

Renck, P. N.^{1,2,3}, Homem de Bittencourt, P. I. Jr.^{1,2}

¹Laboratório de Fisiologia Celular, Departamento de Fisiologia, ICBS, UFRGS. Porto Alegre/RS. ²INCT de Hormônios e Saúde da Mulher. ³Curso de Biomedicina.

Contato: Laboratório de Fisiologia Celular, Departamento de Fisiologia, ICBS, UFRGS. Rua Sarmiento Leite, 500 – 2º andar, lab. 02.
Telefone: (51) 33083151; **fax:** (51) 33084555; **email:** fisiologia.celular@ufrgs.br ; **web:** www.ufrgs.br/fisiologia/fisiologiacelular

Introdução

O aumento nos níveis circulantes de catecolaminas (epinefrina e norepinefrina) estimula a atividade imunológica de macrófagos via receptores beta-adrenérgicos e posterior ativação do NF- κ B. Ao mesmo tempo, as catecolaminas aumentam os níveis de histamina, que estimula a produção de citocinas anti e pró-inflamatórias, de acordo com sua concentração. Outro componente do eixo SCPH, o CRH também parece ser imunestimulador, enquanto seu produto indireto, o cortisol, pode causar imunossupressão. Apesar de diversos e conflitantes estudos do eixo SCPH in vivo e in vitro, ainda não se chegou a um consenso sobre o papel individual dessas substâncias no sistema imunológico, uma vez que os ensaios in vitro utilizam concentrações hormonais muito maiores que as encontradas in vivo.

Objetivos

Verificar o papel de componentes do eixo SCPH na atividade imunológica (fagocitose) de macrófagos peritoneais de ratos quando utilizados em concentração fisiológica.

Métodos

Animais

- 9 ratos Wistar machos (60 dias).
- Morte por decapitação para coleta do soro.

Isolamento dos macrófagos

- Injeção intraperitoneal de PBS.
- Massagem abdominal (30 segundos)
- Laparotomia e aspiração do PBS

Lavagem

- Centrifugação das células (5 min a 300 x g)
- Ressuspensão em meio de cultura*

Cultura

- Semeadura (10^5 células por poço)
- 15 minutos para adesão em estufa de CO₂ 5% a 37°C

Tratamentos

- Adição de PMA ou etanol, Epinefrina (40nM), Norepinefrina (15 nM), Histamina (4,5 ng/mL) ou CRH (30 pg/mL)
- Incubação por 15 minutos

Fagocitose

- Adição de 10% (v/v) de zimosan previamente opsonizado com soro homólogo.
- Incubação por 30 minutos.

Avaliação

- Lavagens com PBS gelado (parada da reação)
- Contagem do número de partículas fagocitadas por 50 células em aumento de 640X.

Resultados

- Índice de Hishikawa = (Média do número de partículas fagocitadas por células) x (proporção de células com partículas) x 100
- Estatística: teste *t* de Student (comparações controle - PMA); ANOVA de duas vias seguida por Student-Newman-Keuls (demais análises).

* Verificou-se também o melhor meio de cultura para ser utilizado nos ensaios. Para isso, foram testados as seguintes combinações:

Meio de Cultura	HBSS						RPMI 1640					
	2% Albumina Defatada (AD)		10% Soro Fetal Bovino (SFB)		10% Soro Homólogo (SH)		2% Albumina Defatada (AD)		10% Soro Fetal Bovino (SFB)		10% Soro Homólogo (SH)	
Aditivo	Eta-nol	PMA	Eta-nol	PMA	Eta-nol	PMA	Eta-nol	PMA	Eta-nol	PMA	Eta-nol	PMA

