

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia**

ELZA MARIA SANTOS DA SILVEIRA

**O EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO AGUDO (NATAÇÃO) ESTIMULA A
FUNCIONALIDADE IMUNOLÓGICA E INFLAMATÓRIA DE
MONÓCITOS CIRCULANTES EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas: Fisiologia, Instituto de
Ciências Básicas da Saúde, como requisito parcial para
a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Júnior

Porto Alegre

2006

**Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Instituto de Ciências Básicas da Saúde
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia**

ELZA MARIA SANTOS DA SILVEIRA

**O EXERCÍCIO FÍSICO AERÓBIO AGUDO (NATAÇÃO) ESTIMULA A
FUNCIONALIDADE IMUNOLÓGICA E INFLAMATÓRIA DE
MONÓCITOS CIRCULANTES EM RATOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas: Fisiologia, Instituto de
Ciências Básicas da Saúde, como requisito parcial para
a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Júnior

Porto Alegre

2006

AGRADECIMENTOS

Não poderia deixar de agradecer e falar em pessoas que foram responsáveis por esta conquista.

Minha mãe com dedicação e paciência, sempre pronta para me ouvir nas horas difíceis, aos meus irmãos André e Sônia que mesmo no silêncio sabia que podia contar.

Ao meu amado Ricardo que me acompanha há muito tempo em momentos bons e ruins e sempre ao meu lado. Desculpa por não ter ficado mais tempo contigo e muitas vezes até ficar um pouco ausente nestes últimos anos, mas pode ter certeza que se não fosse a compreensão tua e do Juliano, eu não teria chegado até aqui.

Ao meu amado e adorado filho Juliano, este sim campeão de paciência, sempre sorrindo, afagando meu rosto e dizendo mãe “eu te amo” mesmo nos momentos em que eu não estava tão presente, dando uma grande importância para o trabalho. Filho, espero que todo este esforço um dia possa trazer bons frutos e realmente fazer valer a pena.

Aos queridos parentes: tios e primos, cunhada e verdadeiros amigos, que procuram também estar sempre presente e me ajudar. Quero abrir um parêntese para as minhas tia Ana, Elza e Florely que estão sempre preocupadas comigo querendo saber se estou sem “grana”, ou me alimentado bem etc, etc, etc, vocês são minhas mães também muito obrigada. Ao meu querido tio Neco, te admiro muito, vejo o quanto já caminhaste dentro da pesquisa e penso... Será que um dia também chegarei lá? Por enquanto considero esta fase como “engatinhar”, levantando e caindo, mas nunca desistindo, mesmo que este caminho possa parecer absurdo. Te amo tio, és o pai que não tive.

À Sueli que não tem sido apenas sogra, mas uma grande e querida amiga e com quem sempre posso contar em todas as horas e auxilia muito junto com minha mãe na criação de meu filho, nos momentos em que estou trabalhando e estudando.

Aos colegas de laboratório o meu muito obrigada, em especial ao Lino, Maurício, Juliane, Bibiana, que nessas últimas semanas foram incansáveis, sempre dispostos a me auxiliar abrindo mão dos seus próprios compromissos e que espero cultivar amizade sincera. Ju e Bibi, vocês já tem um “espacinho” em meu coração e Maurício és um pesquisador e ser humano incrível, desejo sucesso muito, muito além do que já sei que terás. Lino, agradeço muito tua atenção, dedicação e sinceridade, queria dizer que quando assisti tua apresentação do Doutorado, fiquei em determinado momento emocionada, não somente pela apresentação que eu já sabia que ia ser um sucesso por tudo que plantou durante o doutorado, mas por ver a sala lotada, sem lugar nem para sentar, o que confirma o teu carisma e fico orgulhosa por ser tua amiga, muito saúde, sucesso e felicidade ao lado dos teus filhos e esposa.

À querida Daiane, obrigada pelas horas de “terapia”, me fazia muito bem, espero que possamos continuar.

À Angela, ainda estou para ver profissional como tu te admiro muito, tua garra me leva a crer que tudo vale a pena, desde que acreditamos naquilo que nos propomos a fazer. À Mariana. Valeu, foi muito importante para mim tua ajuda. Damiana, Deus quando te fez jogou a forma fora, és muito especial, Alexandre (Baby), Thiago, João, sempre prestativos e aos demais colegas do laboratório, muito obrigada.

A querida Míriam, muito obrigada pela paciência e dedicação ao longo desses anos.

A Dona Ritinha , aos demais professores, colegas do programa de pós-graduação e aos pacientes (que foram muito “pacientes” principalmente no que se refere à troca de horários para fazer os experimentos) e funcionários também agradeço.

Mas sem dúvida alguma, tudo isso começou porque um homem acreditou que seria possível, o querido Prof. Dr. Paulo Ivo, a quem tenho grande admiração como professor, orientador, pessoa e amigo, agradeço essa oportunidade que tem significado muito para mim. Professor, obrigada pela paciência que tiveste comigo nestes anos.

Não podemos lembrar só das coisas boas, mas nas horas de aperto eles foram muito fieis a mim. Obrigada meu Deus pela força e as orações ao Santo Expedito, Desatadora dos Nós, São Jorge e todos os outros Santos a quem me apeguei ao fazer Mestrado.

A minha querida Vó Ely Nair que me educou junto à minha mãe, mas que, principalmente, quando minha mãe trabalhava, foi a responsável por me passar valores os quais considero tão importantes e faço uso deles para reger minha vida, tento passá-los também para o Juliano. E para isto não existem estudos, aulas e experimentos. Apenas a verdade, sinceridade, humildade, amor e fé, desistir jamais. Obrigada, Vó, por tudo o que representou por mim, pelo amor que sinto por ti e não expressei quando estava conosco.

SUMÁRIO

Lista das Abreviações.....	vi
RESUMO	vii
INTRODUÇÃO.....	01
OBJETIVOS.....	26
MATERIAL E MÉTODOS.....	27
RESULTADOS	43
DISCUSSÃO.....	62
CONCLUSÃO.....	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70
Anexos	viii
Anexo I (Tampões e Meios utilizados).....	ix
Anexo II (Técnicas utilizadas).....	xiii

LISTA DAS ABREVIACES

γ -GCS	γ -glutamilcisteína sintetase
CAT	catalase
ERNs.....	espécies reativas do nitrogênio
EROs.....	espécies reativas do oxigênio
GSH	glutaciona (forma reduzida)
GSPx.....	glutaciona peroxidase
GSSG.....	dissulfeto de glutaciona (forma oxidada da glutaciona)
HSP.....	proteínas de choque térmico (do inglês, <i>heat shock proteins</i>)
IFN γ	interferon γ
IL	interleucina
LPS	lipopolissacarídeo
MMP	metaloproteinasas de matriz extracelular
NF- κ B.....	fator nuclear κ B
NO	�xido nítrico [†]
NOS	sintase do óxido nítrico
PKC	proteína quinase C
PMA	acetato de forbolmiristato (= TPA, tetradecanoilforbol acetato)
SOD	superóxido dismutase
TNF α	fator de necrose tumoral α

[†] NO não  , na verdade, uma abrevia o;   a formula molecular do óxido nítrico (\bullet N=O)

RESUMO

A atividade física moderada regular apresenta uma série de efeitos benéficos para a fisiologia do organismo, particularmente no tocante à atividade do sistema imunológico. O exercício físico promove aumento da resistência a infecções por agentes virais e bacterianos, reduz a incidência de certos tipos de câncer, reduz enormemente os riscos de doenças cardiovasculares agudas e crônicas e melhora a qualidade de vida de uma maneira geral. Contudo, os mecanismos pelos quais o exercício físico regular melhora a performance do sistema imunológico não estão completamente elucidados. Particularmente em relação às alterações imunológicas observadas em sessões agudas de exercício moderado, pouco se sabe. Neste trabalho foi estudado o efeito de sessões agudas de exercício de natação em ratos (1 h, em água aquecida a 30°C, com sobrepeso de 5% ligado à cauda) sobre a funcionalidade imunológica e inflamatória de macrófagos obtidos a partir de monócitos circulantes destes animais. Os resultados mostraram que o exercício induz uma intensa ativação na capacidade fagocitária (2,4 vezes maior que nos controles $P = 0,0041$), na produção basal de NO avaliada pelo acúmulo de NO_3^- , NO_2^- e NO_x^- total em macrófagos incubados por 1 h (até 95,5% de aumento $P = 0,0220$) e na produção de H_2O_2 estimulada pelo éster de forbol PMA (9,6 vezes maior que nos controles, $P = 0,0022$). O aumento na capacidade basal de produção parece estar associado à expressão da isoforma induzível da NO sintase (iNOS = NOS-2), já que o exercício provocou uma expressiva indução na expressão da enzima ($P = 0,0319$). Embora a indução da expressão da iNOS esteja relacionada à ativação da via do fator nuclear κB (NF- κB) o que, por sua vez, está normalmente associado ao estresse oxidativo, vários parâmetros sugerem que a ativação dos monócitos/macrófagos deva ter ocorrido localmente a despeito de qualquer alteração redox sistêmica, já que o exercício não levou a qualquer alteração na quantidade de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) plasmáticas ou no índice de estado redox eritrocitário, avaliado pela relação entre as concentrações intracelulares de dissulfeto de glutathione e glutathione. Também não houve alteração na expressão das proteínas de choque térmico da família das HSP70, o que sugere que o exercício não tenha provocado nenhuma sorte de estresse pronunciado sobre os macrófagos. Somados, os dados sugerem que o exercício agudo moderado possa desempenhar importante papel na ativação de certos mecanismos imunológicos e inflamatórios em monócitos/macrófagos e que algum fator neural ou humoral, que não o estresse oxidativo, possa mediar esta resposta.

1. INTRODUÇÃO

Quando realizado de forma adequada, o exercício físico tem um impacto extremamente positivo sobre o indivíduo que o pratica. Além de melhorar uma série de parâmetros fisiológicos cardiovasculares, respiratórios e metabólicos, o exercício tem um poderoso efeito sobre o sistema nervoso central, através da liberação de mediadores opióides, o que acaba por favorecer melhora na qualidade global de vida para todos que se exercitam. Dentre as alterações benéficas induzidas pela atividade física, talvez a mais notável seja sua capacidade de induzir robustez ao sistema imunológico (VANCINI et al., 2005)

Estudos realizados em animais experimentais mostram que o exercício físico aumenta a expectativa de vida em animais portadores de tumores, promovem inibição do crescimento tumoral e reduzem o risco de vários tipos de câncer, promovendo a ativação do sistema imunológico em animais (ORTEGA, 1997; SINGLE, 2005).

Apesar de comprovadamente benéfico para o organismo, o tipo de exercício, sua carga e duração influenciam sobremaneira em seus efeitos sobre o indivíduo. Na verdade, os efeitos do exercício físico em humanos e animais experimentais apresentam-se como uma curva em “U invertido”: existe um “ótimo” de atividade-carga-duração para o qual os efeitos benéficos são máximos. Ao contrário, a baixa atividade física, ou exercícios de intensidade e/ou duração insuficientes não apresentam os efeitos benéficos desejáveis, enquanto que o exercício extenuante ou de alta intensidade e longa duração tende a ser prejudicial ao organismo, desencadeando, inclusive depressão imunológica (WOODS et al. 2000; PEIJIE et al., 2003).

A maioria dos programas de exercício físico estudados experimentalmente e aplicados a seres humanos refere-se a esquemas de treinamento. Ou seja, esquemas de atividade física envolvendo exercícios físicos praticados cronicamente. E, com efeito, os melhores efeitos obtidos a partir do exercício físico são aqueles em que os indivíduos submetem-se cronicamente a esquemas específicos e controlados que acabam por servir de suporte para vários tipos de terapia, incluindo o câncer, imunossupressão adquirida e outras doenças crônico-degenerativas (VANCINI et al., 2005; COSTA ROSA, 2004). Cronicamente, a atividade física exerce forte influência sobre o sistema imunológico através de, pelo menos, dois mecanismos diversos: um metabólico e outro neuro-endócrino (COSTA ROSA, 2004).

Contudo, os mecanismos exatos pelos quais a atividade física regular é capaz de “realçar” a função imunológica permanecem largamente desconhecidos.

Se os notórios efeitos benéficos da atividade física crônica apresentam uma série de pontos incongruentes e, muitas vezes, obscuros, do ponto de vista mecanístico, mais surpreendentes ainda são os efeitos agudos do exercício físico sobre o sistema imunológico. É notável que uma série de diferentes protocolos de exercício sejam capazes de induzir rápidas alterações imunológicas, como a leucocitose, isto é, aumento na quantidade de leucócitos circulantes algumas horas após a realização de exercícios físicos. A atividade física aguda (em indivíduos sedentários ou voluntários não-treinados) promove aumento de mais de 50% na quantidade de monócitos no sangue periférico, numa resposta que depende da intensidade e duração do exercício (WOODS et al., 2000).

Uma das hipóteses para a rápida resposta do organismo ao exercício físico agudo seria a produção de radicais livres e espécies ativas do oxigênio (também chamadas de espécies reativas do oxigênio, EROs), como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion radical superóxido (O_2^-), o radical hidroxila ($\cdot OH$), e as espécies reativas do nitrogênio (ERNs), como o óxido nítrico (NO) e o ânion peroxinitrito ($ONOO^-$), este último, espécie extremamente instável que se desintegra espontaneamente dando origem ao radical hidroxila. Uma vez que o exercício físico induz grandes aumentos no consumo de oxigênio de uma maneira geral, a produção de EROs tende a aumentar durante os períodos de atividade física intensa, mesmo que de forma aguda, o mesmo acontecendo com a produção ERNs produzidas pelo próprio músculo e pelas células endoteliais estimuladas pelo aumento induzido no fluxo sangüíneo para a musculatura esquelética (RADEGRAN & HELLSTEN, 2000). Na verdade, vários estudos sugerem que a produção de radicais livres e outras EROs e ERNs estejam por trás dos distúrbios do estado redox celular observados no músculo esquelético durante certos tipos de exercício (SALO et al., 1991; POWERS & LENNON, 1999). Para se defender da potencial injúria causada pela ação destas espécies reativas, as fibras musculares dispõem de mecanismos enzimáticos e não-enzimáticos que compõem um verdadeiro arsenal antioxidante. Em resposta ao estresse oxidativo causado pelo exercício extenuante, as células musculares disparam, inicialmente, a expressão de enzimas, como a superóxido dismutase (**SOD**, EC 1.15.1.1, que dismuta o ânion superóxido em peróxido de hidrogênio), a catalase (**CAT**, EC 1.11.1.6, que converte o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio) e glutathiona peroxidase

(**GSPx**, EC 1.11.1.9, que reduz peróxidos inorgânicos e hidroperóxidos a seus respectivos álcoois na dependência de moléculas de glutathione, GSH). Além disso, existem vias não-enzimáticas que levam à proteção mediada por vitaminas antioxidantes, como os tocoferóis (vit E), o ascorbato (vit C), os carotenóides (vit A), e pela própria glutathione (**GSH**), principal antioxidante intracelular hidrossolúvel (POWERS & LENNON, 1999).

Tendo em vista que as células imunológicas são extremamente sensíveis a alterações no estado redox celular, não se pode descartar a possibilidade de que alterações redox induzidas pelo exercício físico (mesmo que apenas agudas) possam modificar a função de células imunológicas imprimindo-lhes maior “potência” também contra infecções e outras situações adversas. Linfócitos, por exemplo, são enormemente afetados pelo estado redox celular. Certas funções linfocitárias, como síntese de DNA e expressão de vários genes relacionados ao processo proliferativo (indispensável para a expansão clonal e resposta imunológica adequada durante o crescimento tumoral e em infecções bacterianas e virais), são muito sensíveis ao estresse oxidativo e, portanto, são favorecidas em ambientes intracelulares mais redutores (com altas concentrações de GSH; DRÖGE & BREITKREUTZ, 2005). Por outro lado, um “ligeiro” estado de estresse oxidativo é necessário para a ativação do fator nuclear κ B (NF- κ B) que é o responsável direto pela transcrição de uma série de genes relacionados com o disparo da resposta imunológica, como interleucinas, receptores para interleucinas e para a própria síntese de novas moléculas de GSG, via indução da γ -glutamylcisteína sintetase (γ -GCS), enzima-chave da síntese deste tripeptídeo redutor (DRÖGE, 2002).

Da mesma forma que os linfócitos, macrófagos são afetados de maneiras diversas pelo exercício físico. Sua capacidade fagocitária e de combate a microorganismos e células tumorais pode ficar seriamente afetada em indivíduos submetidos à atividade física extenuante, particularmente de longa duração (WOODS et al., 2000; PEDERSEN et al., 2001). Por outro lado, está bem documentado que, no exercício agudo (em indivíduos ou animais experimentais sedentários), observa-se uma intensa leucocitose poucas horas após a atividade física (WOODS et al., 2000). Em todos os casos observados, nota-se que fatores neuro-humorais parecem estar envolvidos neste processo de recrutamento de monócitos da medula óssea para a circulação sistêmica (WOODS et al., 2000; COSTA ROSA, 2004).

SISTEMA IMUNOLÓGICO

O objetivo do sistema imunológico é reconhecer os organismos estranhos invasores, impedir sua disseminação e finalmente eliminá-los do corpo. Consiste de bilhões de células de vários tipos que interagem com o agente invasor e entre si para combater a alteração homeostática percebida por estas células. Indivíduos saudáveis protegem-se contra a ação de microorganismos por vários mecanismos que incluem barreiras físicas, células fagocitárias e respostas humorais (PARHAM,2001).

As respostas imunológicas consistem de diferentes “protocolos” celulares e humorais que levam à ativação de células fagocíticas (como macrófagos e neutrófilos) ou à produção maciça de anticorpos com conseqüente inativação de constituintes considerados como “estranhos” ao organismo (PEAKMAN,1999).

Além da resposta imunológica celular e da mediada por anticorpos (que faz parte da resposta humoral), existe uma outra categoria de moléculas de proteção imunológica, o sistema complemento. Complemento é o nome dado a uma espécie complexa de cerca de 20 proteínas as quais, juntamente com a coagulação sangüínea, a fibrinólise e a formação de cininas, formam um sistema enzimático passível de ativação. Trata-se de uma cascata de proteínas encontrados no plasma que produzem uma resposta rápida e altamente amplificada (PARHAM, 2001) tendo uma importante função na imunidade inata (PARKIM, 2000).

Vários componentes do complemento são designados pela letra “C” seguida por um número no qual é relacionado mais a cronologia da sua descoberta do que a sua posição na seqüência de reação. O componente mais abundante e mais central é o C3. Sob circunstâncias normais, pequenas quantidades de C3 são clivadas gerando o produto C3b ou C3i. Uma vez ativado, o sistema complemento leva à formação de um poro (canal) anfipático capaz de inserção na bicamada lipídica e polimerização em um complexo de ataque à membrana da célula invasora, o que acaba por destruí-la.

O complemento possui funções defensivas: as células fagocíticas possuem receptores para C3b que facilitam a aderência de microorganismos cobertos por C3b à superfície da célula, esse processo recebe o nome de opsonização. Durante o processo, fragmentos ativos e quimiotáticos para neutrófilos são liberados. Além disso, esses fragmentos possuem notável capacidade de atuar diretamente no endotélio vascular para produzir vasodilatação e aumento

da permeabilidade, um efeito que parece ser prolongado pelo leucotrieno B₄ liberado por mastócitos, neutrófilos e macrófagos ativados.

Outros mecanismos de defesa são induzidos ou estimulados pela exposição a substâncias estranhas. São específicos para macromoléculas distintas e aumentam a magnitude e capacidade defensiva com cada exposição sucessiva a algumas macromoléculas em particular. Estes mecanismos constituem a imunidade adquirida ou específica.

O sistema imunológico específico, ou segundo PARHAM (2001), adaptativo, “lembra-se” de cada encontro com um antígeno estranho, de modo que os encontros subsequentes estimulem cada vez mais os mecanismos de defesa e a isto é dado o nome de memória imunológico. A resposta imunológica específica amplifica os mecanismos protetores da imunidade natural, direciona ou localiza estes mecanismos aos locais de entrada do antígeno, isto porque utiliza “moléculas de reconhecimento” que são proteínas que se ligam a moléculas produzidas pelos patógenos ou transportados em sua superfície, desta forma torna-os mais capazes de eliminar os antígenos estranhos.

Algumas moléculas de reconhecimento estão livres na circulação, outras são proteínas receptoras presentes nas células do sistema imunológica (PARHAM, 2001). Estas moléculas especiais são chamadas de anticorpos, ou imunoglobulinas, por fazerem parte da fração γ -globulina do plasma sanguíneo (PARKIN,2001).

EXERCÍCIO FÍSICO E SISTEMA IMUNOLÓGICO

A atividade física reduz o risco de muitas doenças, como o câncer, promovendo a ativação do sistema imunológico em animais, com inibição concomitante do crescimento tumoral e aumentando a expectativa de vida (ORTEGA,1998), aumento da sensibilidade a insulina, melhora na oxigenação, na massa óssea e manutenção da musculatura. (SUGIURA, 2001). Por outro lado, a prática do exercício físico parece evitar o surgimento de novas neoplasias (WOODS, 1994), pode fazer a inibição do crescimento tumoral (*e.g.* Linfoma de Dalton). Paralelamente, como apresentado acima, a atividade física tende a levar a um aumento na quantidade de monócitos circulantes, favorecendo, portanto a atividade tumoricida e produção de moléculas de interleucina-1, fator de necrose tumoral e óxido nítrico,

comprovando levando à regressão do crescimento do tumor como consequência do treinamento do exercício físico (SINGH, 2005).

A intensidade moderada do exercício é mais recomendada para reduzir o risco de neoplasias e aumento da capacidade de ativação da função imunológica (SUGIURA, 2002), já o exercício intenso deprime a função imune (SUGIURA, 2002) e (NATALE, 2000). Estudos sugerem que este tipo de exercício estimule a atividade dos macrófagos e que as espécies ativas do tipo EROs e ERNs possam estar envolvidas (WOODS, 1994).

