Isso significa que o uso de diuréticos para o problema de coração levaria a exclusão, porque o medicamento é prescrito para uma doença definida. Se não for excluída pelo parágrafo 3. C.2 o mesmo diurético não deve levar a exclusão se usado para edema hipostático porque não é uma doença definida. Aqui, de fato, o critério de exclusão mostra a necessidade de uma definição de doença e do grau de severidade da mesma.

Pessoas com medicação profilática, por exemplo, anticoagulantes, depois de um infarto do miocárdio, podem ser admitidas tão logo a exclusão não se enquadre no parágrafo 3. C.2 e o infarto foi há mais de 6 meses (ver arteriosclerose em 3.A.4).

*3.C.2. Medicamentos que influenciam o sistema imunológico.* Exemplos dessa categoria incluem as drogas antiinflamatórias, hormônios (incluindo pílulas anticoncepcionais no grupo controle de jovens) e analgésicos. Se o medicamento puder ser inter-

rompido para anular os efeitos no sistema imunológico, então o voluntário pode ser ainda admitido no estudo. As vacinações não devem ser realizadas em menos de seis semanas antes do exame.

Tabela I. Critérios de exclusão para admissão em estudo longitudinal em humanos.

---

A. Informações clínicas (incluindo acompanhamento por duas semanas)

1. Infecção
2. Inflamação
3. Neoplasia
4. Outras condições que podem influenciar o sistema imunológico

B. Dados laboratoriais (resultados fora da faixa de referência para o idoso)

Taxa de sedimentação de eritrócitos, hemoglobina, volume corpuscular médio, contagem de leucócitos em diferenciação.

Uréia, fosfatase alcalina, glicose, ASAT (SGOT), ALAT (SGPT)

Proteína e imuno-eletroforese

Análise da urina: proteína, glicose e sedimento

C. Interferência farmacológica

1. Medicamentos prescritos para tratamento de uma determinada doença
  2. Medicamentos que influenciam o sistema imunológico
-

Tabela II. Valores laboratoriais de referência utilizados como critérios de exclusão para indivíduos acima de 65 anos de idade

<i>Determinação</i>	<i>Metodologia utilizada</i>	<i>Mulheres</i>	<i>Homens</i>
Taxa de sedimentação de eritrócitos (mm)	Westergren	2,0 - 34	1,0 - 30
Hemoglobinas(mmol/l)	Cianohemoglobina	7,4 - 9,9	8,1 - 10,6
Volume corpuscular médio (fl)	Contador Coulter	80 - 100	
Contagem de leucócitos ( $\times 10^9$ /l)	Manual	2,9 - 8,8	
Diferencial de leucócitos (esfregaço)	Manual	Padrão normal de diferenciação de acordo com o local de padronização	
Uréia (mmol/l)	Autoanalisador	2,3 - 9,2	2,6 - 9,7
Fosfatase alcalina ( $\mu$ kat/l)	Autoanalisador modificado de King- Armstrong	1,4 - 4,7	1,3 - 4,5
ASAT (SGOT) ( $\mu$ kat/l)	Taxa de reação LKB 8600 combinação de teste bioquímico	0,17 – 0,60	0,21 - 0,58
ALAT (SGPT) ( $\mu$ kat/l)	Taxa de reação LKB 8600 combinação de teste bioquímico	0,09 - 0,49	0,07 - 0,55
Glicose(mmol)			
Jejum	Autoanalisador	4,0 - 7,2	
Pós-prandial	Autoanalisador	< 11,0	
Análises da urina			
Proteína	Fita	Traço máximo	
Glicose	Fita	Máximo -	
Sedimento	Urina		
Leucócitos/ HPF <sup>b</sup>		< 6	
Eritrócitos/HPF		< 6	
Granulócitos/HPF		< 2	

<sup>a</sup> a maioria dos dados adaptados de LANDAHL.S, 1981

<sup>b</sup> HPF = de alta resolução

#### 14.5. ESCALA DE DEPRESSÃO GERIÁTRICA

<b>QUESTÕES</b>	<b>SIM</b>	<b>NÃO</b>
1. Em geral, está satisfeito com a vida?		
2. Abandonou várias de suas atividades e das coisas que tinha interesse?		
3. Sente que sua vida está vazia ?		
4. Sente-se aborrecido com freqüência ?		
5. Está de bom humor a maior parte do tempo ?		
6. Tem medo que algo de ruim aconteça sr (sra) ?		
7. Se sente feliz a maior parte do tempo ?		
8. Se sente desamparado (a) ou abandonado (a) com freqüência ?		
9. Prefere ficar em casa a sair e fazer coisas diferentes ?		
10. O Sr (a) acha que tem mais problemas com a memória do que antes ?		
11. Neste momento, achas que viver é algo maravilhoso?		
12. Considera inútil a forma em que está vivendo agora ?		
13. Se sente cheio de energia ?		
14. Considera sem esperança a situação em que se encontra?		
15. Acha que a maioria das pessoas está melhor que o Sr (a) (em geral) ?		
<b>ESCORE FINAL</b>		