Resultados

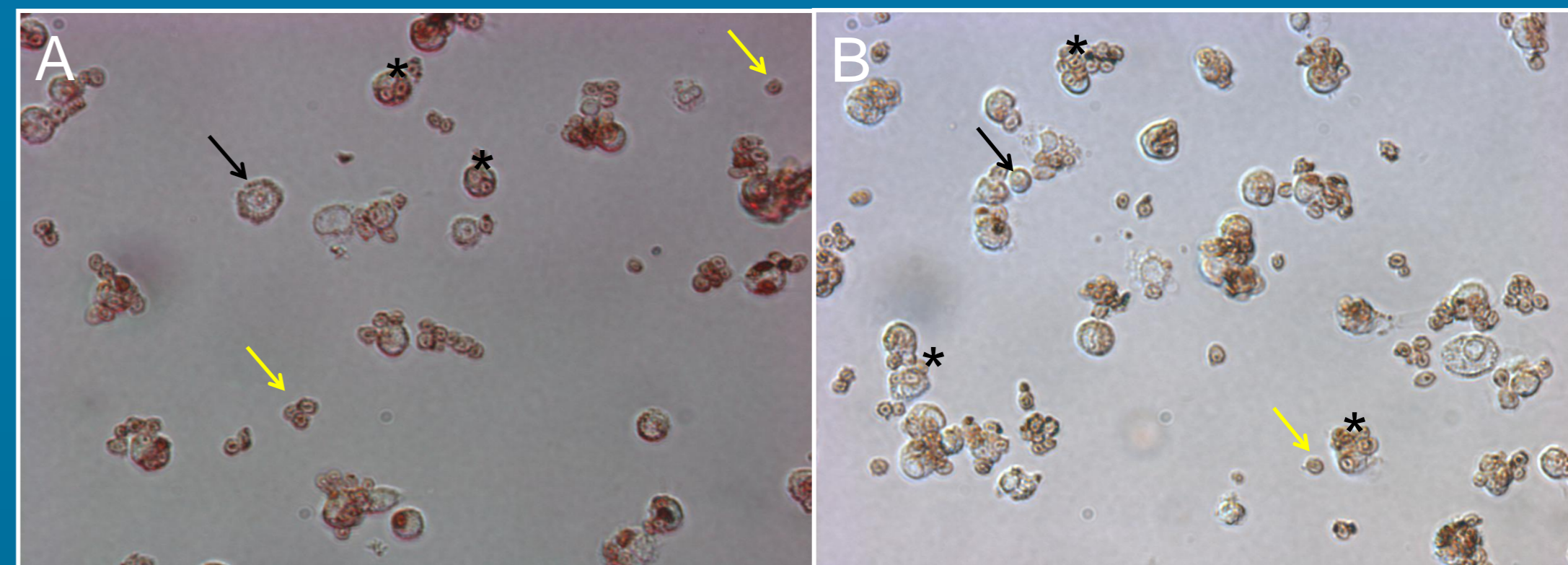


Figura 1: Fotos representativas da fagocitose de um grupo com baixa atividade (A, Controle) e de um com alta atividade (B, Epinefrina com PMA). Flechas amarelas indicam partículas de zimonsan não fagocitadas. Flechas pretas indicam macrófagos que não fagocitam. * indica macrófagos com partículas fagocitadas.