Conforme mencionado acima, o exercício moderado induz a uma intensa leucocitose imediata cuja magnitude está relacionada com a intensidade e duração da atividade que está sendo realizada. Ao contrário, após exercícios de longa duração, a contagem de linfócitos cai abaixo do limite inferior da normalidade (NATALE, 2000; PEDERSEN et al., 2001). OSTROWSKI et al. (1999) notaram que o exercício intenso aumenta circulação de mediadores pró-inflamatórios e, com base nesses estudos, CONNOLLY et al. (2004) concluíram que o exercício intenso aumenta o número de células mononucleares no sangue periférico em humanos. Estudos realizados em adultos e crianças demonstraram que o exercício estimula a produção de fatores de crescimento e estresse, como a interleucina-6 (CONNOLLY, 2004). A prática da atividade física como mecanismo de prevenção de patologias exige o entendimento de diversas fases metabólicas produtoras de ATP e consumidoras de oxigênio para que se possa aproximar mais rapidamente do balanço entre a liberação das espécies reativas e a produção e liberação de mecanismos biológicos de defesa contra a carga de espécies reativas, ou seja, os sistemas antioxidantes.

O exercício induz consideráveis alterações fisiológicas no sistema imune. HOFFMAN & PEDERSEN, em 1994, sugeriram que o exercício representa uma modalidade de estresse físico. São muitos os fatores estressantes vistos em clínica como (trauma, sepse) induzindo respostas hormonais e imunológicas. MOOREN et al., em 2002, verificaram, em trabalhos realizados com exercício exaustivo e moderados, que após o exercício poderia ocorrer apoptose (morte celular programada) e que este processo poderia contribuir para regular a resposta imunológica após o exercício exaustivo. Experimentos realizados com seis semanas de treinamento pesado mostraram que o exercício induz disfunção imunológica dependente de

resposta neuro-endócrina (PERJIE, 2003). Durante o exercício, ocorre a secreção de vários hormônios que atuam para assegurar a disponibilidade de glicose e ácidos graxos livres para o metabolismo energético muscular, como a secreção de glucagon pelo pâncreas, catecolaminas pela medula adrenal, todos atuando juntos para aumentar a glicogenólise hepática especialmente. O cortisol, também liberado em resposta ao exercício, aumenta o catabolismo protéico, liberando aminoácidos para serem utilizados pelo fígado no processo de gliconeogênese. Além disso, o hormônio de crescimento aumenta a mobilização de ácidos graxos livres e reduz a captação celular de glicose, conseqüentemente menos glicose é utilizada pelas células (uma maior quantidade permanece na circulação) e os hormônios da tireóide promovem o catabolismo da glicose e o metabolismo das gorduras (WILMORE E COSTILL, 2001). Quanto maior a intensidade do exercício, maior é a liberação de catecolaminas, (MALM, 1999). Quando as reservas de carboidratos estão baixas o sistema Endócrino pode acelerar a oxidação de gorduras (lipólise) assegurando, dessa forma, que sejam supridas as necessidades energéticas do músculo. A lipólise também é aumentada pela elevação da adrenalina e noradrenalina. Todos esses fatores podem contribuir, de uma maneira ou de outra, para as alterações observadas nas células imunológicas após o exercício.

O exercício proporciona no indivíduo uma resposta como infecção ou tecido usado envolvendo produção de citocinas que são liberadas quando tem inflamação. Algumas citocinas facilitam um influxo de linfócitos, neutrófilos e monócitos e outras células, e algumas participam na destruição dos antígenos e na recuperação tecidual. No estudo realizado por MALM et al. (1999), para “estressar” o sistema imunológico, foi usado o exercício excêntrico, por ser um tipo de exercício que causa inflamação muscular e aumenta a capacidade de adesão celular.

TNF e CITOCINAS

Macrófagos e outras células do sistema mononuclear fagocitário engolfam ativamente grandes partículas. Portanto, desempenham importante papel na apresentação de antígenos derivados de microorganismos infecciosos, como bactérias e os parasitas (PEDERSEN,2000). A apresentação macrofágica dos antígenos microbianos a alguns linfócitos TCD4+ resulta na secreção da citocina interferon- γ (IFN- γ) pelos linfócitos T. O IFN- γ ativa os macrófagos a

se tornarem matadores mais efetivos dos microorganismos. Estas citocinas são proteínas solúveis secretadas por linfócitos T e por outros tipos celulares em resposta a estímulos ativadores (HOLLAND,2002). As citocinas medeiam muitas funções efetoras das células que as produzem e são os principais mecanismos pelos quais várias populações de células inflamatórias e imunológicas se comunicam. Na imunidade natural, as citocinas efetoras são produzidas principalmente por fagócitos mononucleares e costumam se chamadas de monocinas. (KOHUT,2004)

O fator de necrose tumoral ($TNF\alpha$), anteriormente chamado de caquectina, por estar associado à intensa caquexia que acompanha os estágios finais de desenvolvimento tumoral, é o principal mediador da resposta do hospedeiro a bactérias gram-negativas e também pode desempenhar um papel na resposta a outros microorganismos infecciosos (SUGIURA,2001). Altas concentrações de $TNF\alpha$, no entanto, causam lesão tecidual, coagulação intravascular disseminada e choque, podendo resultar em óbito (SUGIURA,2001). A principal fonte celular de $TNF\alpha$ é o fagócito mononuclear (macrófago), especialmente quando ativado por lipopolissacarídeos (LPS) provenientes de bactérias gram-negativas. O $INF-\gamma$ produzido pelos linfócitos aumenta a síntese de $TNF\alpha$ por fagócitos mononucleares. Desta forma, o $TNF\alpha$ é um mediador das imunidades naturais e adquiridas. O $TNF\alpha$ faz com que as células endoteliais vasculares expressem certos receptores de superfície (moléculas de adesão) que fazem a superfície celular endotelial tornar-se aderente para leucócitos, inicialmente neutrófilos e, subseqüentemente, para monócitos e linfócitos (HOLLAND,2002). Se o estímulo para $TNF\alpha$ for suficientemente forte serão produzidas quantidades maiores de citocinas. Nesta situação, o $TNF\alpha$ entra na corrente sanguínea onde pode atuar como hormônio endócrino. O $TNF\alpha$ atua nos fagócitos mononucleares e talvez nas células endoteliais vasculares estimulando a secreção de IL-1 e IL-6 na circulação, atua também nos hepatócitos onde aumenta a síntese de certas proteínas do soro. A combinação de proteínas plasmáticas derivadas do hepatócito induzidas por $TNF\alpha$ ou IL-1 mais as induzidas por IL-6 constitui a resposta aguda aos estímulos inflamatórios. Além disso, o $TNF\alpha$ ativa o sistema de coagulação principalmente por alterar o equilíbrio entre as atividades pró-coagulantes e anticoagulantes do endotélio vascular. A administração sistêmica em longo prazo de $TNF\alpha$ a animais de experimentação causa alterações metabólicas de caquexia, um estado caracterizado

por intenso catabolismo generalizado e atrofia de células musculares e adiposas (HOLLAND,2002).

Diversas ações específicas do TNF α podem contribuir para seus efeitos letais em concentrações extremamente altas. O TNF α reduz a perfusão tecidual por depressão da contractilidade do miocárdio. O mecanismo desta ação parece envolver indução de uma enzima nos miócitos cardíacos, a sintase do óxido nítrico (NOS) que converte L-arginina em L-citrulina e NO. O NO produzido pelas NOS inibe a contractilidade miocárdica. O TNF α reduz ainda mais a pressão arterial e a perfusão tecidual por relaxar o tono da musculatura lisa vascular. O TNF α pode atuar diretamente sobre as células da musculatura lisa e também atua indiretamente por estimulação da produção de vasodilatadores, como a prostaciclina e o NO pelas células endoteliais vasculares (HOLLAND,2002).

O MACRÓFGAGO E O SISTEMA IMUNOLÓGICO

O sangue é um tecido fluido, formado por uma porção celular que circunda em suspensão num meio líquido, o plasma. A porção celular, denominada hematócrito, representa aproximadamente 45% de um volume determinado de sangue, e o plasma representa 55% restantes (CURI & PERES, 2005). O órgão central formador das células do sangue é a medula óssea (situada nos ossos esponjosos adultos), na qual se localizam as células pluripotentes (células tronco) que estão constantemente produzindo células maduras (ou diferenciadas) para serem lançadas no sangue. Na medula óssea ocorre a proliferação ou multiplicação das células pluripotentes e, também, sua diferenciação. As células do sistema imunológico estão presentes em todo o corpo e são principalmente os glóbulos brancos (ou leucócitos) e as células teciduais relacionadas a ele; todos originárias da medula óssea, de onde migram para se diferenciar ainda mais e realizar suas funções.

A tarefa de destruir os microorganismos patogênicos é realizada principalmente pelo macrófago, objeto de nossa discussão, e o neutrófilo (PARHAM, 2001). O primeiro precursor dos macrófagos é o pró-monócito encontrado em grande número na medula óssea. Os pró-monócitos são células que se dividem rapidamente, entram no sangue, tornando-se monócitos (são tipos celulares que tem de 10 a 15 μ m de diâmetros), os quais circulam por 24 a 48 horas

após o que migram aparentemente de maneira aleatória para os diferentes tecidos onde diferenciam-se em macrófagos (PEAKMAN, 1999).

Segundo WOODS (1994), os monócitos constituem uma forma imatura do macrófago e apresentam-se apenas em pequeno número no sangue periférico (aproximadamente 5% das células mononucleares do sangue; PEAKMAN, 1999). Possuem um único núcleo e abundantes grânulos citoplasmáticos.

O monócito encontra-se em tecidos inflamados e lançam mediadores químicos, como a histamina, proteínas do complemento, leucotrienos, IFN- α , proteína inflamatória do macrófago (MIP) e fator de ativação plaquetária (PAF). Os monócitos migram para o endotélio vascular unindo-se a moléculas de adesão específicas (ICAM-1) e através da diapedese atravessam o vaso e vai para os tecidos. Uma vez nos tecidos, os monócitos diferenciam-se em macrófagos que, por razões históricas (SUGIURA, 2001) foram considerados, por décadas, como células secundárias de pouca importância no sistema imunológico. Acreditava-se que a principal função dos macrófagos fosse a de digerir células mortas e/ ou produtos, sendo assim considerados como lixeiros (*scavengers*) do corpo. Contudo, imunologistas das décadas de 1960-70 sabiam muito bem que a ativação dos macrófagos era fundamental para conferir resistência a vários patógenos intracelulares (MACKANESS, 1969). No entanto como a ativação dependia dos linfócitos, acreditava-se que os macrófagos tivessem apenas uma função acessória neste processo.

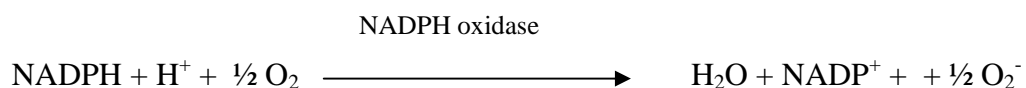
Os fagócitos mononucleares, como também são chamados, têm como função básica fagocitar partículas estranhas (MAK, 2002). As substâncias fagocitadas são degradadas no interior dos macrófagos por enzimas lisossômicas. As células secretam enzimas, espécies ativas de oxigênio reativo, óxido nítrico e mediadores lipoderivados, como prostaglandinas. Esses produtos são usados para matar micróbios e controlar a propagação das infecções, mas podem também lesar tecidos normais nas proximidades da inflamação. Os fagossomos contendo os microorganismos recentemente capturados são fundidos com grânulos pré-formados dos macrófagos que contém enzimas hidrolíticas degradativas e oxidases dependentes de NADPH. As oxidases dependentes de NADPH geram radicais tóxicos do oxigênio e do peróxido de hidrogênio, este sendo rapidamente convertido em ácido hipocloroso. Os fagócitos ativados também produzem óxido nítrico (NO), gerado a partir da

L-arginina e do oxigênio pela enzima induzível sintase do óxido nítrico (iNOS). O óxido nítrico (NO) reage com os radicais do oxigênio no fagolisossomo produzindo peroxinitrito, que é altamente tóxico. Esse ataque oxidativo gerado aos microorganismos ingeridos é acompanhado por um aumento transitório no consumo de oxigênio denominado de pico (ou *burst*, como no inglês) respiratório (MAK,2002).

Além da função de pinocitose, fagocitose e diferenciação intracelular, os fagócitos são células ativamente secretoras de um grande número de substâncias como ativadores de plasminogênio, colagenase e elastase, proteases lisossômicas, lisozima, proteínas do complemento, interferon, interleucina, fatores de crescimento, citotoxinas, produtos de baixo peso molecular (ABBAS, 1998). Além disso, a existência da heterogeneidade das populações do macrófago entre os diferentes tecidos, traz a plasticidade do sistema imune (WOODS, 2000).

FAGOCITOSE

Antes de a fagocitose ocorrer, os microorganismos precisam, em primeiro lugar, aderir à superfície do macrófago (PARHAM, 2001). Dependendo de sua natureza, a partícula ligada à membrana pode iniciar a fase de ingestão ativando um sistema contrátil de actina-miosina, o qual permite que os macrófagos estendam pseudópodos em volta da partícula (PEAKMAN, 1999). Como os receptores adjacentes ligam-se subseqüentemente à superfície do invasor, a membrana plasmática é colocada em volta da partícula com um zíper até que ela esteja completamente presa em um vacúolo. No momento em que a fagocitose é iniciada, há um aumento na atividade do ciclo da hexose monofosfato gerando nicotinamida-adenina-dinucleotídeo fosfato reduzido (NADPH). Os elétrons passam do NADPH para um único citocromo da membrana plasmática (cit b 558), que reduz o oxigênio molecular diretamente a ânion superóxido. Portanto, a reação-chave catalisada pela NADPH oxidase que inicia a formação de intermediários reativos do oxigênio pode ser escrita como:



O ânion superóxido sofre conversão em peróxido de hidrogênio sob a influência da superóxido dismutase, podendo, subsequentemente, ser transformado em radical hidroxila (.OH) quando na presença de metais de transição. Este, em particular, é um dos mais reativos radicais livres conhecidos e é capaz de induzir enorme destruição celular, especialmente em nível de membrana plasmática. Depois disso, os microorganismos mortos são digeridos por enzimas hidrolíticas e os produtos da degradação, liberados para o exterior. Por se tratar de um parâmetro típico da atividade funcional destas células, a fagocitose de partículas específicas é amplamente utilizada como índice da “capacidade imunológica/inflamatória” dos macrófagos.

FASE AGUDA DA INFLAMAÇÃO

O exercício físico agudo promove, como se viu anteriormente, um processo inflamatório agudo que envolve um influxo de leucócitos, complemento, anticorpos e outras proteínas plasmáticas ao local da injúria. Alguns mediadores agem diretamente na musculatura lisa das paredes que circundam as arteríolas para alterar o fluxo sanguíneo. Outros atuam nas vênulas e promovem a contração das células endoteliais o que abre, de forma transitória, as junções inter-endoteliais, com conseqüente extravasamento de plasma (PEDERSEN,2000). A migração de leucócitos a partir da corrente sanguínea é facilitada pelas citocinas que regulam a expressão de moléculas de aderência nas células endoteliais e nos leucócitos e, quimiocinas que levam ao local inflamado (SUGIURA, 2001).

Durante uma infecção, produtos microbianos como as toxinas estimulam os macrófagos a liberarem interleucina -1 (IL-1), também conhecida como pirógeno endógeno (inicialmente capaz de aumentar as nossas defesas gerais para elevação da temperatura corporal), fator de necrose tumoral (TNF α) que estimula as células endoteliais a regular positivamente a molécula de adesão seletiva E, e um grupo de quimiocinas (citocinas quimiotáticas), como a IL-8 que são quimiotáticas muito efetivas para polimorfonucleares (PMN) e IL-6 (SUGIURA, 2002)..

Aparentemente, a resposta de fase aguda atinge um efeito benéfico pelo aumento da resistência ao hospedeiro, minimizando a injúria ao tecido e promovendo a resolução e o reparo da lesão inflamatória. Isto resulta da deposição de C3b na superfície do micróbio que se torna opsonizado (pronto para ser servido) para aderência dos fagócitos. Ocorre uma ativação

de macrófagos e de receptores envolvidos no reconhecimento de patógenos e/ou seu produto de ativação, o que irá induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF α , IL-6 e IL-12. Este conjunto induz, no endotélio, um aumento de moléculas de adesão, que por sua vez medeiam a migração de leucócitos polimorfonucleares (principalmente neutrófilos). Dentre os mecanismos de destruição que são supra-reguladores estão aqueles mediados por intermediários reativos do oxigênio e NO. Ocorre o reconhecimento, ativação, secreção de citocinas, moléculas de adesão e migração (PARHAM, 2001).

Ao mesmo tempo em que se inicia a inflamação aguda, as células dendríticas dos linfonodos, perdem a capacidade fagocítica, porém adquirem uma maior capacidade imunogênica devido à expressão de moléculas do MHC (PEDERSEN, 2000). O processo de dilatação capilar (vermelhidão) exsudação de proteínas plasmáticas e fluidas (edema) devido às mudanças de pressão hidrostática e osmótica, e o acúmulo de neutrófilos são, coletivamente, chamados de resposta inflamatória aguda. Se o processo inflamatório persiste, seja por sua resistência ao dano metabólico, seja por incapacidade do sistema imunológico deficiente de eliminar um microorganismo infeccioso, o caráter da resposta celular muda. O local torna-se dominado por macrófagos com morfologias variadas: muitos tem uma aparência de ativados, alguns formam arranjos do que são denominados células “epitelióides” e outros fundem-se para formar células gigantes (PEAKMAN, 1999).

ESTRESSE OXIDATIVO

Quando um organismo é exposto a um estímulo estressor, o corpo sofre adaptações para ajudar na recuperação da homeostase. Desse modo, qualquer estímulo que leve a produção excessiva de radicais livres e/ ou a depleção de antioxidantes conduz a uma alteração significativa do balanço entre a produção e remoção de radicais livres e caracteriza a situação conhecida como **estresse oxidativo** (DRÖGE, 2002; URSO & CLARKSON, 2003).

Um radical livre é definido como qualquer átomo, grupo de átomos ou molécula com um elétron desemparelhado ocupando uma órbita externa. A enzima superóxido dismutase (SOD) foi descoberta por McCORD E FRIDOVICH (1969), o que representou um marco no estudo dos radicais livres. O ânion superóxido (O_2^-), o radical hidroxila e o óxido nítrico (NO) são exemplos de radicais livres. Existem, entretanto, compostos igualmente reativos que não

possuem elétrons não-pareados na última camada e portanto, não podem ser classificados como radicais livres. Essas substâncias são classificadas de maneira mais ampla como espécies reativas de oxigênio (EROs) ou espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e incluem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o cátion nitrosônio (NO^+), o ânion nitroxila (NO^-) e o peroxinitrito ($ONOO^-$) (DRÖGE,2002). Estas espécies são formadas pela redução incompleta do oxigênio, gerando espécies que representam alta reatividade para outras biomoléculas, principalmente lipídios e proteínas das membranas celulares e até mesmo o DNA (SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004).

O estresse oxidativo é uma condição celular ou fisiológica onde se observa elevada concentração de EROs/ERNs que causam danos moleculares às estruturas celulares, com conseqüente alteração funcional e prejuízo das funções vitais (DRÖGE,2002) em diversos tecidos e órgãos, tais como músculo, fígado, tecido adiposo (BARJA DE QUIROGA, 1992; GOLFARB, 1993), vascular (DUARTE et al, 1993; FENSTER et al, 2002) e cerebral (SIGNORINI, 1993; HALLIWEL,1994; KEYNES & GARTHWAITE, 2004), apresentam efeitos cumulativos e estão relacionados a uma série de doenças (SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004), tais como, aterosclerose, diabetes, infecção pelo vírus HIV, injúria de isquemia/reperfusão, doença de Parkinson, artrite reumatóide, catarata, enfisema, etc, em todas elas, a injúria (isquemia, trauma, toxinas, radiação, infecção entre outros) determina alterações intracelulares, como o recrutamento de macrófagos, dano mitocondrial, interferência com defesas antioxidantes, aumento do cálcio intracelular, conversão da xantina- desidrogenase a xantina oxidase e geram estresse oxidativo (BELLÓ-KLEIN, 2002)

As EROs também podem ter efeito benéfico, no entanto. O ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio, por exemplo podem estimular a formação de “segundos mensageiros” como o GMPc e o óxido nítrico (NO) no controle do relaxamento da musculatura lisa vascular e na inibição da adesão plaquetária (BELLÓ-KLEIN, 2002). Existem estratégias celulares de defesas contra os processos mediados por EROs e ERNs, enzimáticas e não-enzimáticas, conforme discutido no princípio deste capítulo.

Entre os antioxidantes não-enzimáticos hidrossolúveis, encontramos o ácido ascórbico, a GSH, o ácido úrico (LLESUY et al., 2002). A GSH é um tripeptídeo de ácido α -glutâmico,

cisteína e glicina que atua como substrato da glutathiona peroxidase e muitos outros processos de defesa antioxidante dentro e fora das células.

O efeito deletério do estresse oxidativo varia consideravelmente de um ser vivo para outro, de acordo com a idade, o estado fisiológico e a dieta (NIESS et al, 1999), sendo que o exercício também é fonte de estresse oxidativo (ELSAYED et al., 2001).

O exercício está associado ao aumento da geração de radicais livres principalmente devido ao dramático aumento do consumo de O₂ pelos tecidos ativos (COOPER et al, 2002; CAZZOLA et al, 2003; ZOPPI et al, 2003). Durante a atividade muscular, a demanda energética pode superar em 35 vezes a demanda de repouso e durante sua realização ocorre um grande aumento no consumo de oxigênio devido ao trabalho muscular (SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004). O exercício agudo gera estresse oxidativo, já bem documentado, e os estudos demonstram que a elevação do estresse oxidativo no sangue é resultado direto da geração de superóxido no músculo esquelético sendo 1-3% da atividade metabólica total. (QUINDRY, 2003). Estudos também demonstraram que a quantidade de radicais livres nos tecidos biológicos está aumentada após o exercício agudo e/ou crônico e que esse aumento coincide com a presença de danos teciduais (BLOOMER & GOLDFARB, 2004).