## 14.6. ESCALA DE ANSIEDADE

0 = ausente 1 = intensidade leve 2= intensidade média 3= intensidade forte  
4 = intensidade máxima

QUESTÃO	ESCORE
1. Humor Ansioso Inquietação, temor ao pior, apreensão quanto ao presente ou futuro, maus pressentimentos, irritabilidade	
2. Tensão Sensação de tensão, fadiga, reações de sobressalto, choro fácil, tremores, sensação de cansaço, incapacidade de relaxar, agitação	
3. Medos Do escuro, de estranhos, de ficar sozinho, de animais de grande porte, do trânsito, de multidões	
4. Insônia Dificuldade de adormecer, sono interrompido, sono insatisfatório, fadiga ao acordar, sonhos penosos, pesadelos, terror noturno	
5. Dificuldades Intelectuais Dificuldade de concentração, falhas de memória	
6. Humor deprimido Perda de interesse, oscilação de humor, depressão, despertar precoce	
7. Somatizações motoras Dores musculares, rigidez muscular, contrações espasmáticas, contrações involuntárias, ranger de dentes, voz insegura	
8. Somatizações sensoriais Ondas de frio ou calor, sensações de fraqueza, visão borrada, sensação de picadas, formigamento, sensações auditivas, zumbidos	
9. Sintomas cardiovasculares Taquicardia, palpitações, dores no peito, sensação de desmaio, sensação extra-sístoles	
10. Sintomas respiratórios Pressão no peito ou aperto no peito, dispnéia, respiração suspirosa, sensação de sufocação	

<p>11. Sintomas gastrintestinais</p> <p>Deglutição difícil, aerofagia, dispepsia, sensação de plenitude gástrica, dor pré ou pós prandial, pirose, meteorismo, náuseas, vômitos, sensação de vazio gástrico, diarreia, constipação, cólicas</p>	
<p>12. Sintomas geniturinários</p> <p>Polaciúria, urgência miccional, amenorréia, frigidez, diminuição da libido</p>	
<p>13. Sintomas neurovegetativos</p> <p>Boca seca, palidez, tendência à sudoração, tonturas, cefaléia de tensão</p>	
<p>14. Comportamento durante a entrevista</p> <p>Geral: Tenso, pouco á vontade, inquieto, agitação das mãos (mexer, tabo- lhar, retorcer, tremores), franzir a testa, face tensa</p>	

## 14.7. INVENTÁRIO DE SINTOMAS DE ESTRESSE

### QUADRO 1

#### **A ) Marque com um (X) os sintomas que tem experimentado nas últimas 24 horas**

- Mãos e pés frios
- Boca seca
- Nó no estômago
- Aumento de sudorese
- Tensão muscular
- Aperto da mandíbula / ranger os dentes
- Diarréia passageira
- Insônia
- Taquicardia
- Hiperventilação
- Hipertensão arterial súbita e passageira
- Mudança de apetite

#### **B ) Marque com um (X) os sintomas que tem experimentado nas últimas 24 horas**

- Aumento súbito de motivação
- Entusiasmo súbito
- Vontade súbita de iniciar novos projetos

### QUADRO 2

#### **A ) Marque com um (X) os sintomas que tem experimentado na última semana**

- Problemas com a memória
- Mal-estar generalizado, sem causa específica
- Formigamento das extremidades
- Sensação de desgaste físico constante
- Mudança de apetite
- Aparecimento de problemas dermatológicos
- Hipertensão arterial
- Cansaço constante
- Aparecimento de úlcera
- Tontura / sensação de estar flutuando

#### **B ) Marque com um (X) os sintomas que tem experimentado na última semana**

- Dúvida quanto a si próprio
- Sensibilidade excessiva
- Pensar constantemente em um só assunto. Se possível qual? \_\_\_\_\_
- Irritabilidade excessiva
- Diminuição da libido



### QUADRO 3

---

**A ) Marque com um (X) os sintomas que tem experimentado no último mês**

- ( ) Diarréia frequente
- ( ) Dificuldades sexuais
- ( ) Insônia
- ( ) Náuseas
- ( ) Tiques
- ( ) Hipertensão arterial continuada
- ( ) Problemas dermatológicos
- ( ) Mudança extrema de apetite
- ( ) Excesso de gases
- ( ) Tontura freqüente

**B ) Marque com um (X) os sintomas que tem experimentado no último mês**

- ( ) Impossibilidade de trabalhar
- ( ) Pesadelos
- ( ) Sensação de incompetência em todas as áreas
- ( ) Vontade de fugir de tudo
- ( ) Apatia, depressão ou raiva prolongada
- ( ) Cansaço excessivo
- ( ) Pensar / falar constantemente em um só assunto. Se possível, qual? \_\_\_\_\_
- ( ) Irritabilidade sem causa aparente
- ( ) Angústia / Ansiedade diária
- ( ) Hipersensibilidade emotiva
- ( ) Perda do senso de humor

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)