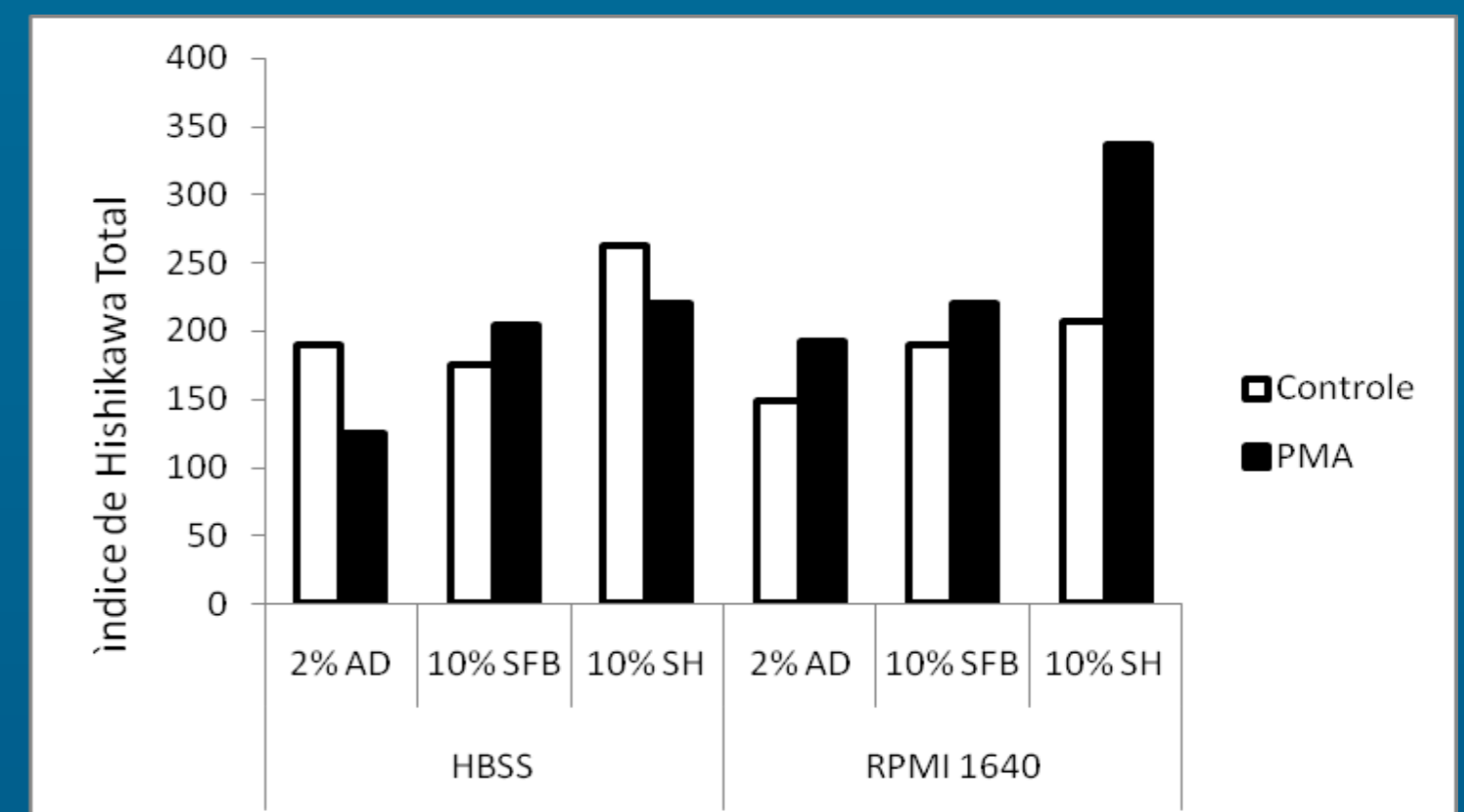


Figura 2: Comparação entre diferentes meios de cultura e aditivos na atividade fagocítica de macrófagos peritoneais. A partir desses resultados, os experimentos seguintes foram conduzidos em meio RPMI 1640 com 10% de soro homólogo.