A produção de radicais livres durante o exercício também está associada ao aumento da liberação de catecolaminas e sua auto-oxidação (COOPER et al, 2002; URSO & CLARKSON, 2003), aumento do metabolismo de prostanóides, das enzimas xantina oxidase e NADPH oxidase, da oxidação de bases purínicas, danos às proteínas que contenham o íon ferro, distúrbios da homeostase do Ca²⁺ e outras fontes secundárias, tais como a liberação de macrófagos pelo sistema imunológico para o reparo de tecidos danificados (MASTALOUDIS et al, 2004). Os danos associados ao estresse oxidativo induzidos pelo exercício intenso estão relacionados com a diminuição do desempenho físico, fadiga muscular, danos musculares e até a síndrome de sobre-treinamento (KONING et al, 2001) promovendo alteração do sistema imune (VIDER et al, 2001) e do estado de treinamento dos indivíduos (ALESSIO et al, 2000). Em geral, os danos musculares causados pelo estresse oxidativo são mais acentuados em indivíduos pouco treinados, que realizam exercícios com intensidade e duração acima de seu estado de condicionamento físico (LAMPRECHT et al, 2004).

O exercício crônico aumenta também a expressão de uma classe especial de proteínas de estresse, as proteínas de choque térmico (HSPs), que têm como função o reparo e prevenção de danos teciduais (HAMILTON et al, 2003; SIU et al 2004) no músculo esquelético e no músculo cardíaco, por exemplo, sendo capazes de reduzir a extensão da apoptose (morte celular programada) em ratos que realizaram exercício aeróbio moderado, por diminuir os níveis de genes pró-apoptóticos e aumentar os níveis de genes anti-apoptóticos, como observado ao final do treinamento (SIU et al,2004).

Uma das principais conseqüências de estresse oxidativo é a peroxidação lipídica (McBRIDE & KRAEMER,1999). Um dos produtos da peroxidação lipídica da membrana é o malondialdeído, um aldeído altamente reativo, que eventualmente reage com aminogrupos de proteínas, fosfolipídios ou ácidos nucleicos, induzindo modificações estruturais das moléculas biológicas (McBRIDE & KRAEMER,1999). O exercício agudo pode induzir peroxidação lipídica conduzindo a problemas como a inativação de enzimas da membrana celular (MASTALOUDIS et al, 2001) diminuição da efetividade do sistema imune e progressão de doenças crônico-degenerativas, como o câncer e doenças cardiovasculares (VITALA et al, 2004), além de que, em função do incremento do consumo de oxigênio, promove o aumento da formação de EROs; já o treinamento físico é capaz de gerar adaptações capazes de minimizar os efeitos deletério das EROs (SCHNEIDER & OLIVEIRA, 2004).

ENDOTÉLIO VASCULAR, ESTADO REDOX CELULAR E INFLAMAÇÃO

O endotélio controla ativamente uma série de funções celulares e moleculares incluindo a permeabilidade seletiva a íons, proteínas e nutrientes, tráfego de leucócitos do sangue para os tecidos, atividade contrátil e proliferativa da musculatura lisa vascular, reparos na parede vascular após a lesão, hemostasia e tônus vascular. As células que formam o endotélio estão dispostas controlando a saída de leucócitos para o interstício e respondem a estímulos inflamatórios, com abertura dos espaços intercelulares e organização do citoesqueleto. As células do endotélio apresentam receptores α -2 adrenérgicos que se estimulados levam a produção de NO participando desta forma do relaxamento da musculatura lisa dos vasos.

O ânion superóxido endotelial constitui-se em fator de contração dependente do endotélio exercendo sua função através da geração de radicais livres, é estimulado pelo estresse de cisalhamento (*shear stress*) provocado pelo contato com as paredes dos vasos, ativação dos canais de potássio que hiperpolarizam as células endoteliais, promovendo a entrada de cálcio do extracelular através de canais iônicos tipo *leaky* o que inicia a produção de NO, prostaglandinas e outros fatores vasodepressores, que ativa a transcrição de moléculas de adesão dependente da ligação do fator nuclear κ B (NF- κ B) ao sítio promotor de seus respectivos genes (HOMEM DE BITTENCOURT, 1998).

O NF- κ B é um fator regulador crítico da resposta patogênica imediata e de ativação do sistema imune (DRÖGE, 2002). Ele existe normalmente como um complexo citoplasmático inativo, cuja forma predominante é de um heterodímero composto das subunidades p50 e p65 (rel A), ligadas a uma proteína inibitória da família I κ B, usualmente a I κ B α . O NF- κ B é ativado em resposta a uma variedade de estímulos patogênicos, incluindo infecção viral bacteriana, exposição à radiação UV ou a citocinas inflamatórias. Sob estimulação específica, usualmente associada a alterações no estado redox (\uparrow [GSSG]/[GSH]) celular, a I κ B α é fosforilada pelo complexo IKK, o qual contém duas subunidades catalíticas (IKK- α e IKK- β) e uma subunidade regulatória IKK- γ , nos sítios que iniciam a ubiquitinação e degradação via proteosoma. A dissociação da I κ B α resulta na translocação do dímero NF- κ B para o núcleo, onde este fator liga a sítios κ B específicos do DNA, induzindo, rapidamente, uma variedade de genes codificando proteínas sinalizadoras. Os genes-alvo incluem os da ciclooxigenase-2, do óxido-nítrico sintase induzível, de diversas citocinas inflamatórias e quimiotáticas, receptores de citocinas, moléculas de adesão celular, assim como genes virais (SANTORO, 2000).

O NF- κ B está envolvido em muitos eventos patológicos, incluindo a inflamação e a progressão da AIDS, por aumentar a transcrição do HIV-1. Conseqüentemente o NF- κ B é um alvo terapêutico atrativo para novas drogas antiinflamatórias e antivirais, e a necessidade de desenvolvimento de inibidores efetivos para o NF- κ B incluem inibidores de serino-proteases, fenil-etil-éster do ácido cafêico e curcumina assim como corticóides e drogas antiinflamatórias não-esteróides, incluindo aspirina embora esta haja apenas em concentrações muito elevadas. As prostaglandinas ciclopentenônicas (CPPG) são potentes inibidores da ativação do NF- κ B

por citocinas, ésteres forbol, ou infecção viral, em células humanas. Estes eicosanóides agem inibindo a fosforilação e prevenindo a degradação do $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$. A IKK foi recentemente identificada como o alvo molecular para as CP-PG, as quais são encontradas ligadas diretamente ao resíduo cisteína na alça de ativação da subunidade $\text{IKK}\beta$. A inibição depende da presença de um segmento ciclopentenona-reativo, e resulta no bloqueio da transcrição do HIV-1 dependente de $\text{NF-}\kappa\text{B}$, em experimentos de transfecção.

A indução das HSP70 e a inibição dos $\text{NF-}\kappa\text{B}$ parecem estar correlacionadas e ambos parecem contribuir para a atividade antiviral da CPPG. Tem sido mostrado que a inibição do $\text{NF-}\kappa\text{B}$ por prostanóides ciclopentênicos está sempre associada e temporariamente correlacionada com a ativação dos HSF1. Também, a inibição do $\text{NF-}\kappa\text{B}$ por CPPG pode ser mimetizada por outros indutores da resposta ao choque térmico, incluindo indutores químicos, tais como arsenito de sódio, drogas antiinflamatórias não-esteróides, os metais pesados, cádmio e zinco, ou por hipertermia. Além disso, uma classe de conhecidos inibidores de $\text{NF-}\kappa\text{B}$ inibidores de serino-proteases, incluindo 3,4- dicloro-isocumarina, induzem a síntese de HSP 70 através da ativação do HSF-1 e possuem atividade antiviral. Neste caso, além da capacidade destas moléculas de inibirem a ativação do $\text{NF-}\kappa\text{B}$, também estão estreitamente associadas com a ativação do HSF-1. Estes resultados indicam que existe uma ligação entre as vias regulatória destes dois fatores e sugerem a possibilidade de que a ativação do HSF-1 poderia tornar as células de mamíferas não responsivas a estimulação por $\text{NF-}\kappa\text{B}$. Se este é o caso, a resposta ao choque térmico poderia regular outros aspectos da resposta celular ao estresse, e a inibição do $\text{NF-}\kappa\text{B}$ poderia contribuir para os bem conhecidos efeitos antiinflamatórios e citoprotetores que se seguem à ativação da resposta ao choque térmico em células humanas (SANTORO, 2000).

O efeito inibitório da resposta ao choque térmico frente aos mediadores de células doentes tem sido investigado, já se sabe que a resposta ao choque térmico inibe a expressão gênica pró-inflamatória e a produção de células mononucleares de Fator de Necrose tumoral α e interleucina 1β , produção de fibroblastos e interleucina G. Wrong também demonstra em seus estudos que a inibição de HSR induz a expressão do gene (iNOS), a regulação da expressão do gene (iNOS) tem sido bem estudada por atuar na patofisiologia da sepsis e na produção de NO. Feinstein et al, demonstrou que a HSR inibe a transcrição gênica de iNOS

inibindo a translocação nuclear de NF- κ B em células astrogliais em cultura, o mecanismo de inibição ocorre com HSR inibindo a citosina – mediando degradação do NF- κ B associando inibição da proteína I κ B. A magnitude do estresse térmico que é necessária para indução da HSR varia em algumas espécies e tipos de células e a mais induzível é a HSP70.

PROTEÍNAS DE CHOQUE TÉRMICO (HSP)

O termo Proteína de Choque Térmico (HSP) começou a ser adotado após a descoberta de RITOSSA (1962), que a exposição de células de glândulas salivares de *Drosophila buskii*, ao calor, dinitrofenol ou salicilatos, produzia o surgimento, em cromossomos, de um novo padrão de espessamento, que representava sítios específicos de transcrição para síntese de proteínas (POCKLEY, 2003). A descoberta é que a resposta ao choque térmico contribui para estabilidade e citoproteção em condições patológicas em uma variedade de doenças humanas incluindo isquemia, inflamação e infecção têm aberto novas perspectivas na medicina e farmacologia ativando moléculas de diferentes mecanismos (SANTORO, 2000).

O processo pelo qual as células respondiam ao estresse ficou conhecido como *Heat Shock Response* (HSR), ou resposta ao choque térmico, e é caracterizado por um aumento extremamente rápido na expressão de um grupo de proteínas chamadas de HSP, o que não ocorre apenas na exposição ao calor, mas em qualquer desafio metabólico, como depleção de glicose e análogos de aminoácidos (MEYER, 1999). Segundo este autor, macrófagos murinos expressam HSP quando expostos a agentes anti-reumáticos à base de sais de ouro, como auro-tiomalato de sódio e auranofin.

As HSPs podem ser agrupadas em famílias de acordo com suas seqüências de aminoácidos e com seus pesos moleculares (em kDa) determinado pelo método da SDS-PAGE (eletroforese em gel de poliacrilamida-sódio-dodecil-sulfato). Os pesos moleculares são similares como no exemplo da família da HSP 70 que tem HSP72 e HSP73, mas os padrões de indução e expressão são distintos (NIESS, 1999)

Vários tipos de estresse afetam a produção de ATP e afetam a produção de ATP e resultam em alterações similares na expressão de genes levando o acúmulo de HSP. Muitos destes agentes afetam a conformação correta e conseqüentemente a função das proteínas. Na

medida em que as proteínas são incorretamente dobradas se acumulam nas células e começa uma resposta ao estresse ou HSR. Esse processo tem início pela ativação do fator específico de transcrição chamado HSF-1 ou Fator de Choque Térmico, esse fator estaria na célula normal e não estressada como fator inativo. A medida que ocorre o estresse o HSF sofre trimerização e torna possível a ligação imediata a uma seqüência de nucleotídeos chamada de HSE ou Elemento de Choque Térmico, localizado dentro da região promotora dos genes que codificam as HSPs.(MEYER,1999)

A exposição prévia das células a estresses não-mortais pode suscitar a HSR com a síntese de HSP. Uma nova exposição das células a estresse vai produzir menos lesões. As células que sintetizam HSP ficam protegidas contra novas exposições, a que se reflete em menores lesões também no organismo ou em parte dele. O principal mecanismo de ação das HSPs mediante o qual confere proteção, seria o de atuarem como “chaperonas” moleculares (que serve para designar que as proteínas que foram enoveladas incorretamente fiquem retidas no RE e essas proteínas chaperonas garantiram um enovelamento com menor probabilidade de erros.

Em células de mamíferos, a indução da resposta ao choque térmico requer ativação e translocação para o núcleo de um ou mais fatores de transcrição de choque térmico que controlam a expressão de genes específicos codificando citoproteção de proteínas de choque térmico celular. Em todos os organismos estudados, observa-se que estes respondem a temperaturas de 3 a 5° C acima do normal com rápida transcrição gênica e subsequente mRNA resultando nas proteínas de choque térmico. Muitos outros estressores são capazes de induzir a síntese de algumas ou todas as proteínas de choque térmico além do exercício (NIESS, 1999), a depleção de glicose, influxo de cálcio e hipóxia prolongada (NOBLE, 1995).

As HSPs são proteínas presentes em diferentes compartimentos celulares e estão associadas com a variedade de processos celulares (LINDQUIST, 1988). O exercício físico pode aumentar a temperatura para 45° e causar também estresse oxidativo via aumento na produção de radicais de oxigênio e outras espécies reativas do oxigênio resultando da depleção de glicose e armazenamento de glicogênio (SALO, 1991), estimulando a expressão de HSP70 em leucócitos humanos após seis dias de exercício (HAMMOND, 1982). O significado da

expressão de HSP para a citoproteção de células imunológicas durante o exercício permanece por ser esclarecido.

ÓXIDO NÍTRICO

O óxido nítrico é um radical livre gasoso, pequeno e relativamente estável que prontamente se difunde nas células, onde reage com alvos moleculares. Apesar de servir como uma molécula sinalizadora-chave em diversos processos fisiológicos (*e.g.* defesa imunológica, comunicação neuronal e regulação vascular), pode causar ou contribuir para condições fisiopatológicas (*e.g.* choque vascular, diabetes, neurodegeneração, artrite e inflamação crônica) quando sua síntese é desregulada e excessiva (GROSS et al. 1995).

As células endoteliais apresentam receptores alfa-2 adrenérgicos que se estimulados levam a produção de NO. O NO também é produzido com as PGI₂ em resposta a pequenas lesões ou alterações na homeostase do endotélio. Antigamente, considerava-se apenas o SNA simpático como o principal responsável pelo tônus vascular necessário à manutenção da PA seguido do sistema-renina angiotensina e da vasopressina. Entretanto, estudos recentes sugerem que mecanismos vasodilatadores da via da L-arginina/NO constituam uma resposta adaptativa ainda mais importante para manutenção da homeostase (HOMEM DE BITTENCOURT, 1998).

NO pode interagir com uma variedade de substratos com o DNA, proteína, grupos protéicos, tióis, etc. e dependendo da concentração da atividade pode variar. A infusão de NO afeta uma centena de genes (BOGDAN, 2001), devido a isto o NO pode influenciar tanto o sistema imunológico. Em altas concentrações, o NO pode inibir praticamente toda a células do sistema imunológico T, B, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, Eosinófilos e mastócitos via indução de apoptose ou induzir a transcrição, citocinas, proteínas quinases, MHC, etc e também a migração de células no tecido inflamatório, a inibição de moléculas de adesão do endotélio. (BOGDAN, 2001 e SCHINDLER). Portanto, com esta gama de ações, não é surpreendente que seja um poderoso agente imunossupressor e antiinflamatório.

Durante a ativação de macrófagos na inflamação, a expressão das NOS gera NO e CO que possuem propriedades imunossupressoras. Estudos de PRIOR (2003) mostram que a arteriogênese é regulada pelo NO, fatores angiogênicos ao shear stress (estresse de

cisalhamento) em resposta a estimulação de receptores localizados nas células musculares lisas dos vasos. O NO tem impacto significativo no tônus vasomotor e a medição do NO é incrementada pelo fluxo de sangue e da oclusão do tecido distal. Em mamíferos, como resultado de seus efeitos antimicrobianos, o NO e outros RNS estão envolvidos na defesa do organismo (“host defense”). A geração de óxido nítrico, a partir de arginina, é catalisada pela óxido nítrico sintase induzível (iNOS), sendo esta enzima expressa em monócitos, macrófagos, linfócitos T, neutrófilos, eosinófilos e células mesangiais do sistema imunológico humano. Níveis normais de NO também são necessários para vários outros mecanismos fisiológicos, incluindo as funções de sinalização, mas sua produção excessiva pode ter efeitos prejudiciais para as células. No metabolismo energético, os complexos efeitos do NO incluem a inibição da NADH-ubiquinona e da succinato-ubiquinona-oxi-redutase, na cadeia respiratória mitocondrial, e da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase, na glicólise (NIESS et al. 1999).

Uma ampla variedade de fatores, ativadores e inibidores, foram identificados como moduladores da expressão de iNOS, através dos quais, várias citocinas desempenham seu papel. A expressão de iNOS, in vitro, pode ser estimulada pela combinação de IFN- γ , TNF- α e IL- β . IL-8 e IL-6 têm um efeito mais inibitório, o qual pode ser entendido como um importante mecanismo de feedback na regulação da iNOS (NIESS et al. 1999).

A influência do exercício físico sobre a expressão de iNOS e produção de NO em células imunocompetentes ainda é pouco conhecida. Foi demonstrado que a corrida exaustiva em esteira em uma intensidade de 110% do limiar anaeróbio individual (IAT), em homens não-treinados, resultou em aumento na expressão de iNOS em neutrófilos e linfócitos, o qual persistiu por 48 h após o exercício. Uma expressão aumentada de iNOS também foi observada imediatamente após uma corrida de meia-maratona. Uma vez que o NO não foi determinado nesses estudos, não se sabe se a expressão aumentada de iNOS se traduz em um aumento relevante na geração de NO pelos leucócitos. Além disso, o exato mecanismo levando a um aumento na expressão de iNOS, em função do exercício, não está claro. Fatores que produzem uma liberação aumentada de citocinas, como IFN- γ , TNF- α ou IL-1 β , sob estresse físico, podem estar envolvidos na produção aumentada de NO (NIESS et al. 1999) e precisam, portanto, ser investigados.

Segundo VESELEY et al. (1998), no tecido muscular esquelético, a HO-1 parece ser induzida apenas por exercício ou estimulação elétrica in vivo. Estes autores, estudando os efeitos da hemina e do nitroprussiato de sódio em células da linhagem de mioblastos esqueléticos de rato L6G8, observaram um aumento tempo e dose-dependente na atividade de HO-1. O efeito do nitroprussiato de sódio, por sua vez, era reduzido pela co-incubação com hidróxi-cobalamina, sugerindo que o NO deve estar envolvido na ativação do gene que codifica para HO-1.

A adenosina e o NO, substâncias vasoativas candidatas para a regulação local do fluxo de sangue no músculo esquelético, aumentam nas células musculares e no fluido intersticial durante o exercício. Além disso, as enzimas responsáveis pela formação destas duas substâncias, AMP 5'-nucleotidase e a NOS, também estão ativas durante a contração muscular. Evidências in vivo, como in vitro, sugerem que o aumento na concentração intersticial de adenosina, induzido por contração, resulta da síntese extracelular mediada pela AMP 5'-nucleotidase extracelular ligada à membrana. Ainda não está claro se a indução da formação de óxido nítrico no músculo se origina da NOS endotelial, localizada no endotélio microvascular, ou da NOS neuronal (nNOS) das células nervosas e fibras musculares. Evidências funcionais do papel da adenosina no controle do fluxo sanguíneo muscular se apóiam em estudos utilizando agonistas e antagonistas do receptor de adenosina, adenosina deaminase ou inibidores da captação de adenosina. A maioria destes estudos foi realizada em animais de laboratório e, ainda que estes resultados mostrem alguma discrepância a maioria indica que a adenosina participa na regulação do fluxo sanguíneo muscular. Em humanos, ainda faltam evidências que confirmem este papel da adenosina. O papel do NO na regulação do músculo esquelético têm sido estudada com inibidores de NOS. Apesar do grande número de estudos nesta área, o papel do NO no aumento do fluxo de sangue muscular induzido por contração ainda é incerto. A maioria dos estudos, mas não todos, em humanos e animais mostraram que, embora o bloqueio da NOS reduza o fluxo muscular de sangue no repouso, e durante a recuperação do exercício, não há nenhum efeito deste bloqueio sobre o aumento da perfusão muscular durante o exercício. Ainda não existem evidências conclusivas sobre os mecanismos subjacentes ao aumento multifase do fluxo sanguíneo muscular durante o exercício, assim como sobre o papel e potência das diversas substâncias vasoativas (RADEGRAN & HELL, 2000).

O exercício também provoca estresse oxidativo através da geração aumentada de intermediários do tipo EROs e ERNs no músculo, assim como no sistema hematopoético. A elevação de temperatura induzida pelo exercício também deve provocar o estresse oxidativo, uma vez que SALO et al. (1991) observaram que, com o aumento da temperatura, as mitocôndrias musculares sofriam um progressivo desacoplamento com geração aumentada de ROI.

Um papel para os intermediários reativos do oxigênio, produzidos primariamente como consequência do elevado ritmo de respiração mitocondrial é postulado na fadiga muscular. Considerando a capacidade potencial dos intermediários reativos do oxigênio de danificarem as proteínas intracelulares durante séries consecutivas de contrações musculares, a capacidade de rotas antioxidantes pré-existentes pode ser complementada pela síntese de HSP. Aumentos no mRNA de HO-1, em particular, devem fazer parte de uma rota antioxidante induzível no músculo esquelético que é responsiva ao estresse metabólico associado com contrações musculares repetidas (FEHRENBACH & NIESS, 1999).

A ativação de neutrófilos descritas após exercício e um aumento dos produtos de peroxidação lipídica sugerem que o estresse oxidativo desempenhe um papel importante nas mudanças induzidas pelo exercício nas células hematopoéticas. Em particular, a proteína HO-1 antioxidante é induzida por hipóxia e estresse oxidativo. Uma rota redox-sensível faz a mediação de pelo menos parte da indução do gene de HO-1 por hipóxia em miócitos cardíacos. Foi observado que a indução de HO-1 em leucócitos após exercício de endurance extenuante de longa duração se correlaciona com a concentração plasmática aumentada de interleucina-8, um indicador da ocorrência de intermediários reativos de oxigênio in vivo. Estes resultados permitem considerar o estresse oxidativo como um estímulo potencial para a expressão de HSP associada ao exercício (FEHRENBACH & NIESS, 1999; FEHRENBACH et al., 2000).

Segundo SALO et al. (1991) a hipertermia do exercício provocaria o desacoplamento mitocondrial, elevando a concentração de ubisemiquinona e aumentando a concentração de superóxido (O_2^-). O ânion O_2^- e o subsequentemente formado H_2O_2 podem ser os responsáveis pela expressão aumentada de HSP70 e de outras HSP.

Interações entre o sistema imunológico e a musculatura esquelética podem desempenhar importante papel no estabelecimento da injúria e reparo muscular após o exercício. Evidências recentes sugerem a participação do **sistema complemento** nesse processo, e em particular na fase aguda da estimulação de células inflamatórias no pós-exercício (TIDBALL, 20002; COSTA ROSA, 2004). Aparentemente, após uma “sobrecarga” de exercício, ocorre a ativação de neutrófilos que migram para os sítios musculares lesionados com a finalidade de detectar lesões nas fibras musculares. Na seqüência, macrófagos invadem os sítios inflamatórios com a finalidade de remover os debris celulares. Entretanto, durante este último processo, os macrófagos lá recrutados são ativados e passam a produzir EROs e NO, o que tende a agravar o dano celular, dependendo da intensidade e duração do exercício imposto (TIDBALL, 2002). Foi observado também que a ativação de monócitos circulantes/macrófagos teciduais logo após o exercício envolve a indução da expressão do gene que codifica para a iNOS (LU et al., 1999). No entanto, o papel da produção de NO através das três isoformas conhecidas da NO sintase permanece incerto, particularmente no que diz respeito à possibilidade de que muito do NO produzido e medido (na forma de nitratos e nitritos) na circulação sanguínea após o exercício agudo poderia ser derivado das células endoteliais (KURU et al., 2002).

Considerando os resultados acima descritos, nosso grupo levantou a hipótese de que a ativação de monócitos circulantes logo após uma seção aguda de exercício em animais não-treinados pudesse ser induzida por alterações no estado redox dos vários tipos celulares envolvidos (monócitos, fibras musculares, células endoteliais). Particularmente, os dados acima sugerem que o estresse oxidativo gerado durante o exercício possa ser responsável pela ativação do NF- κ B e, conseqüentemente, pela expressão da iNOS (que é dependente deste fator nuclear) e outras proteínas relacionadas à resposta imunológica. Isso explicaria, ao menos em parte, a intensa leucocitose observada no pós-exercício. Em outras palavras, o exercício físico **moderado (atividade física moderada)**, mesmo que praticado esporadicamente, poderia levar a um processo de adaptação rápida de células imunológicas, como o macrófago, de forma a deixar “armada” a resposta imunológica, o que explicaria a melhor performance imunológica de indivíduos não-sedentários.

4. OBJETIVOS

Considerando-se que:

- a) a atividade física moderada mesmo que praticada de maneira aguda (em indivíduos não-treinados) exerce forte influência sobre o sistema imunológico;
- b) este efeito estimulatório pode estar relacionado ao estresse oxidativo gerado durante a atividade física;
- c) a funcionalidade de macrófagos pode ser influenciada pelo estresse oxidativo gerado durante a atividade física,

o objetivo central deste trabalho é estabelecer-se a relação entre a **atividade funcional de macrófagos** obtidos a partir de monócitos circulantes de ratos submetidos a sessão de natação de 1 hora (exercício agudo moderado) e o **estresse oxidativo** sistêmico produzido durante a atividade física.

Como metas a serem alcançadas, foram propostos estudos sobre a relação entre:

- a) o estresse oxidativo, avaliado pela produção malondialdeído,
- b) o balanço redox intracelular em eritrócitos (índice do estado redox sistêmico, já que os eritrócitos transitam por todos os territórios do organismo),
- c) a expressão de HSP70 (indicativo de estresse celular em monócitos/macrófagos) e
 - a) fagocitose de partículas de *Saccharomyces cerevisiae* modificadas (zimosan) por macrófagos obtidos a partir de monócitos circulantes destes animais,
 - b) produção de peróxido de hidrogênio por estes macrófagos,
 - c) expressão de NOS induzível (iNOS), endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS) nos macrófagos,
 - d) avaliação da produção de NO através da medida de nitratos e nitritos por macrófagos e sua influência nas concentrações plasmáticas desses ânions.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Animais

Em todos os experimentos foram usados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*, var. Albinus), adultos (3-4 meses), machos, provenientes do Biotério do ICBS da UFRGS. Os animais foram mantidos sob um ciclo claro/escuro 12/12 h e temperatura ambiente a 23°C, recebendo, *ad libitum*, dieta comercial-padrão para ratos de laboratório, contendo aproximadamente 52% de carboidratos, 21% de proteínas e 4% de lipídeos e tendo livre acesso a água. O bebedouro do animal continha água da torneira que era trocada com frequência para impedir o desenvolvimento de microorganismos e menores riscos de doença.

5.1.1 Eutanásia

O método utilizado foi a decapitação, por ser um método rápido e eficaz. Induz perda imediata do reflexo palpebral, além de produzir mudanças fisiológicas mínimas nos tecidos. Como havia a necessidade de se coletar o sangue periférico para análises celulares e bioquímicas, nenhum anestésico ou outra substância foi injetada nos animais, à exceção da heparina (veja adiante, por favor) utilizada como anti-coagulante no momento da coleta.

5.2. Protocolo de exercício

Com a finalidade de avaliarem-se as alterações agudas promovidas pelo exercício **moderado** sobre a funcionalidade de monócitos/macrófagos, foi utilizado o protocolo de natação por 1 hora em tanques aquecidos. Todos os animais foram, no momento dos experimentos, foram pesados e, aleatoriamente, separados, em dois grupos: EXERCÍCIO (animais sedentários, nunca treinados ou adaptados a qualquer forma de exercício, foram postos a nadar por 1 hora) e CONTROLE (os animais, também sedentários, permaneceram em caixas plásticas idênticas contendo água aquecida porém em quantidade mínima – cerca de 5 cm acima do fundo do recipiente – a fim de permitir que o animal não precisasse nadar mas não se afogasse; ou seja, neste grupo, os animais não tiveram a necessidade de realizar exercício físico e permaneceram em repouso). A escolha deste exercício foi devida ao fato de a natação ser uma habilidade natural do rato e não haver custos excessivos para realização

desta atividade, além do que é possível, controlando-se a carga de exercício com sobrepeso na cauda, impor-se uma atividade física **moderada**.

O protocolo de exercício compreendeu uma hora de natação em caixas plásticas (400 mm de altura, 362 mm de comprimento e 270 mm de largura) com capacidade para 20 litros, contendo água a uma temperatura entre 31 ± 1 °C . Esta temperatura foi escolhida por ser considerada neutra para o animal (KUUSELA & HARRI, 1986) evitando, assim, que a imersão em água fria amenizasse a elevação da temperatura que acompanha o exercício ou que o estresse térmico pudesse interferir nos resultados, caso a temperatura da água fosse elevada acima do valor escolhido, conforme já verificado em outros estudos (FEHRENBACH E NIESS, 1999). Para impedir que os animais flutuassem, foi fixado, à cauda, um peso correspondente a 5% do peso corporal deste (GOBATTO et al., 2001). Os animais foram considerados fatigados quando não conseguiam acompanhar as bolhas de ar que liberavam, quando submersos, até a superfície ou quando se apresentavam desorientados. Quando a fadiga sobreveio antes que fossem completados, pelo menos, 55 minutos de natação, o animal não foi utilizado no estudo. No entanto, a maioria dos animais não chegou à condição de exaustão.

Estudos prévios de nosso laboratório (OLIVEIRA JUNIOR, 2005) mostraram que, sob as condições experimentais aqui descritas, a “carga de exercício” imposta aos animais pode ser considerada como **moderada**, tanto em termos de intensidade quanto de duração: as concentrações plasmáticas de lactato elevam-se para valores 3,5 vezes os basais, enquanto que a quantidade de glicogênio no músculo gastrocnêmio vermelho caiu cerca de 50%.

Após a sessão de exercício, os animais foram retirados da água e sendo-lhes administrados (i.p.) 100 µL de solução heparina sódica (ROCHE, 500 UI/mL em PBS pH 7,4) como anti-coagulante. Cinco minutos depois, os animais foram eutanasiados e o sangue coletado para as análises.

5.3. Sangue: coleta e preparo

Conforme descrito acima, utilizou-se heparina como anti-coagulante. A heparina é um mucopolissacarídeo natural de alto peso molecular existente nos mastócitos. É

quantificada em unidades Internacionais (UI) com base na atividade exercida em ensaios biológicos. Constitui uma droga de eleição para anti-coagulação aguda. Não tendo absorção oral, é administrada por vias parenterais. A depuração da heparina é feita por biotransformação hepática em quantidade proporcional à dose, sendo os produtos de degradação eliminados na urina. O efeito adverso mais comum é o sangramento, motivo pelo qual a droga foi administrada imediatamente antes da morte dos animais. A heparina combina-se com proteínas da coagulação e é o cofator de antitrombina III. Forma complexos inativos com a última e com os fatores de coagulação XIII, XII, X e II. Modifica a velocidade e não a intensidade de atuação de antitrombina III. Em condições plasmáticas reduzidas, obtidas com esquemas de baixas doses, a heparina antagoniza parcialmente a atividade dos fatores X e II, em algumas situações, como a estase venosa.

A administração prévia de heparina a ratos em experimentos onde se pretende coletar todo o sangue circulante deve-se ao fato de que a capacidade de coagulação do sangue destes animais é muito maior que a de humanos. Por isso, a simples heparinização dos tubos e funis de coleta não é suficiente para evitar a perda de material por coagulação. Assim, além de o sangue ter sido obtido de animais heparinizados, foram adicionados, aos tubos de coleta (Falcon, 50 mL), 25 UI de heparina contida em 50 μ L de solução a 500 UI/mL em PBS.

Uma vez que o objetivo do presente trabalho foi a avaliação da performance de monócitos/macrófagos provenientes dos animais exercitados, quantidades apreciáveis de células foram necessárias para avaliações bioquímicas, funcionais e de expressão de proteínas. Entretanto, a quantidade de monócitos circulantes em ratos é de cerca de $5,0 \times 10^5$ células/mL de sangue. Por esta razão, em todos os experimentos, os animais foram completamente exsanguinados, o que forneceu cerca de $5,0 \times 10^6$ monócitos/rato.

Após a coleta, o sangue foi imediatamente processado para a separação do plasma (para análises bioquímicas) e para a obtenção de monócitos circulantes pela técnica do Percoll/Ficoll-Hipaque descrita abaixo.

Para separação do sangue, foi inicialmente utilizada a técnica para separação dos monócitos que se baseia em duas etapas: a primeira onde ocorre a separação dos mononucleares pela técnica do Histopaque e a segunda onde se separa os monócitos pela técnica do Percoll.

Inicialmente foi adicionado o Histopaque (Sigma, densidade 1,077 g/mL) em tubos Falcon de 15 mL a 1:2. Após o sangue ter sido retirado coletado e as amostras colocadas em tubos de 50 ml previamente heparinizados, é passado para um tubo contendo histopaque despejando a um ângulo de 45°, sem misturar, com auxílio de um pipetador automático motorizado.

Depois de realizado este procedimento, o sangue foi centrifugado a 400 x g por 35 minutos à temperatura ambiente. Depois, foi coletada a camada opaca que contém os monucleares (essencialmente linfócitos e monócitos), que se localiza entre a camada de plasma (superior) e a de histopaque (média), com o auxílio de uma pipeta Pasteur de plástico (para evitar adesão dos monócitos). Os mononucleares foram, então, transferidos para um tubo Falcon de 15 ml e a suspensão diluída com PBS citratado (ver anexos) para um volume de 10 vezes o volume de mononucleares. Foi realizada a centrifugação a 250 x g por 10 minutos à temperatura ambiente para precipitar as células. A centrifugação à baixa rotação favorece a exclusão de plaquetas que tendem a ficar no sobrenadante. Os mononucleares foram ressuspensos em cerca de 3 mL de PBS citratado e decantados sobre um gradiente de Percoll em novos tubos Falcon, como no procedimento com Histopaque. Foi realizada centrifugação por 400 x g por 35 minutos à temperatura ambiente e coletados os monócitos, que se localizam entre o gradiente de Percoll (camada inferior) e o PBS citratado (camada superior). Os monócitos foram, então, lavados uma vez com PBS citratado a 1000 x g por 10 minutos e utilizados nos experimentos.

Em todos os ensaios descritos neste trabalho, os monócitos foram preparados como aqui descrito e semeados em microplacas de poliestireno (Corning) com 96, 24 6 ou 4 micropoços (*wells*) conforme a demanda. Todos os experimentos foram realizados após, no mínimo, 15 minutos de incubação das células nestas microplacas em seus respectivos meios, conforme o caso. Este tempo, que em alguns experimentos específicos foi de até 1 hora, é o suficiente para que as células adiram à superfície das placas. No entanto, a exemplo do que acontece *in vivo*, a adesão celular é mediada por receptores de superfície dos monócitos e o processo adesivo leva a profundas alterações nas características dos monócitos, o que rapidamente diferencia-os em células mais ativadas, semelhantes aos macrófagos teciduais encontrados *in vivo* (HOMEM DE BITTENCOURT et al., 1993; 1994). Por essas razões, neste texto, o termo **monócito/macrófago** será utilizado todas as vezes que se fizer referências

aos monócitos circulantes obtidos pelas técnicas acima descritas e incubados até que se comportassem como macrófagos (aderidos, com incremento na produção de EROs, com alta atividade fagocitária).

5.4. Avaliação funcional de monócitos/macrófagos: fagocitose de zimosan

Uma importante ferramenta de avaliação da capacidade imunológica de macrófagos é a medida da fagocitose de zimosan. Trata-se da contagem visual do número de partículas de *Saccharomyces cerevisiae* modificadas (zimosan) ao microscópio óptico. Para tanto os *S. cerevisiae* são preparados de maneira que seus conteúdos intracelulares são hidrolisados e retirados quimicamente, de sorte que as partículas de zimosan são fagocitadas como “fantasmas” contendo apenas as membranas plasmáticas. Entretanto, a fagocitose destas partículas, tal como aconteceria numa resposta imunológica, depende de que as mesmas estejam opsonizadas com as proteínas do sistema complemento, motivo pelo qual, o primeiro passo nesse experimento é a preparação e opsonização dos *S. cerevisiae* com soro do próprio rato cujos monócitos/macrófagos serão estudados.

Antes de se realizar o experimento, o zimosan foi preparado, diluindo-se, em 100 mL de PBS, 50 mg de zimosan (Sigma). Após, foi fervido por 30 minutos, agitando de vez em quando, e lavado por 3 vezes, por 15 minutos cada 1000 x g à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado reservado e ressuspensão com PBS numa concentração de 40 vezes a concentração inicial .

Para opsonização com o complemento (presente no soro do próprio rato de onde se obtiveram as células), 0,5 mL de suspensão de partículas de zimosan (a 20 mg/mL) foi misturado em partes iguais com soro o homólogo e incubado por 30 minutos a 37°C em banho-maria com agitação; foi realizada centrifugação por 10 segundos a 15.000x g. O precipitado foi lavado por 3 vezes com PBS e ressuspensão em meio de HBSS contendo BSA deslipídado a 2% m/v (20 mg/mL finais em termos de BSA).

Para o ensaio de fagocitose, as células (5×10^5 monócitos/macrófagos em 2 mL de suspensão fresca) foram plaqueados sobre lamínulas de vidro para microscópio (20 x 20 mm) e deixadas por 30 min em estufa incubadora a 37 °C em meio RPMI1640 contendo SFB a 10%

(v/v) para aderirem ao vidro. Após a adesão dos monócitos/macrófagos, o meio foi aspirado e substituído por 1 mL de HBSS pré-aquecido contendo BSA deslipídada a 2% (m/v) para iniciar o ensaio da fagocitose. Foi adicionada, então a preparação de zimosan opsonizado (pré-aquecido por 10 min a 37°C) num volume equivalente a 10% do volume de meio presente nas placas (no caso, 200 µL para 2 mL de meio contendo BSA deslipídado) que foi misturada com o meio contendo as células (pré-aquecidas por 10 min a 37°C). O conjunto foi incubado por 30 min a 37 °C sob agitação. A fagocitose foi interrompida colocando-se as placas de cultura (contendo as células) em gelo por 10 min e, depois, contando-se as partículas fagocitadas. A visualização das partículas fagocitadas foi realizada diretamente nas placas em microscópio óptico com aumento de 400 X sem nenhum corante, embora a visualização possa também ser realizada com o auxílio de solução de violeta cristal a 2% seguida de observação das lamínulas com objetiva de imersão (1000 X). Foram realizadas contagens do número total de células que fagocitaram alguma partícula de zimosam sobre um total de 50 células observadas aleatoriamente por campo e contagens para estabelecimento do porcentual de células que fagocitaram 2 ou mais partículas (células extremamente ativadas) num total de 50 observadas em cada campo.

5.5. Avaliações Bioquímicas

5.5.1 Produção de peróxido de hidrogênio por monócitos/macrófagos incubados

Trata-se do clássico método de PICK & MIZEL (1981) para determinação da **produção** de peróxido de hidrogênio pela oxidação do vermelho de fenol na presença de peroxidase de rabanete (HRP, Sigma) por monócitos/macrófagos cultivados/incubados *in situ* (sem a retirada de células ou dos sobrenadantes). Como o H₂O₂ vai reagindo com o corante à medida em que as moléculas vão sendo produzidas, a presença técnica, apesar de perder em sensibilidade para alguns outros métodos (fluorescentes por exemplo), tem a compensação de medir o acúmulo dos produtos investigados *on line*, além de ganhar em facilidade de execução.

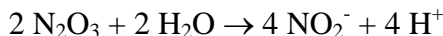
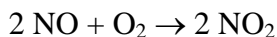
Conforme mostrado na seção de Introdução, monócitos circulantes respondem a estímulos de membrana (particularmente os ativadores da proteína quinase C, PKC)

produzindo um “*burst*” oxidativo, especialmente via NADPH oxidase, que reduz o oxigênio molecular a superóxido. Este, por sua vez, na presença da catalase intracelular, é convertido a H_2O_2 que pode ser medido.

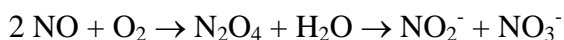
Para esta determinação, as células ($2-5 \times 10^5$ células/poço) foram plaqueadas em meio de cultura (RPMI 1640, Gibco, BRL) contendo 10% de SFB (v/v) e pré-incubadas a $37^\circ C$ em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 em placas de 96 wells. Para que ocorresse a adesão, as células foram deixadas por 60 minutos sob estas condições e, depois, lavadas com 3 volumes de EBSS (veja nos Anexos). Em seguida, as células foram tratadas com EBSS na presença ou ausência do ativador da PKC forbol-miristato-acetato (PMA 200 nM final) para que se iniciasse o processo de ativação do “*burst oxidativo*” com produção de H_2O_2 a ser medido. Todos os poços foram tratados com solução de fenol vermelho (fenolsulftaleína, a 200 $\mu g/mL$ finais) e peroxidase de rabanete (HRP, Sigma, a 1,9 U/mL finais no poço). No tempo zero, os poços destinados a servir de controle interno negativo do experimento foram tratados com solução de NaOH 1 N, o que mata as células e muda a cor do corante para um roxo forte. Em paralelo à produção de peróxido pelas células a serem incubadas, foram pipetadas curvas de concentrações conhecidas de H_2O_2 para calibração do experimento. O desenho experimental para a medida de peróxidos produzidos pode ser encontrado na seção de Anexos. As placas contendo as células e as curvas de calibração foram, então, incubadas a $37^\circ C$ em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 por 1 h para permitir a produção de H_2O_2 estimulada pelo PMA. Ao final deste período, todos os poços (exceto os controles de tempo zero e os *blanks* espectrofotométricos das placas, onde pipetou-se apenas EBSS) foram tratados com NaOH e a absorbância a 600 nm registrada em leitora de microplacas (BioRad) no início e então é feita a leitura a 600 nm.

5.5.2 Estimativa da capacidade produção de NO por monócitos/macrófagos incubados: determinação de nitratos e nitritos nos meios de incubação e no plasma

Óxido nítrico (NO) é produzido em pequenas quantidades por vários tipos celulares gerando nitratos e nitritos através das seguintes reações:



Outras reações envolvem:



O NO, além de se autooxidar, gerando nitritos (NO_2^-), reage prontamente, na circulação, com oxi-hemeproteínas, gerando nitratos (NO_3^-). Também, os NO_2^- reagem estequiometricamente com a oxi-hemoglobina formando NO_3^- . Quantidades significativas de NO_2^- acumulam em fluidos biológicos, como fluido cerebrospinal, fluidos sinoviais, exudatos pleurais, pericárdicos e peritoneais, além de serem produzidos em altas quantidades por células imunológicas ativadas, como macrófagos e neutrófilos. Já na circulação, praticamente todo o NO_2^- gerado a partir do NO é convertido em NO_3^- . Desta forma, as avaliações da produção de NO in vivo podem ser estimadas pela medida de NO_3^- e NO_2^- . Assim, espera-se sempre um acúmulo maior de NO_2^- em tecidos livres de heme-proteínas e meios de incubação e cultivo celulares, e acúmulo de NO_3^- em plasma e tecidos que apresentem fontes de heme-proteínas. No presente trabalho, foram determinadas as concentrações de NO_3^- , NO_2^- e a soma dos dois, convencionalmente chamada de NO_x^- total, no plasma do animais exercitados (e seus controles) bem como nos meios de incubação de monócitos/macrófagos obtidos dos mesmos animais. Neste caso, o que foi medido foi a taxa de produção através da determinação do acúmulo destas espécies a partir dos sobrenadantes de células incubadas por 1 hora.