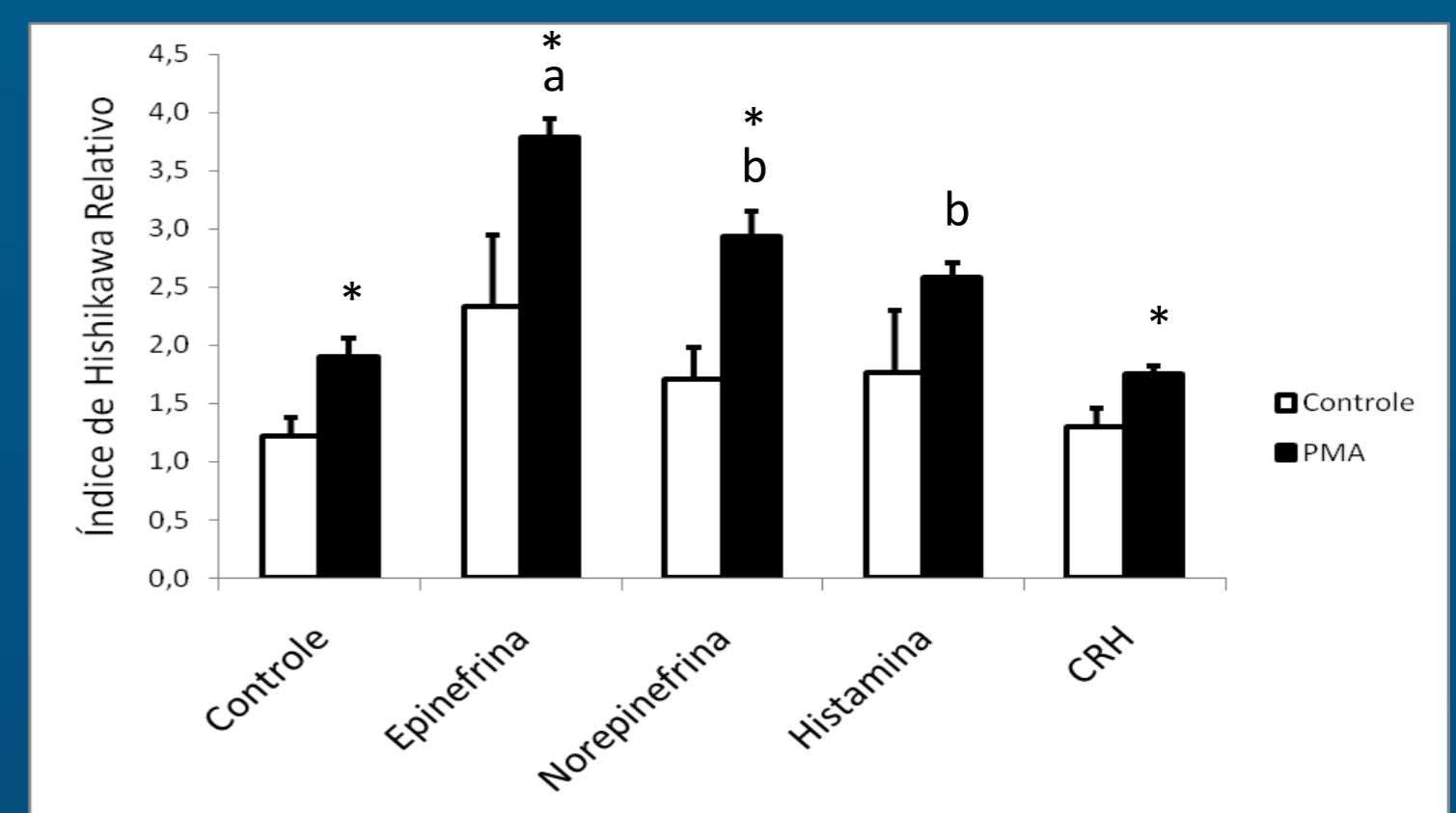


Figura 2: Comparação entre o efeito na capacidade fagocítica dos diferentes componentes do eixo SCPH na presença e na ausência de PMA. Não houve diferença entre os grupos na estimulados concomitantemente com PMA. Naqueles estimulados com PMA, "a" é diferente dos grupos controle, "Norepinefrina", "Histamina" e "CRH" ($p < 0,05$); "b" é diferente dos grupos controle e "CRH" ($p < 0,01$). * é diferente de seu respectivo grupo sem a adição de PMA ($p < 0,05$). Todos os grupos, exceto o "Histamina", responderam à presença de PMA no meio de cultura.

Conclusão

- A melhor resposta imunológica dos macrófagos foi em meio RPMI 1640, específico para leucócitos, suplementado com soro do rato de onde as células foram isoladas. Cabe ressaltar que o soro adicionado ao meio também é o mesmo utilizado para opsonizar o zimosan.
- As catecolaminas foram as substâncias que mais influenciaram a atividade fagocítica, sendo que se observou um aumento de 100% e 53% nos grupos epinefrina e norepinefrina, respectivamente, quando comparados ao controle.
- A histamina também foi capaz de aumentar a fagocitose, embora com menos intensidade. O CRH não teve influência direta nesse parâmetro, mas pode modular, in vivo, outros componentes do eixo, tendo efeito indireto sobre a fagocitose.