A presente técnica de determinação de nitratos e nitritos baseia-se na redução enzimática de **nitratos** a **nitritos** na presença de nitrato redutase (EC 1.6.6.2) de *Aspergillus*, NADPH e FAD, e posterior reação dos nitritos formados (ou presentes inicialmente nas amostras) com o reagente de Griess (mistura de sulfanilamida e naftiletilenodiamina, específico para NO_2^-). Entretanto, como o excesso de NADPH utilizado inibe a reação de Griess, é necessário oxidar-se todo o NADPH não utilizado na redução dos nitratos. Isto pode ser obtido pela adição de piruvato e LDH (que fornece lactato que é estável às expensas de

NADPH) ou pela adição de ferricianeto de potássio ($K_3[Fe(CN)_6]$) que oxida o NADPH a $25^\circ C$ na presença da própria redutase (KAY & BARBER, 1986; GRISHAM et al., 1996). Em nosso laboratório, a incubação das amostras por 45 min com a nitrato redutase pura elimina todo o excesso de NADPH presente (o que pode ser monitorado a 340 nm). A adição de ferricianeto, mesmo diluído 1:10, interfere nos resultados.

Para a determinação no plasma, amostras de plasma obtidas a partir do sangue periférico dos animais pós-sessão de exercício e seus controles foram ultrafiltradas em filtros de corte (cut-off) de 10 kDa (Millipore, PTGC polysulfone membrane – low-protein binding adsorption for serum and plasma – ultrafree MC filter unit – 400 μL – máx. 5.000 x g) conforme descrito em GILLIAM et al. (1993).

Sobrenadantes de meios de incubação de monócitos/macrófagos (incubação direta) foram processados diretamente nas placas de incubação (de 96 micropoços), após o período de pré-incubação para adesão das células de 30 min. Para tanto, as preparações de monócitos foram ressuspensas em meio de cultura RPMI1640 contendo 10% de SFB em volume, que contém todos os fatores necessários para que as células possam estar vivas e produzindo NO. As células foram contadas e plaqueadas ($2-5 \times 10^5$ células por poço num volume de 100 μL) para depois serem incubar a $37^\circ C$ em estufa incubadora de CO_2 por 30 min para a adesão das células ao fundo das placas de ELISA. Em seguida, as células foram lavadas com tampão HBSS contendo glicose e tampão HEPES pois as concentrações de fosfato (inibidor da nitrato redutase quando acima de 50 mM) giram em torno de 0,8 mM em muitos meios de cultura. Depois do preparo, o meio HBSS foi mantido a $37^\circ C$ e, após a incubação inicial das células nas placas, os meios foram aspirados cuidadosamente e as células (já aderidas) lavadas 3 vezes com volumes de 200 μL cada de PBS para a retirada de qualquer traço de meio de cultura (que contém nitratos/nitritos e interferem nas análises).

Foram adicionados 80 μL de meio HBSS pré-aquecido para incubar as células por 1 hora (esta incubação tem o objetivo de permitir que as células produzam NO, espontaneamente, que será convertido a nitratos e nitritos na ausência de qualquer estimulante celulare, como PMA). Após a incubação, a produção de nitratos e/ou nitritos foi estimada diretamente como num ensaio normal, à exceção de que não foi necessário pipetar nenhuma amostra, pois os meios de incubação já eram as amostras. A exemplo do que se fez no caso da

produção de peróxidos, foram pipetadas nas placas as curvas de nitratos e nitritos, bem como adicionados os blanks das placas, como de costume.

Dos ultrafiltrados das amostras de plasma ou nos micropoços contendo as células após as incubações de 1 h, foram acrescentados, na ordem, 10 μL da mistura de cofatores¹ e 10 μL de nitrato redutase 1 U/ml. Procedeu-se, então, a incubação das amostras à temperatura de 37 °C por 3 h. A sensibilidade deste método para nitratos, utilizando-se um máximo de 80 μL , foi de cerca de 2,5 μM . Para ensaio de nitritos, o limite de detecção foi de aproximadamente 2,0 μM . Ao final do período de incubação, acrescentaram-se 50 μL de reagente de Griess I (SULFA), seguido de mais 50 μL de reagente de Griess II (NEDD). Agitou-se e incubou-se na própria leitora à temperatura ambiente (25 °C) por 10 min, fazendo-se, em seguida, a leitura a 540 nm. A concentração de nitratos e nitritos foi determinada com base nas curvas-padrão previamente pipetadas nas placas, conforme descrito em GRANGER et al. (1995).

A quantidade de NO_x^- nas amostras, após a dosagem, foi calculada em termos de nmols de cada espécie por mL de plasma ou com base na quantidade de células que deram origem aos valores de NO_x^- acumulado, em $\text{nmol}/10^5$ células.

5.5.3 Determinação do Conteúdo Intracelular de GSH e GSSG

As quantidades de GSH e GSSG intracelulares, bem como a relação entre as concentrações desses dois metabólitos fornecem o índice do estado redox intracelular (AKERBOOM & SIES, 1981). Sendo os eritrócitos células que circulam por todos os territórios teciduais, o perfil do metabolismo da glutatona nestas células fornece boas evidências a respeito do estado redox tecidual geral do organismo. Por esta razão, além de outras medidas bioquímicas acerca do perfil de estresse oxidativo em vários territórios, foram realizadas medidas de GSH e GSSG nos eritrócitos obtidos do sangue periférico dos animais exercitados e seus controles logo após as sessões de exercício. Para estas determinações, foi

¹ A mistura de cofatores foi preparada no momento do ensaio pela adição de 10 μl de NADPH 24,15 mM, 10 μl de FAD 1,206 mM e 95 μl de tampão fosfato. As concentrações dos cofatores na mistura são: 0,105 mM de FAD e 2,100 mM de NADPH.

utilizada uma técnica adaptada daquela descrita em KOLBERG et al. (2006) para determinação em leitora de microplacas a 415 nm. Eritrócitos coletados de amostras de sangue periférico foram lavados duas vezes em PBS (4°C) e imediatamente rompidos em 200 µL de ácido metafosfórico 5% (m/v) com homogeneização por micropipeta para análise cinético-espectrofotométrica pelo método de reciclagem com o ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] (=DTNB) e GSSG redutase (GSRd) de ANDERSON (1985). A rápida homogeneização das células em meio ácido é um passo de extrema importância para a inativação das tiol-transferases e γ -glutamiltanspeptidases responsáveis pela transformação da GSH em outros derivados peptídicos, levando a subestimativas das concentrações reais do tripeptídeo. Além disso, a acidificação previne a auto-oxidação da GSH que ocorre rapidamente em pH superior a 7,0 (ANDERSON, 1985; AKERBOOM & SIES, 1981). Por outro lado, apesar de a auto-oxidação da GSH em GSSG em meio ácido ocorrer numa taxa mínima (0,1 a 0,2% por hora), pelo fato de as concentrações intracelulares de GSSG serem naturalmente muito baixas (menos de 1% da concentração de GSH), o processamento das amostras para dosagem de GSSG deve ser efetuado o mais rapidamente possível, a fim de evitar-se resultados falsamente superiores aos valores reais (AKERBOOM & SIES, 1981). A primeira parte do ensaio consistiu na determinação do conteúdo de glutatona "total" (GSH+ GSSG) medido em equivalentes de GSH pelo método da reciclagem com DTNB que leva à oxidação estequiométrica da GSH em GSSG com formação do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) e posterior restituição da GSH pela redução altamente específica com GSSG redutase (GSRd, EC 1.6.4.2) na presença de NADPH. A taxa de formação de TNB, proporcional à soma inicial de GSH e GSSG, foi, então, monitorada a 412 nm ($\epsilon_{\text{TNB}} = 13,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Alternativamente, poderia ter sido monitorada a taxa de consumo de NADPH a 340 nm ($\epsilon_{\text{NADPH}} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) ou fluorimetricamente (excitação a 366 nm/emissão de 400-3000 nm). O método empregado é bastante sensível, específico e reprodutível. Contudo, como a velocidade da reação depende não somente da concentração inicial de GSH+GSSG, mas, também, da atividade da GSRd, fatores que interfiram na atividade enzimática, podem levar, invariavelmente a falsos resultados. Por isso, além de ter sido utilizada sempre uma curva de calibração (0,5; 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0 nmol) com padrão de GSH precisamente preparado a cada ensaio, foram efetuadas leituras de amostras com adição de padrão, sendo os resultados obtidos idênticos aos observados para as amostras separadamente. O ensaio foi iniciado pela

adição de 10 μL de amostra (em MPA 5%), 75 μL de DTNB 14,1 mM (concentração final no ensaio 9,87 mM) em tampão fosfato de sódio 143 mM (pH 7,5) e 10 μL de NADPH 1,7 mM em NaHCO_3 0,5% (concentração final 0,17mM). A reação teve início com a adição de 10 μL de GSRd (atividade final na cubeta de 0,5 U/mL) sob agitação e as amostras foram analisadas espectrofotometricamente a 415 nm por cerca de 3 min num volume final 105 μL em microplacas de 96 wells (0,232 cm de caminho óptico) a 37°C, em leitora termostatzada (Biorad mod. Benchmark, USA) com aquisição direta e processamento cinético automático.

Antes da determinação do conteúdo de GSSG, alíquotas de 100 μL das mesmas amostras ensaiadas para GSH "total" foram retiradas para conjugação da GSH presente com N-etilmaleimida (NEM, Fluka) segundo metodologia descrita em Akerboom & Sies (1981). Foram adicionados, então, 35 μL de NEM 200 mM (concentração final 50 mM) diretamente às amostras dissolvidas em MPA 5%. Depois, a mistura foi neutralizada, cuidadosamente sob agitação, até pH 5,5 pela adição de 20 μL de KOH 2M em tampão de ácido piperazina-N,N'-bis-(etanossulfônico) (=PIPES, Boehringer, pKa= 6,8 a 25°C, faixa de trabalho de 6,1 a 7,5) 0,3 M. A inclusão de PIPES, ou outros agentes tamponantes como MOPS (ácido morfolinopropanossulfônico), previne alcalinização local, durante a neutralização, o que levaria a auto-oxidação da GSH, favorecida em pHs maiores que 7,0. O excesso de NEM, que, em concentrações tão baixas quanto 10 μM inibe o processo de dosagem da GSSG por reciclagem em até 30% foi efetuado por extração com 500 μL de acetato de etila 3 vezes, tendo o excesso de solvente sido evaporado em concentrador SpeedVac e por passagem em corrente de nitrogênio. Posteriormente, cerca de 25 μL de amostra foram ensaiados pelo método da reciclagem, como descrito para a GSH, exceto que as amostras foram inicialmente incubadas com a GSRd por 5 min a 37°C, tendo sido monitorada a absorbância a 340 nm (consumo de NADPH) até a estabilização. Depois, foi adicionado o DTNB, e as leituras, a 415 nm (produção de TNB) foram acompanhadas espectrofotometricamente conforme descrito acima. A diferença entre os valores obtidos para glutatona "total" e GSSG forneceu os valores dos conteúdos de GSH procurados:

$$[\text{GSH}] = \text{GSH total} - 2[\text{GSSG}]$$

5.5.4. Estimativa da lipoperoxidação plasmática – Método das TBARS

A peroxidação de lipídes (lipoperoxidação) é considerada um índice de estresse oxidativo em vários territórios (LLESUY, 2002). Vez que essas substâncias podem ser produzidas em vários tipos teciduais vindo a ganhar a circulação sanguínea, a determinação de lipoperoxídidos é muito útil para que se estabeleça o nível de estresse oxidativo. Entretanto, a medida destas substâncias depende muitas vezes de um preparo minucioso e caro de amostras para serem dosadas em HPLC ou através de GC/MS. Este problema pode ser contornado, mesmo que de maneira aproximada pela medida indireta de malondialdeído (MDA), uma espécie química gerada sempre que ocorre lipoperoxidação. Para tanto, recorreu-se à determinação das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), imediatamente após as sessões de exercício. Embora o próprio MDA pudesse ser determinado por HPLC, a medida de TBARS é considerada um bom índice para a lipoperoxidação (BELLÓ-KLEIN, 2002). Para tanto, amostras de plasma foram obtidas e processadas para TBARS conforme metodologia adaptada de BUEGE & AUST (1978) e DRAPER et al. (1993). O procedimento completo consistiu em alíquotar-se 250 µL de plasma em tubo Eppendorf® de 1,5 mL, misturando-se com 200 µL de TCA 30% e 200 µL de Tris-HCl (10 mM pH 7,4) que foram centrifugados a 2500 x g por 10 minutos a 4°C, sendo posteriormente coletados 440 µL do sobrenadante, aos quais foram adicionados 200 µL de TBA (0,73% m/v), 10 µL de BHT. Este material foi fervido a 100°C por 15 min e lido espectrofotometricamente a 535 nm, diretamente contra mistura contendo 50 µL de água, 200 µL de TCA, 200 µL de Tris-HCl, 10 µL de BHT e 200 µL de TBA fervido paralelamente. Para os cálculos, considerou-se a seguinte equação:

$$A_{535} \text{ nm}/0,156 = \text{nmol de equivalentes de MDA/mL/cm}$$

5.5.5. Expressão de HSP70, NOS-1, NOS-2 e NOS-3 por “Western blotting”

Para análise da expressão de HSP 70 e das NOS, os monócitos foram coletados pela técnica de Percoll citada anteriormente, após **6 horas** do término do exercício físico (período necessário para indução da expressão gênica máxima da HSP70). Para cada amostra preparada, quantidades iguais de proteínas (cerca de 30µg, determinada pelo método de Bradford,) serão separadas durante 4 horas e 30 minutos (a 30 mA/ gel) à temperatura

ambiente (25°C) por eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Será utilizado sistema vertical Slab Gel BIO-RAD Mini-Protean II (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA, USA) e tampão de corrida constituído de Tris a 25 mM, glicina a 192 mM e SDS a 1% (m/v), pH 8,3 usando-se 1cm de gel de empilhamento (entrada) a 4% (m/v) e gel de separação a 10% (m/v) em termos de monômero de acrilamida, para corridas em géis de 10 cm em tampão de amostra redutor constituído de Tris-HCL 62,5 mM pH 6,8, glicerol a 10% (v/v), SDS a 2% (v/v) e β -mercaptoetanol a 5%, conforme descrito em Santoro et al (1989). Como marcador de peso molecular será utilizado a mistura de padrões de pesos moleculares previamente coloridos (Amersham ou Invitrogen) com as seguintes proteínas: miosina (200 kDa), fosforilase b (92,5 kDa), BSA (69kDa), ovalbumina(46kDa), anidrase carbônica (30kDa) e lisozima (14kDa). Depois das corridas os géis serão destacados das placas de suporte, tendo os géis de separação sido removidos.

Após as corridas, o gel foi corado e fixado sob agitação contínua com solução de Azul Comassie Brilhante 0,1% (m/v), metanol 40% (v/v), ácido acético 10% (v/v) durante 20 min e submetidos à descoloração com agitação por cerca de 2 horas em solução de ácido acético glacial a 5% (v/v) até que fossem evidenciados os padrões de peso molecular (ainda fortemente corados contra o fundo parcialmente descorado do gel). Depois de secos, o gel corado foi submetido à densitometria no equipamento (Amersham Pharmacia Biotec) Vídeo Documentation System de aquisição digital e processamento de imagens.

As amostras contidas no gel foram destinadas ao processamento por Western blotting, como descrito em ELIA & SANTORO (1994) serão transferidos diretamente para membrana de nitrocelulose (Millipore) em sistema refrigerado BIO-RAD Blot Cell a 100 V por 90 minutos. Após a transferência, as bandas, contendo proteínas serão evidenciadas pela coloração com vermelho Ponceau, sal de sódio (Sigma) a 0,3% (m/v) em solução TCA a 3%. Após a verificação, as membranas serão descoradas em tampão TEN (Tris 50 mM pH 7,4 EDTA 5 mM, NaCl 150 mM) Antes do “immunoblotting”, os filtros de nitrocelulose foram imersos em tampão de bloqueio (Anexos) a fim de recobrirem-se as porções da membrana onde não houve transferência de proteínas, promovendo-se então bloqueio de ligação inespecífica de anticorpos ao filtro. Para o Western blotting das HSP70, as membranas foram incubadas à temperatura ambiente durante 2 h sob agitação enérgica em tampão de bloqueio – bloto (leite em pó a 5%) (Kolberg et al,2005), após este procedimento a membrana foi lavada

por 3 vezes com 10 ml de TEN-Tween 20 sob agitação (veja nos Anexos os detalhes, por favor).

Foi adicionado o primeiro anticorpo, monoclonal BRM-22 de ascite de camundongo (hibridoma BRM-22) contra HSP70 humana (Amersham), que reage especificamente com o polipeptídeo de 72 kDa (HSP70, ou HSP induzível) e com o de 73 kDa (HSP73, também chamado de HSC70 ou HSP70 constitutiva), diluído a 1:1000 em solução de bloqueio. Depois disso, os filtros foram lavados 3 vezes sob agitação por 10 min com 10 ml de TEN-Tween20 e incubados por 2 h com 5 mL de solução contendo o segundo anticorpo, IgG (molécula inteira contra imunoglobulinas de camundongo, Sigma) em tampão de bloqueio sob agitação.

A revelação foi feita pela adição dos substratos da peroxidase (3,3'-diaminobenzidina, DAB), e peróxido de hidrogênio, H₂O₂. A reação gera um precipitado marrom nas regiões da membrana que possui o anticorpo. Imediatamente após o aparecimento das manchas de interesse com boa resolução, os filtros foram retirados do revelador, lavados com água a fim de evitar-se superexposição e submetidos à secagem em estufa por 30 min a 37°C. Em experimentos cuja expressão de HSP70 ficou aquém do limite de detecção pela técnica de revelação direta com DAB, foi utilizada a técnica do ECL (Amersham) conforme descrito abaixo para as NOS. Conforme a necessidade em cada caso, as manchas foram registradas digitalmente (VDS, Amersham Pharmacia Biotech) e as imagens analisadas para os cálculos posteriores.

Para verificar a expressão das NO sintases (EC 1.14.13.39) induzível (iNOS, ou NOS-2), endotelial (eNOS ou NOS-3) e neuronal (nNOS ou NOS-1) foi utilizado a mesma técnica acima, porém foram adicionados anticorpos (Sigma) específicos para essas três proteínas em diferentes experimentos e a revelação foi realizada pela técnica de ECL (Enhanced Chemiluminescence)

A técnica realizada para fazer a revelação por ECL foi feita na câmara escura, pois o cassete de exposição e o filme de raios X (Hyperfilm, Amersham) são fotossensíveis. Foram utilizados Luminol (3-aminophthalhydrazide = 3-aminoftalidrazida) grau QL (Fluka, cód. 09153) e ácido p-coumárico (Fluka, cód 28200) que foram misturados em 5 mL de tampão Tris HCl 1,5 M pH 8,8. Esta mistura reage com peróxido de hidrogênio 30% (Fluka) também diluído em Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 que marcaram as bandas das amostras.

A membrana foi mergulhada nas soluções citadas acima, sob agitação por 3 minutos, a fim de visualizar o aparecimento das bandas, em seguida retirada das soluções e envolvida por um papel filme de PVC. A membrana foi colocada sobre o cassete de exposição juntamente com o filme de RX. Após a exposição e revelação (conforme instruções do fabricante, Amersham), os filmes foram quantificados em VDS, como procedido para HSP70.

5.5.6 Cálculo das concentrações de proteínas nas amostras analisadas

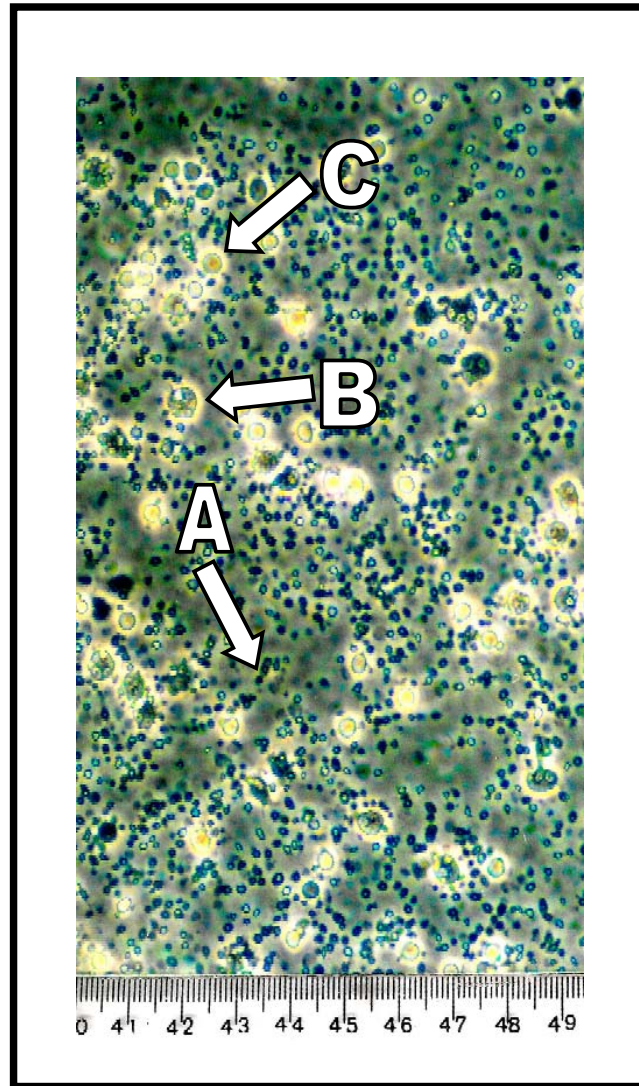
Na determinação de proteínas nas amostras, foi utilizado o método de BRADFORD (1976). Foram utilizadas como padrão de referência, soluções de albumina sérica bovina (BSA) fração V (Sigma). O método de Bradford é baseado na ligação do Azul Comassie Brilhante G-250 0,01% (m/v) em meio de ácido fosfórico 8,5 % (m/v)-etanol 4,7% (m/v) a proteínas das amostras, com formação de complexo que absorve intensamente a 595 nm. Amostras de plasma, foram diluídas 1:10 enquanto que as preparações celulares foram rompidas em solução de SDS a 0,1% contendo PMSF e leupeptina como inibidores de protease, conforme descrito em ELIA & SANTORO, 1994.

5.5.7 Análises estatísticas

Os dados foram analisados através de procedimentos estatísticos descritivo e inferencial. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média sendo que o número de observações está mostrado nas legendas das figuras. As comparações entre os vários parâmetros entre os grupos controle e exercício foram realizadas pelo teste *t* de Student bicaudado para dados não-pareados. Quando necessário, foi utilizada avaliação por Análise de Variância de uma via e, sendo os valores de F significativos, procedeu-se aos pós-testes complementares de Bonferroni. O nível de significância para a probabilidade α de erros do tipo I no teste de hipóteses foi fixado em, no mínimo, $P < 0,05$. Os cálculos foram efetuados através do Software GraphPad InStat3 para Windows.

6. RESULTADOS

6.1 Fagocitose de zimosan



Aumento

50 μm

Fig. 1. Exemplo de uma lamínula contendo monócitos/macrófagos fagocitando partículas de zimosan. A, partícula de zimosan (esferas escuras); B, macrófago contendo várias partículas fagocitadas em seu citoplasma; C, macrófago sem nenhuma partícula fagocitada. Sem coloração. Filtro de interferência verde com contraste de fase e, Microscópio Olympus MC. Aumento de 40X.

Conforme ilustrado na Fig.1, monócitos/macrófagos podem ser facilmente visualizados pois ganham uma coloração amarelada sob a iluminação de interferência, enquanto que as partículas de zimosan mostram um tom azul-esverdeado característico. Na Fig. 2, vê-se, em aumento de 400X (o mesmo utilizado nas medidas), um macrófago estendendo seus pseudópodos em direção às partículas de zimosan (seta em A) e um macrófago após engolfar 3 partículas (indicadas pelas setas em B).

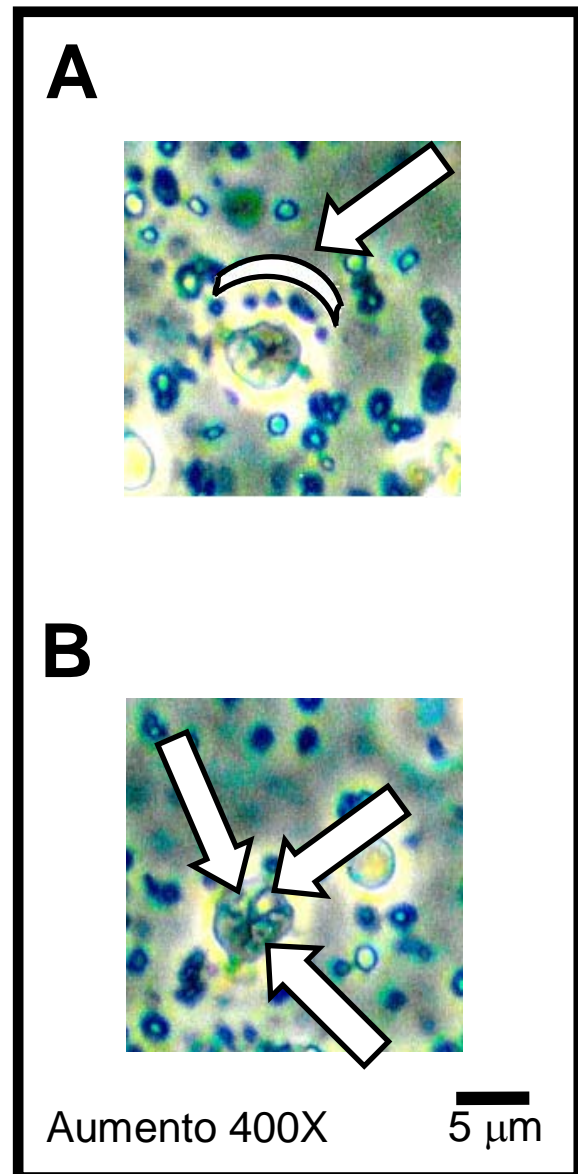


Fig. 2. Exemplo de uma lamínula contendo monócitos/macrófagos estendendo seus pseudópodos em direção às partículas de zimosan (seta em A) e um macrófago após engolfar 3 partículas (indicadas pelas setas em B).

Na Fig. 3, tem-se os resultados obtidos para a quantidade total de partículas de zimosan a partir de monócitos/macrófagos provenientes de ratos exercitados e seus controles. Note-se que o exercício agudo (apenas 1 h) promoveu um aumento de 28,6% ($P = 0,0474$) na capacidade de fagocitose total.

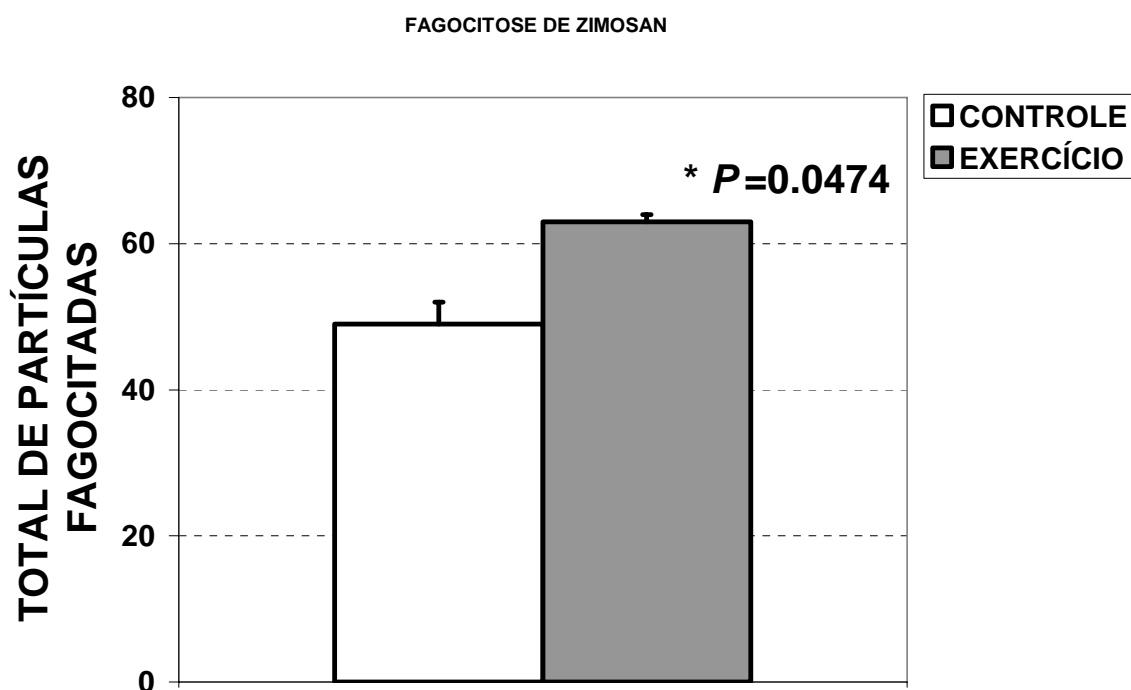


Fig. 3. Fagocitose total. Quantidade total de partículas fagocitadas pelos macrófagos incubados por 1 h conforme descrito na Metodologia.

Quando se avaliam as quantidades de células que fagocitaram 2 ou mais partículas (índice que mede a avidez dos macrófagos na fagocitose), observa-se que o exercício induziu um aumento de 138,5%, isto é, os monócitos/macrófagos obtidos de animais eutanasiados imediatamente após as sessões de exercício agudo de 1 h apresentaram uma capacidade fagocitária 2,4 vezes maior que a das células obtidas a partir dos animais não-exercitados ($P = 0,0041$, Fig. 4).

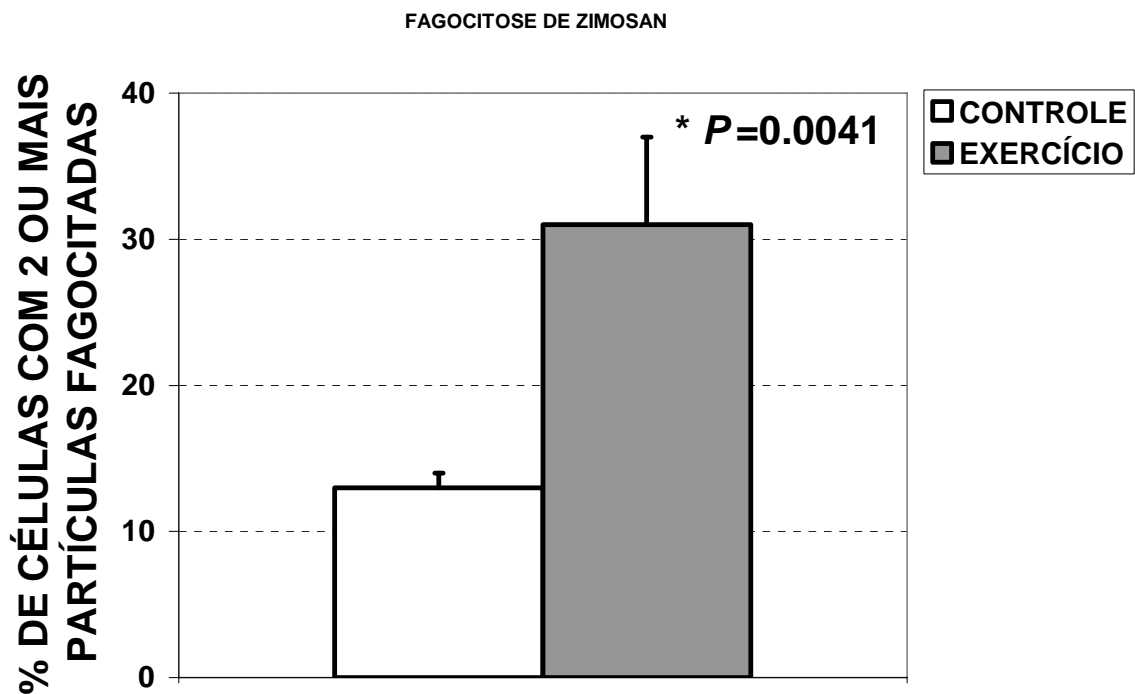


Fig. 4. Porcentagem de células que fagocitaram 2 ou mais partículas de zimosan.

Considerando-se que o exercício induziu aumento significativo na capacidade de fagocitose em monócitos/macrófagos obtidos a partir dos animais exercitados, passou-se a estudar a possibilidade de que um outro parâmetro importante a respeito da capacidade imunológica destas células, a produção de peróxido de hidrogênio induzida por PMA, pudesse também estar aumentada. Os resultados, mostrados na Fig. 5, indicam que o exercício não só estimulou a fagocitose como também a produção de H_2O_2 de maneira dramática: as células provenientes dos animais exercitados produziram 9,7 vezes mais H_2O_2 que suas contrapartes obtidas de animais não-exercitados ($P = 0,0022$).

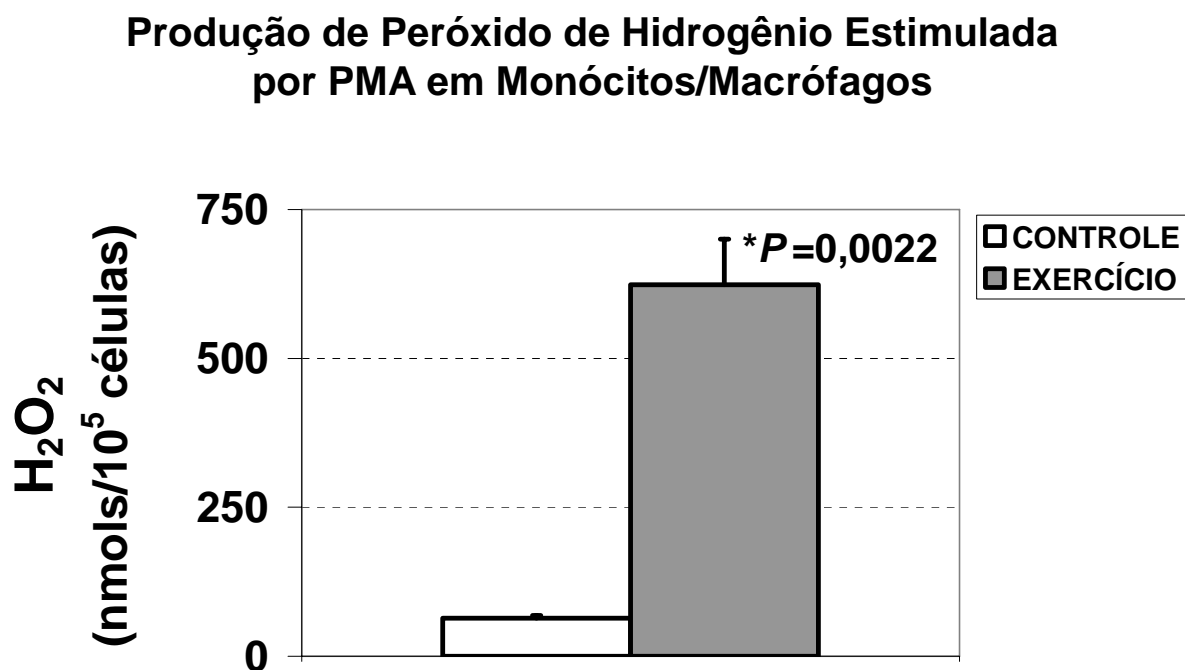


Fig. 5. Produção de H_2O_2 por monócitos/macrófagos estimulados pelo PMA.

Outro parâmetro da atividade imunológica de macrófagos, conforme já mostrado na Introdução, é sua capacidade de produzir espontaneamente NO que é utilizado por estas células como bactericida, tanto em sua forma gasosa, quanto após a combinação com ânions superóxido, por elas mesmas produzidos. Por isso, passou-se a avaliar a taxa de produção de NO_3^- , NO_2^- e NO_x^- totais nestas células. A Fig. 6 mostra que não há diferença estatística na produção de NO estimada pelo acúmulo de nitratos no meio de incubação. Em contrapartida, o acúmulo de nitritos (mais favorável pelo fato de as células terem sido incubadas na ausência de heme-proteínas) quase dobrou em relação aos controles (aumento de 95,5%, $P = 0,0220$; Fig. 7), o que se refletiu no acúmulo de NO_x^- total que é considerado o índice mais fidedigno para estimar-se a produção do gás NO pelas células incubadas. Neste caso, observou-se que o exercício foi capaz de aumentar em 22% ($P = 0,0295$, Fig. 8) a taxa de produção total de NO produzido pelas células.

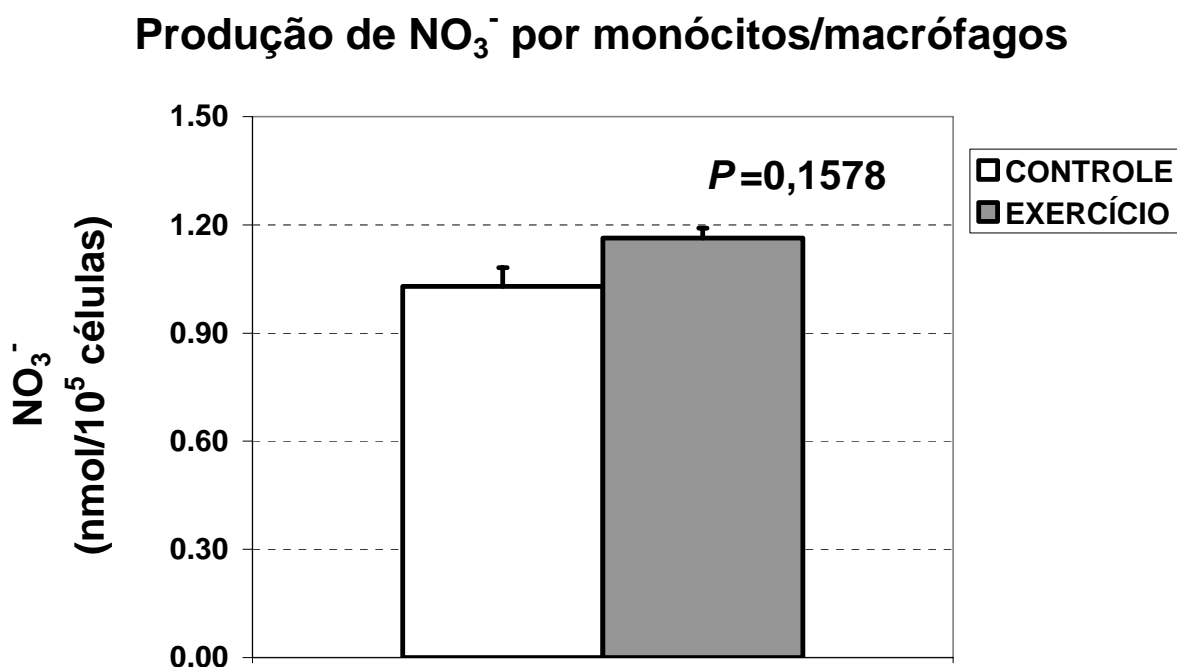


Fig. 6. Produção de espontânea de NO_3^- por monócitos/macrófagos incubados por 1 h.

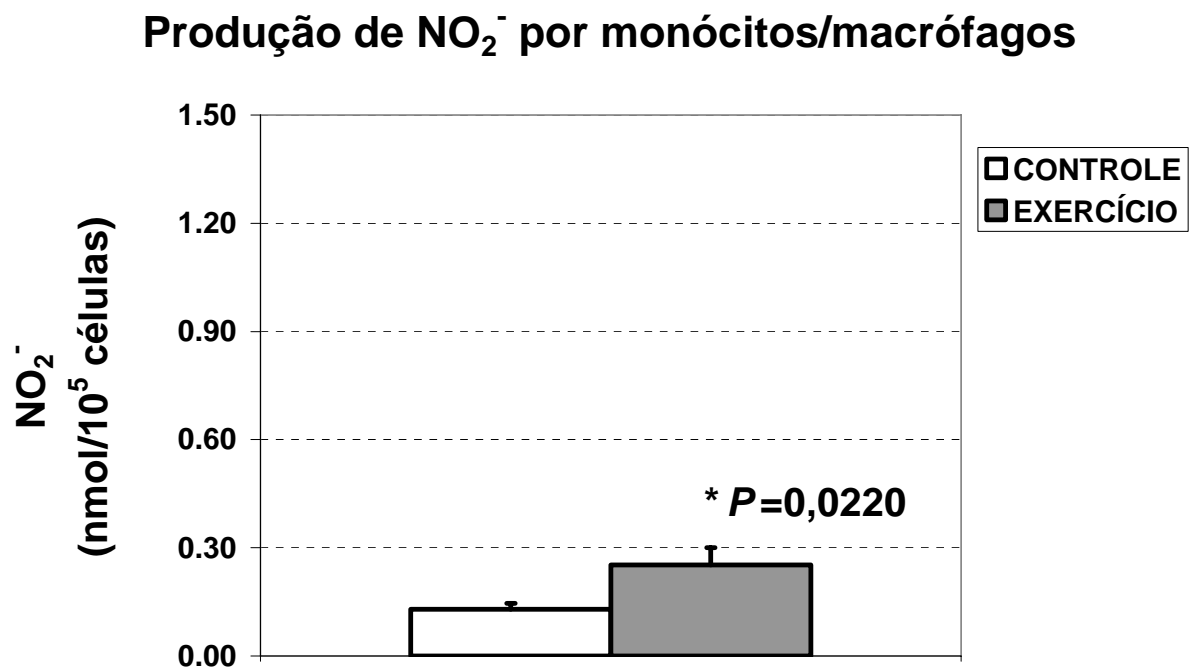


Fig. 7. Produção de espontânea de NO_2^- por monócitos/macrófagos incubados por 1 h.

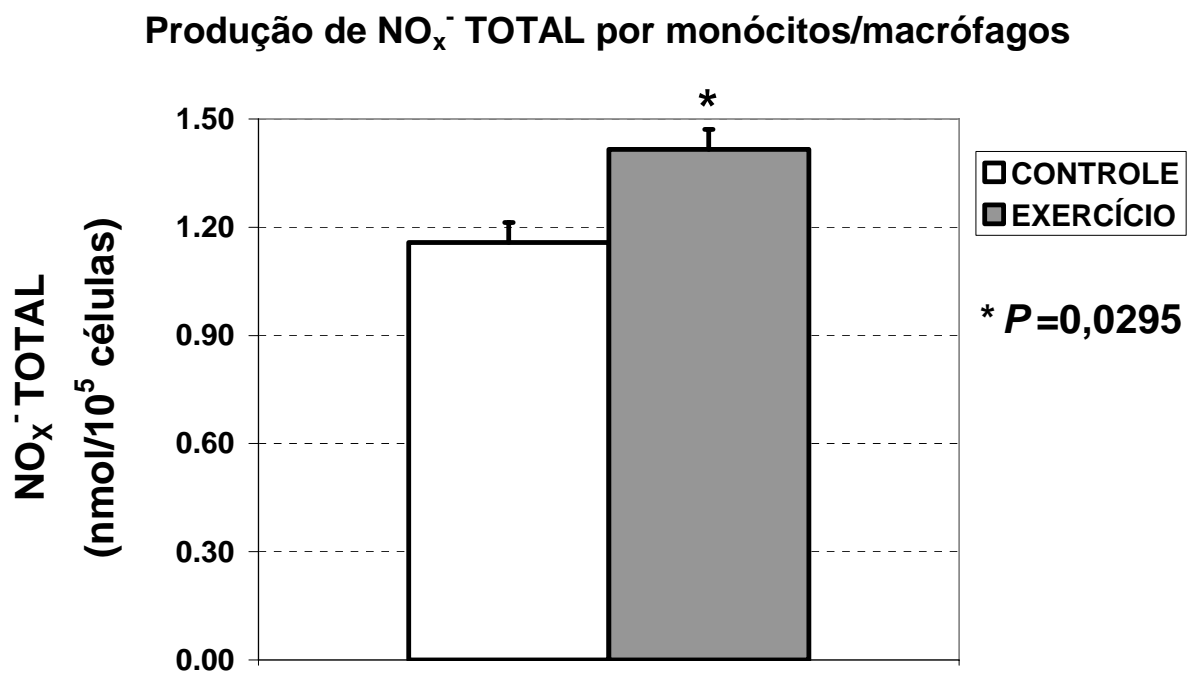


Fig. 8. Produção de espontânea de NO_x^- total por monócitos/macrófagos incubados por 1 h.

Considerando-se o conspícuo aumento na produção estimada de NO pelas células, foi investigada a possibilidade de que esse aumento pudesse ser devido a um incremento na expressão de uma das NOS conhecidas (NOS-1, neuronal, NOS-2, induzível, ou NOS-3, endotelial). Os resultados mostraram que, sob as condições apresentadas neste trabalho, não houve expressão das isoformas NOS-1 e NOS-3 das NO sintases (dados não mostrados); nem nos grupos exercitados nem nos seus controles, sugerindo um aumento na expressão na isoforma induzível (iNOS) codificada pelo gene NOS-2. De fato, os achados confirmaram a suspeita, já que o exercício induziu uma fortíssima expressão da iNOS nos macrófagos obtidos dos animais submetidos á sessão de atividade de natação (Fig. 9; $P = 0,0319$), a qual não é observada nas células obtidas dos animais controle. Tendo-se em conta ainda que a expressão da iNOS é dependente da ativação do fator nuclear de estresse NF- κ B, foi investigada a possibilidade de que uma situação de estresse (oxidativo, talvez) pudesse estar levando à síntese da iNOS. Por isso, foi estudada a expressão da HSP70, um conhecido marcador de estresse celular. Os dados (Fig. 10) mostraram que há estresse, segundo o parâmetro escolhido, porém muito brando (aumento de apenas 35%, $P = 0,0402$) em relação aos controles, o que não é típico dos perfis encontrados em situações de estresse oxidativo. Nestes casos, a expressão da isoforma induzível da HSP70 (HSP72) é sempre dezenas de vezes maior que a observada na situação controle. Estes dados sugerem, portanto, que algum fator externo e não dependente de estresse oxidativo deva estar agindo de maneira a estimular a expressão da iNOS.

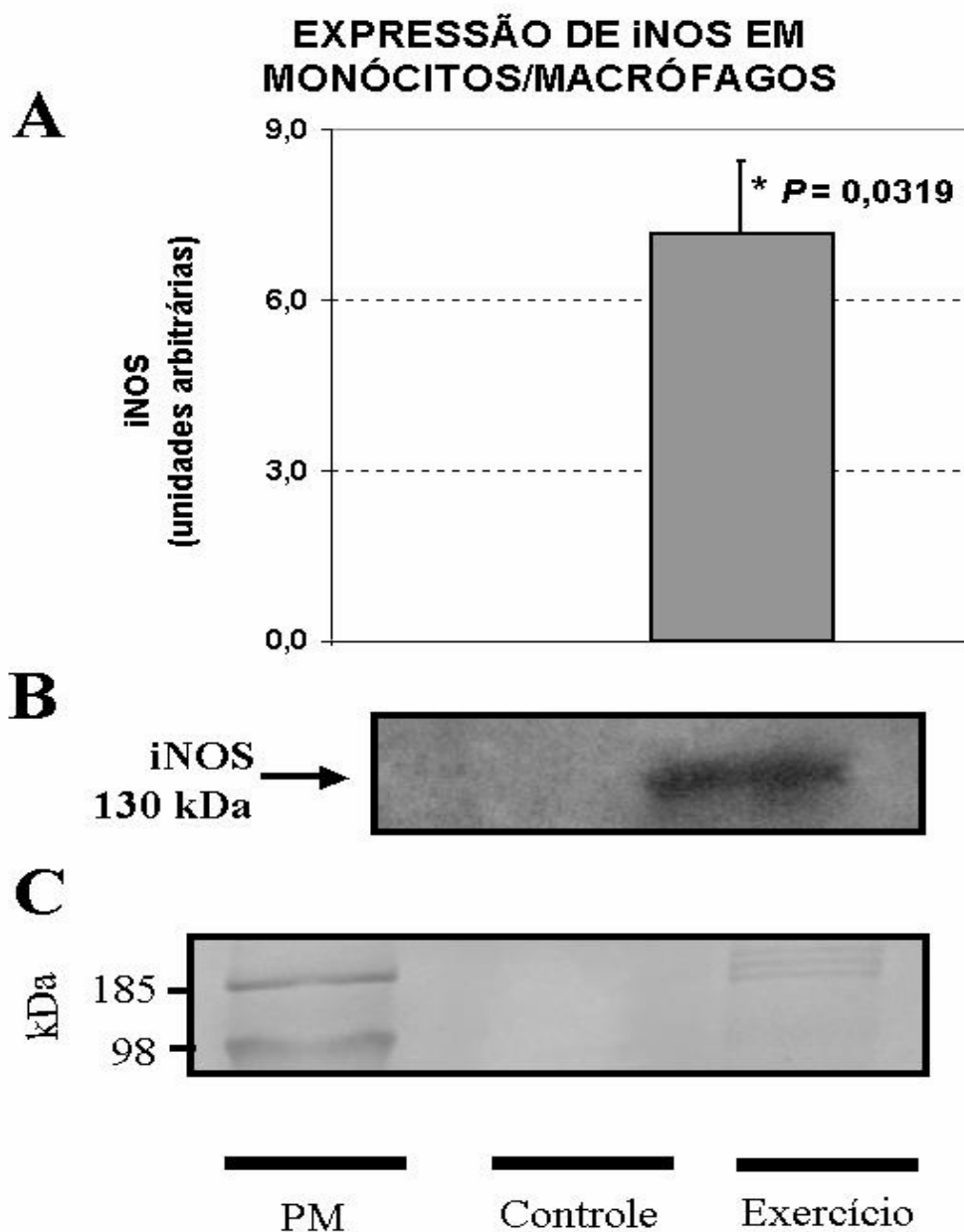


Fig. 9. Expressão da iNOS (NOS-2) por monócitos/macrófagos obtidos de ratos exercitados (e seus controles) 6 horas após as sessões de exercício. (A) histograma mostrando a quantidade de pixels na banda da iNOS em relação aos valores obtidos para β -actina normalizados pelo menor quociente obtido entre as determinações (3 experimentos) de iNOS e HSP70 a fim de permitir comparação entre a expressão das duas proteínas (dados em unidades arbitrárias). (B) membrana de um experimento representativo de imunoblot para iNOS revelada por ECL; (C) gel corado pelo Commassie Blue mostrando os padrões de peso molecular e as proteínas na altura das NOS.

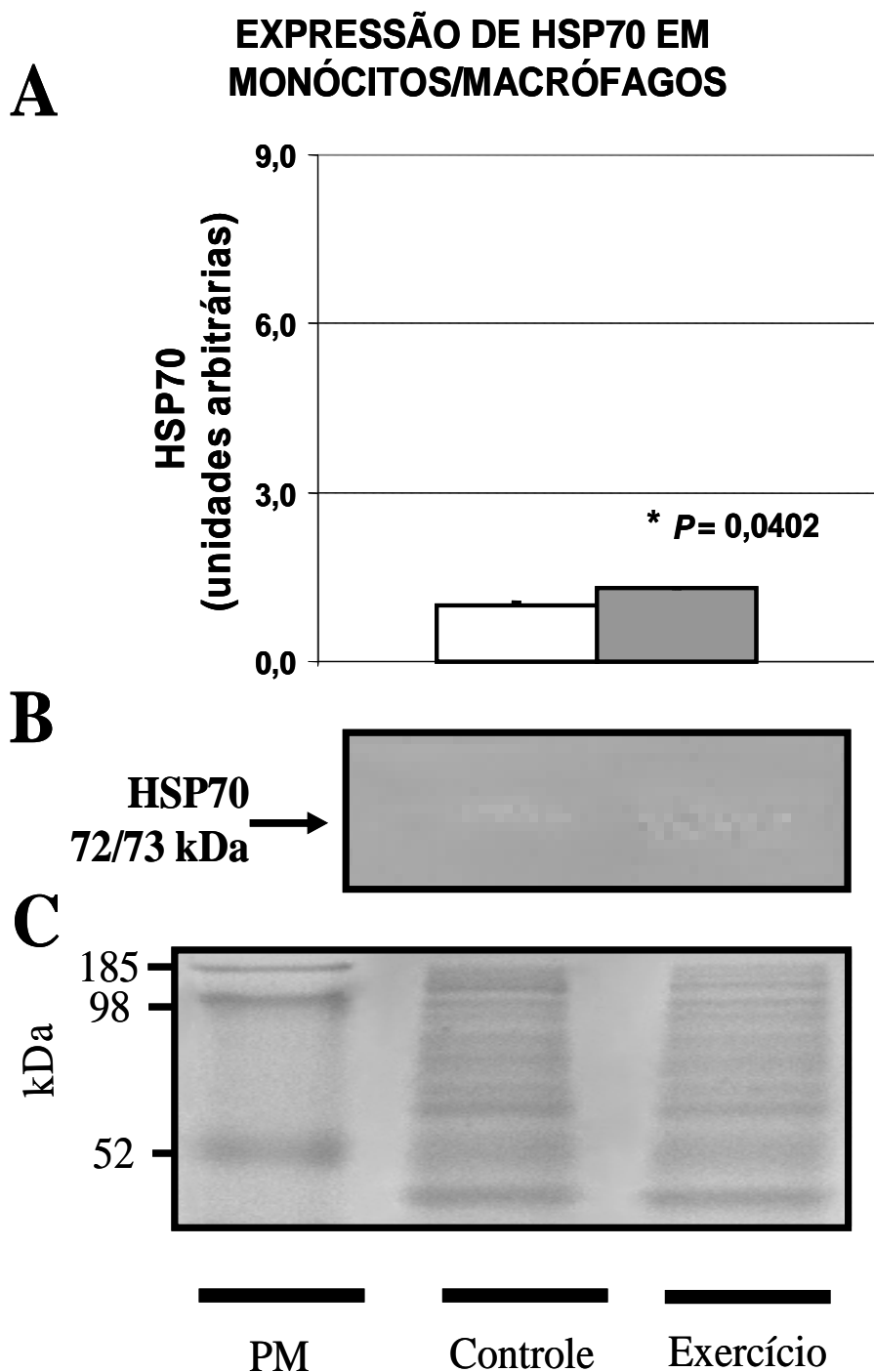


Fig. 10. Expressão da HSP70 (HSP72 + HSP73) por monócitos/macrófagos obtidos de ratos exercitados (e seus controles) 6 horas após as sessões de exercício. (A) histograma mostrando a quantidade de pixels na banda das HSP70 em relação aos valores obtidos para β -actina normalizados pelo menor quociente obtido entre as determinações (3 experimentos) de iNOS e HSP70 a fim de permitir comparação entre a expressão das duas proteínas (dados em unidades arbitrárias). (B) membrana de um experimento representativo de imunoblot para HSP70 revelada por ECL; (C) gel corado pelo Commassie Blue mostrando os padrões de peso molecular e as proteínas na altura das NOS.

Apesar de os dados obtidos para a expressão de HSP70 sugerirem apenas um leve estresse celular para os monócitos/macrófagos estudados, a enorme expressão de iNOS é, por outro lado, sugestiva de algum processo que possa ter levado à ativação intracelular do NF- κ B e, conseqüentemente, ao aumento na capacidade de produção de NO, H₂O₂ e de fagocitose, todos eventos ligados à sinalização pela membrana plasmática e ativação de enzimas como a NADPH oxidase e receptores tirosina quinase (RTK). Entretanto, não se pode descartar a possibilidade de o estresse oxidativo sistêmico gerado pelo exercício físico possa contribuir para o aumento na atividade fagocitária, de geração de peróxido e NO pelos monócitos dos animais submetidos à natação, através de um mecanismo que não gere estresse suficiente para a indução da HSP70. Por isso, foram investigados dois parâmetros significativos do estado redox geral do organismo destes animais: a relação de GSSG/GSH em eritrócitos e a quantidade de TBARS no plasma dos ratos submetidos à natação. Surpreendentemente, no entanto, os dados mostram que não houve alteração significativa nem nos parâmetros relativos ao estado redox eritrocitário (índice do estado redox geral do organismo) nem na quantidade de TBARS circulantes no plasma após o exercício. De fato, não foi observada nenhuma alteração nas quantidade de GSH (Fig. 11), GSSG (Fig. 12) ou na relação entre [GSSG]/[GSH] (Fig. 13), tampouco na concentração de TBARS no plasma (Fig. 14), o que sugere que as alterações verificadas nos monócitos dos animais exercitados (fagocitose, produção de peróxidos e NO) devam ter sido locais e não dependentes de estresse oxidativo sistêmico, como se poderia supor *a priori*. Isto mostra também que a carga de exercício aplicada (intensidade e duração) foi bastante branda durante a natação de 1 h com sobrepeso de 5% ligado à cauda dos animais. O mesmo pode ser dito em relação às concentrações de nitratos e nitritos que permaneceram inalteradas logo após o exercício (Fig. 15-17), o que sugere, novamente, que o efeito do exercício sobre a produção de NO pelos macrófagos deva ter sido de influência local e não sistêmica.

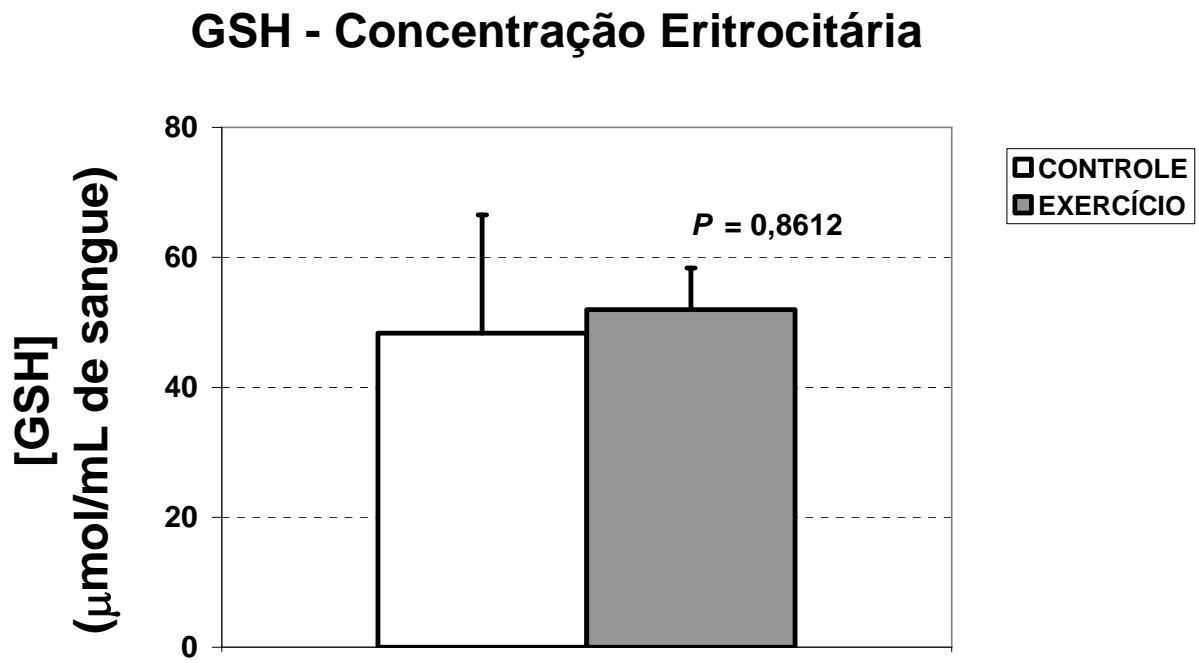


Fig. 11. Concentração eritrocitária de GSH.

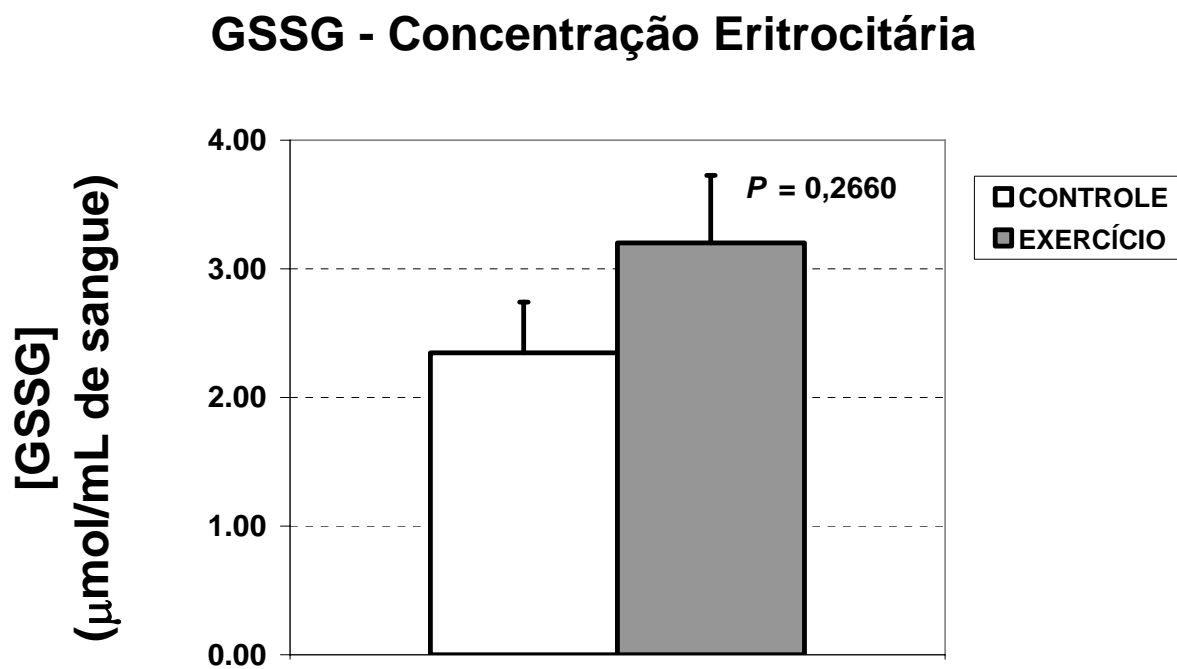


Fig. 12. Concentração eritrocitária de GSSG.

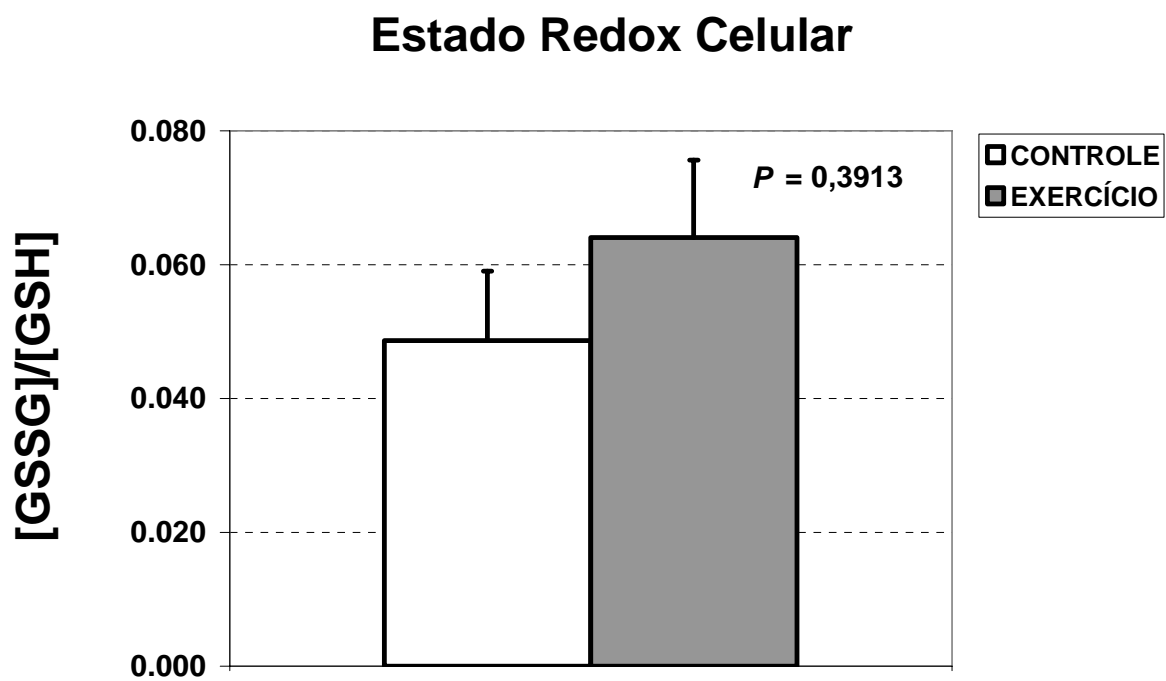


Fig. 13. Estado redox celular em eritrócitos obtidos de animais exercitados e seus controles.

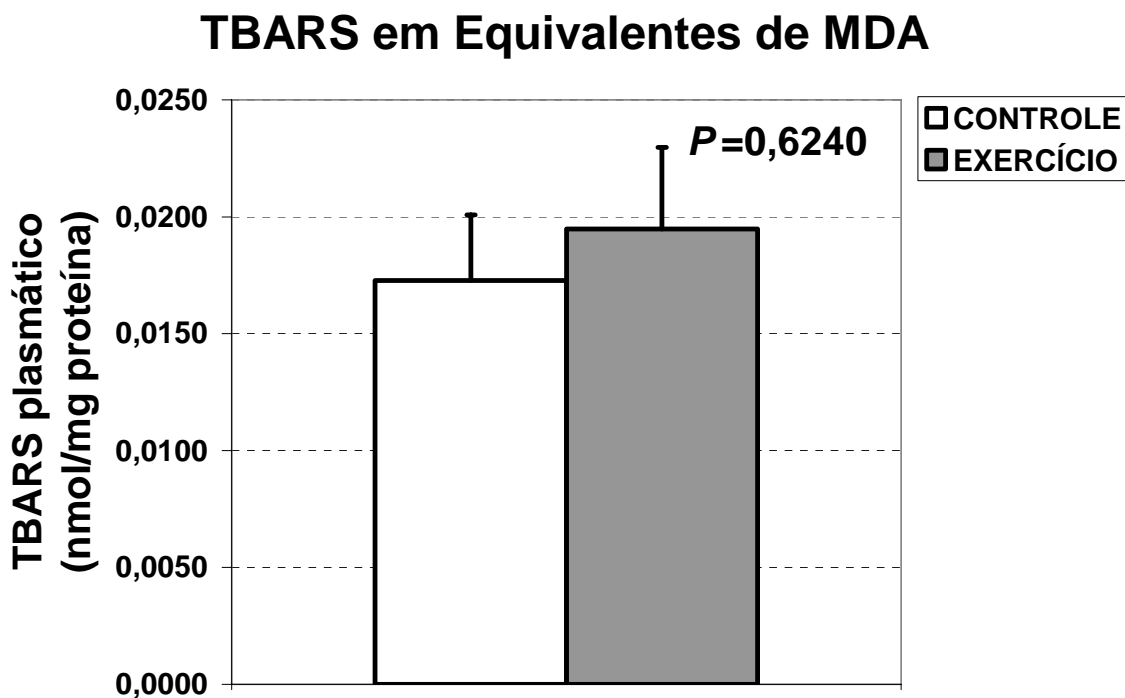


Fig. 14. Medida das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) no plasma dos animais exercitados em relação aos controles como índice da taxa de lipoperoxidação (produção de MDA) sistêmica.

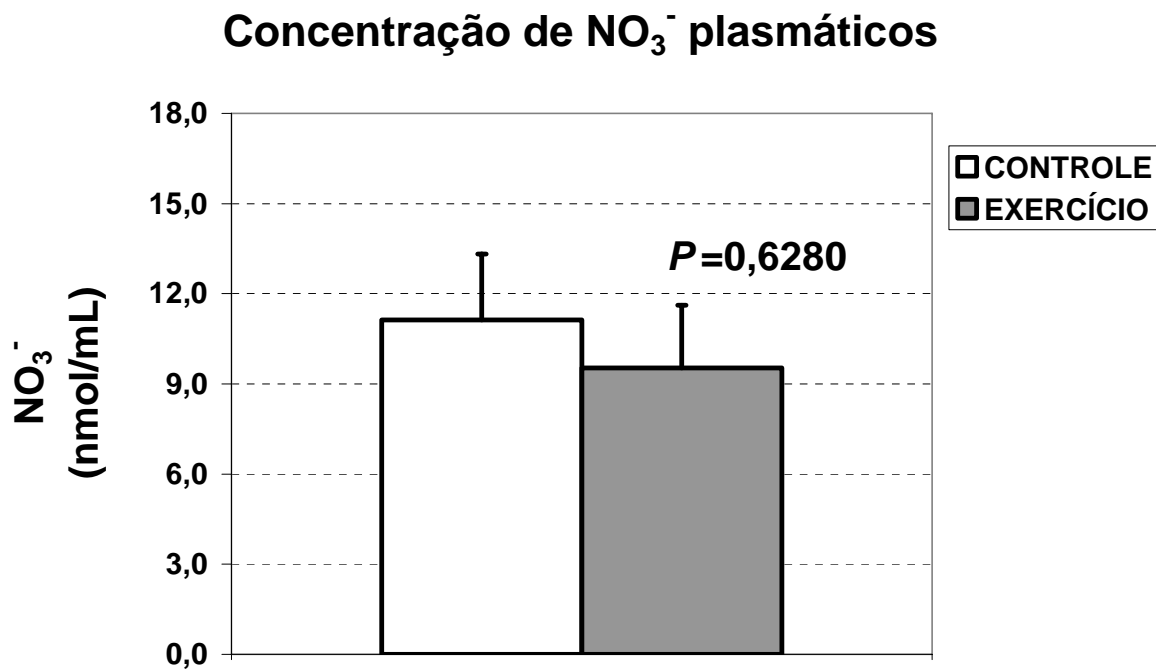


Fig. 15. Medida das concentrações plasmáticas de NO_3^- em animais submetidos à sessão de natação e seus controles.

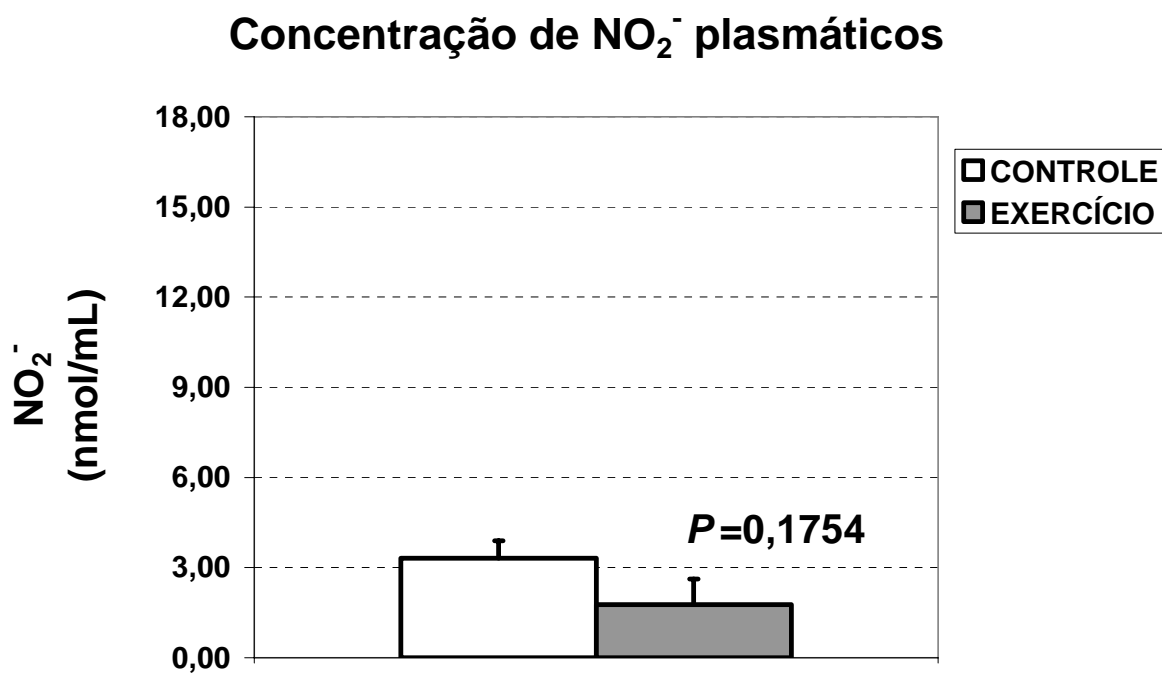


Fig. 16. Medida das concentrações plasmáticas de NO_2^- em animais submetidos à sessão de natação e seus controles.

Concentração de NO_x^- TOTAL no PLASMA

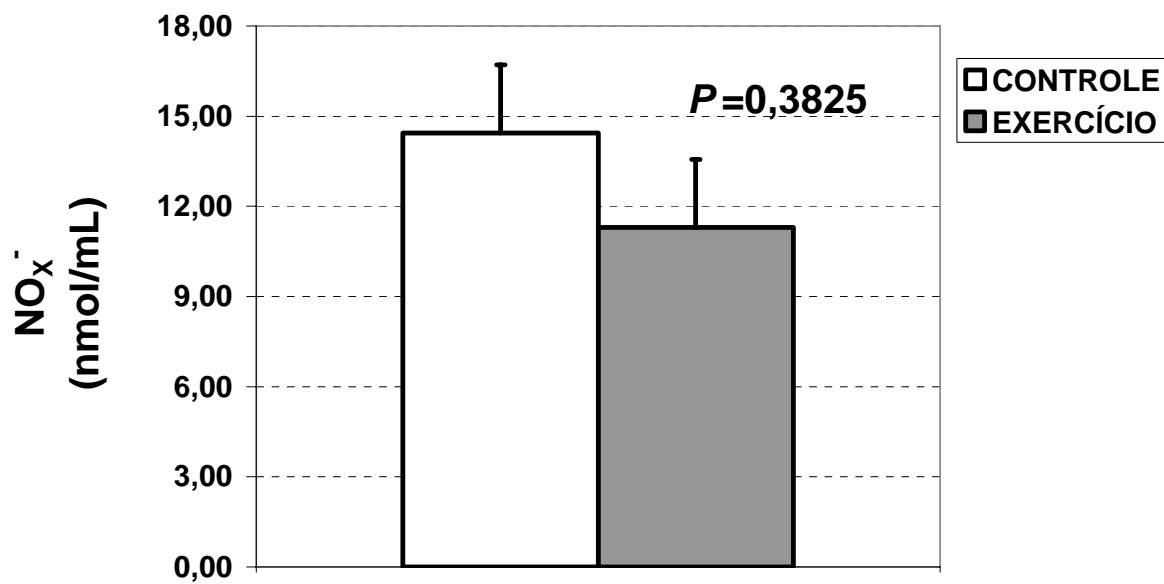


Fig. 17. Medida das concentrações plasmáticas de NO_x^- total em animais submetidos à sessão de natação e seus controles.

7. DISCUSSÃO

A prática de exercício físico regular e de intensidade moderada tem se mostrado um eficiente aliado no combate aos desbalanços fisiológicos apresentados por diferentes patologias. Particularmente em relação às disfunções imunológicas, o exercício físico tem sido prescrito como uma estratégia terapêutica complementar (COSTA ROSA, 2004). Neste contexto, monócitos/macrófagos desempenham um papel fundamental, tanto na orquestração intercelular de respostas imunológicas quanto do ponto de vista da inflamação, um processo fundamental para a manutenção da homeostase e proteção contra agentes invasores. Monócitos/macrófagos participam do reconhecimento e eliminação de invasores estranhos ao sistema imunológico, da sinalização de outros tipos celulares, da regulação do processo de cicatrização, além de produzirem monocinas que têm influências endócrinas em vários tecidos (RAHAT et al., 2006). Para dar conta desta enorme quantidade de complexas tarefas, estas células precisam migrar para os tecidos onde há “conflitos imunológicos”, conseguir sobreviver em áreas de grande adversidade fisiológica (hipóxia, toxinas bacterianas, vírus etc.) e conseguir combater os invasores e/ou corrigir injúrias teciduais sem agravar as lesões nem serem mortas por essas condições. Por sua vez, o exercício físico crônico modula positivamente uma série de funções dos monócitos/macrófagos, como quimiotaxia, fagocitose e produção de mediadores inflamatórios (WOODS et al., 2000). Contudo, o efeito do exercício agudo sobre a funcionalidade destas células permanece em grande parte desconhecido.

Os resultados do presente trabalho sugerem que, ao lado dos conhecidos efeitos benéficos da atividade física moderada sobre vários parâmetros imunológicos, a atividade física aguda possa também dar início a alterações fisiológicas em monócitos/macrófagos com impacto positivo sobre a funcionalidade destas células e, portanto, do sistema imunológico. Os dados aqui obtidos tornam claro que uma única sessão de natação aumenta a capacidade fagocitária e a produção de H_2O_2 e NO nos monócitos/macrófagos obtidos do sangue circulante dos animais. Estes parâmetros indicam um estado de ativação funcional exacerbado nestas células, sugerindo que, pelo menos em nível de monócitos/macrófagos, o sistema imunológico destes animais parece estar “em alerta” para desfechar rápidas respostas imunológicas/inflamatórias se necessário.

A veemente expressão da iNOS (NOS-2) nos monócitos/macrófagos dos animais exercitados e a ausência de expressão das outras isoformas da mesma sintase (NOS-1 e NOS-3) sugerem que o mecanismo de ativação seja especificamente direcionado para a isoforma induzível (NOS-2). Considerando-se que a expressão desta enzima é coordenadamente induzida pelo fator nuclear NF- κ B, e que este é ativado por situações pró-inflamatórias que envolvam o estresse oxidativo (DRÖGE, 2002; DRÖGE & BREITKREUTZ, 2005), nossos estudos foram direcionados à investigação de um possível paralelo entre o exercício de natação e o estresse oxidativo sistêmico. Surpreendentemente, nenhum dos fatores estudados sugeriu que os animais exercitados estivessem em face de uma situação de estresse oxidativo significativo: a quantidade de TBARS circulante, sugestiva de lipoperoxidação, não se mostrou alterada após o exercício; tampouco o índice de estado redox eritrocitário, avaliado pela relação [GSSG]/[GSH] nas hemácias dos mesmos animais. Considerando-se que os eritrócitos são células que circulam por todos os territórios teciduais, agindo como verdadeiros tampões-redox mesmo em tecidos de acesso restrito (barreira hemato-encefálica, feto-materno-placentária etc.), se o exercício agudo em estudo tivesse provocado mínimas variações do estado redox em algum território do organismo, seria de se esperar um aumento significativo na relação [GSSG]/[GSH] eritrocitária. Mas isso não foi verificado, sugerindo que outro fator, que não o estresse oxidativo possa estar envolvido na estimulação de monócitos/macrófagos em resposta ao exercício agudo que não o estresse oxidativo. A baixa expressão da HSP70 em monócitos/macrófagos dos animais exercitados corrobora esta hipótese, já que mínimos desequilíbrios homeostáticos tendem a provocar uma fortíssima resposta celular através da via de produção das HSP70 (SANTORO, 2000). Portanto, os dados sugerem que a ativação dos monócitos/macrófagos deva mesmo estar ocorrendo por conta de outro fator indutor do NF- κ B que não o estresse oxidativo.

Há muito tempo sabe-se que fatores envolvidos na invasão tecidual, como lipopolissacarídeos (LPS) da parede de bactérias gram-negativas sabidamente induzem a expressão da iNOS (MITCHELL et al., 1992), num processo que, hoje se sabe, é dependente da ativação do NF- κ B. No entanto, a ação de algum fator diretamente relacionado ao exercício físico agudo sobre a cascata de ativação do NF- κ B ainda não havia sido reportada.

Quando se associam alterações funcionais em certos tipos celulares às alterações fisiológicas observadas durante o exercício físico agudo, alguns fatores emergem rapidamente como candidatos naturais: catecolaminas, TNF α (COSTA ROSA et al., 1995; SPEIDL et al., 1994), mas não glicocorticóides, cuja ação é sabidamente supressora sobre a maioria das funções de monócitos/macrófagos, especialmente no que diz respeito à ativação do NF- κ B (WOODS et al., 1993). A adrenalina, por exemplo, em concentrações fisiológicas, ativa a geração de NADPH (necessário para a redução do oxigênio molecular e geração de superóxido e peróxido de hidrogênio), via indução da enzima málica, além de estimular o “burst oxidativo” (com aumento de produção de H₂O₂) e o metabolismo da glicose e glutamina em macrófagos de ratos (COSTA ROSA et al., 1995). Outros estudos mostraram que esta catecolamina, via receptores β -adrenérgicos, estimula a absorção óssea por macrófagos/osteoclastos (ARAI et al., 2003) enquanto estimula a expressão de metaloproteinases de matriz extracelular (MMP) em linhagens pró-monocíticas e monócitos circulantes humanos (SPEIDL et al., 2004).

As relações, ainda bastante obscuras, entre o metabolismo dos macrófagos e hormônios do estresse, como as catecolaminas, parecem ir além. Em estudo relativamente recente, foi demonstrado que a perda de inervação simpática em tecidos sinoviais de pacientes portadores de artrite reumatóide leva à liberação de norepinefrina pelos macrófagos sinoviais (MILLER et al., 2000). Aparentemente, neste caso, a ausência de estimulação simpática parece ser compensada pela geração local da catecolamina pelos macrófagos destes tecidos no sentido de prover “manutenção” do processo inflamatório.

Outro fator que aparece como forte candidato a mediador das alterações em monócitos/macrófagos durante o exercício agudo é o fator de necrose tumoral- α (TNF α). Além de conhecidos produtores de TNF α , monócitos/macrófagos são bastante responsivos a esta monocina inflamatória. Macrófagos estimulados imunologicamente (*e.g.* LPS) ou por fatores associados à ativação da PKC (*e.g.* PMA) rapidamente respondem produzindo TNF α , fato que é conhecido há décadas (CHEN et al., 1985; KOBAYASHI et al., 1986). Entretanto, como no caso da adrenalina, macrófagos são, ao mesmo tempo, produtores e células-alvo da ação do TNF α . Monócitos/macrófagos ativados por TNF α secretam uma importante enzima destinada à hidrólise da matriz extracelular durante o processo invasivo dos monócitos até os

sítios de “conflito imunológico”: as metaloproteinases de matriz (MMP). Em monócitos/macrófagos, o TNF α parece agir autocrinamente induzindo a expressão do gene da MMP-9, num processo dependente da ativação do NF- κ B e mediado pela ativação da cascata da MAP quinase (proteína quinase ativada por mitógenos) Ras/ERK1/2 (MOON et al., 2004; RAHAAT et al., 2006).

Durante o exercício físico, o tecido adiposo contribui para a formação de TNF α (PETERSEN & PEDERSEN, 2005), embora outras formas de estresse também tenham sido apontadas como indutoras da produção de TNF α , como o estresse psicológico induzido pelo “rompimento social”, isto é, a exclusão do animal experimental (ou do homem) de seu meio natural (AVITSUR et al., 2005).

Catecolaminas isoladamente ou em conjunto com o TNF α podem ser os mediadores da resposta estimulatória do exercício agudo sobre a capacidade imunológica de monócitos/macrófagos, desde que a carga de exercício seja suficientemente moderada para não atingir um ponto onde o estresse celular passa a ser um bloqueador (ao invés de ativador) da resposta imunológica. O exercício quando praticado em altas “cargas” (alta intensidade e com longa duração) tende a deprimir a resposta imunológica, comprometendo o estímulo dado pelo exercício moderado (PEIJIE et al., 2003). Ao contrário do exercício moderado que leva a uma marcada leucocitose, o treinamento crônico extenuante produz efeitos opostos, levando à linfopenia, redução da capacidade proliferativa de linfócitos e redução da monocitose observada no exercício moderado (PEDERSEN et al., 2001). Para muitos tipos celulares, o TNF α em altas concentrações é um forte indutor de estresse levando à apoptose, num processo que pode ser revertido pela ativação da via das HSP70 (KIM et al., 1997). Note-se que este não é o caso no estudo aqui em discussão. Os dados deste trabalho mostraram que o exercício de natação imposto aos animais sequer induziu alguma alteração significativa na síntese de HSP70 nos monócitos/macrófagos dos mesmos. Isso confirma que o nível de estresse ocasionado pelo exercício deva ter sido bastante moderado e que, mesmo que tenha havido alguma produção de TNF α , esta provavelmente ocorreu em baixos níveis; o suficiente, talvez, para induzir estimulação imunológica nas células estudadas. Várias outras evidências apontam para o mesmo sentido, isto é, que o efeito benéfico do exercício sobre a atividade imunológica, fagocítica e citolítica de macrófagos não esteja associado à produção de interleucinas do tipo

IL-1, EROs ou ERNs, mas sim, à capacidade de produção de TNF α por estas células (WOODS et al., 1993).

Ao contrário do exercício agudo, o treinamento crônico, que também recruta sistemas neuro-endócrinos contra o estresse, induz alterações em macrófagos que podem mascarar os verdadeiros mecanismos estimulatórios encontrados na atividade aguda. Isso inclui a produção de cortisol, um hormônio imunossupressor produzido em altas taxas pelo organismo em resposta ao exercício. Se, por um lado, o treinamento leva à estimulação de células imunológicas (incluindo macrófagos) através da ativação das vias dependentes de NF- κ B em resposta ao aumento de catecolaminas circulantes, por outro, a maciça produção de TNF α induzida por catecolaminas ativa mais ainda o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal elevando as concentrações plasmáticas de cortisol (ou corticosterona no rato). Assim, fecha-se um ciclo onde o estresse do exercício ativa o NF- κ B que estimula a produção de TNF α que induz a secreção de cortisol que inibe a ativação do NF- κ B (MASTORAKOS & PAVLATOU, 2005). Em outras palavras, as alterações crônicas observadas durante a adaptação ao exercício ou no treinamento físico desportivo parecem impedir a visualização dos mecanismos imunoestimulantes que ocorrem em nível dos monócitos/macrófagos individualmente. As Fig. 18 e 19 ilustram nossa hipótese.

Além de que o momento em que se observa o sistema imunológico é importante, muitos modelos experimentais podem ser inadequados para efeitos de comparação. Nos experimentos realizados no presente trabalho, observou-se aumento na produção basal não-estimulada de NO (avaliado pelo acúmulo de NO $_x^-$ total) por monócitos/macrófagos o que pareceu ser devido ao aumento (induzido pelo exercício) na expressão da iNOS. Portanto, não se pode comparar estes resultados com o efeito inibitório da adrenalina sobre a produção de NO por macrófagos estimulados por LPS (SIGOLA & ZINYAMA, 2000; ZINYAMA et al., 2001), ou com a supressão da expressão da iNOS em astrócitos estimulados por LPS quando na presença de noradrenalina (FEINSTEIN et al., 1993), ou com o possível efeito antiinflamatório das catecolaminas sobre macrófagos na sepse (MIKSA et al., 2005), uma condição de estresse sabidamente crônico, ou, finalmente com o efeito crônico da estimulação adrenérgica sobre a produção de citocinas antiinflamatórias (IL-10) por macrófagos na sepse (MUTHU et al., 2005).

A presente hipótese está sendo testada atualmente neste laboratório através do bloqueio *in vivo* da produção/ação de catecolaminas e $\text{TNF}\alpha$ em animais submetidos a sessões de exercício agudo ou cronicamente adaptados ao exercício de natação.

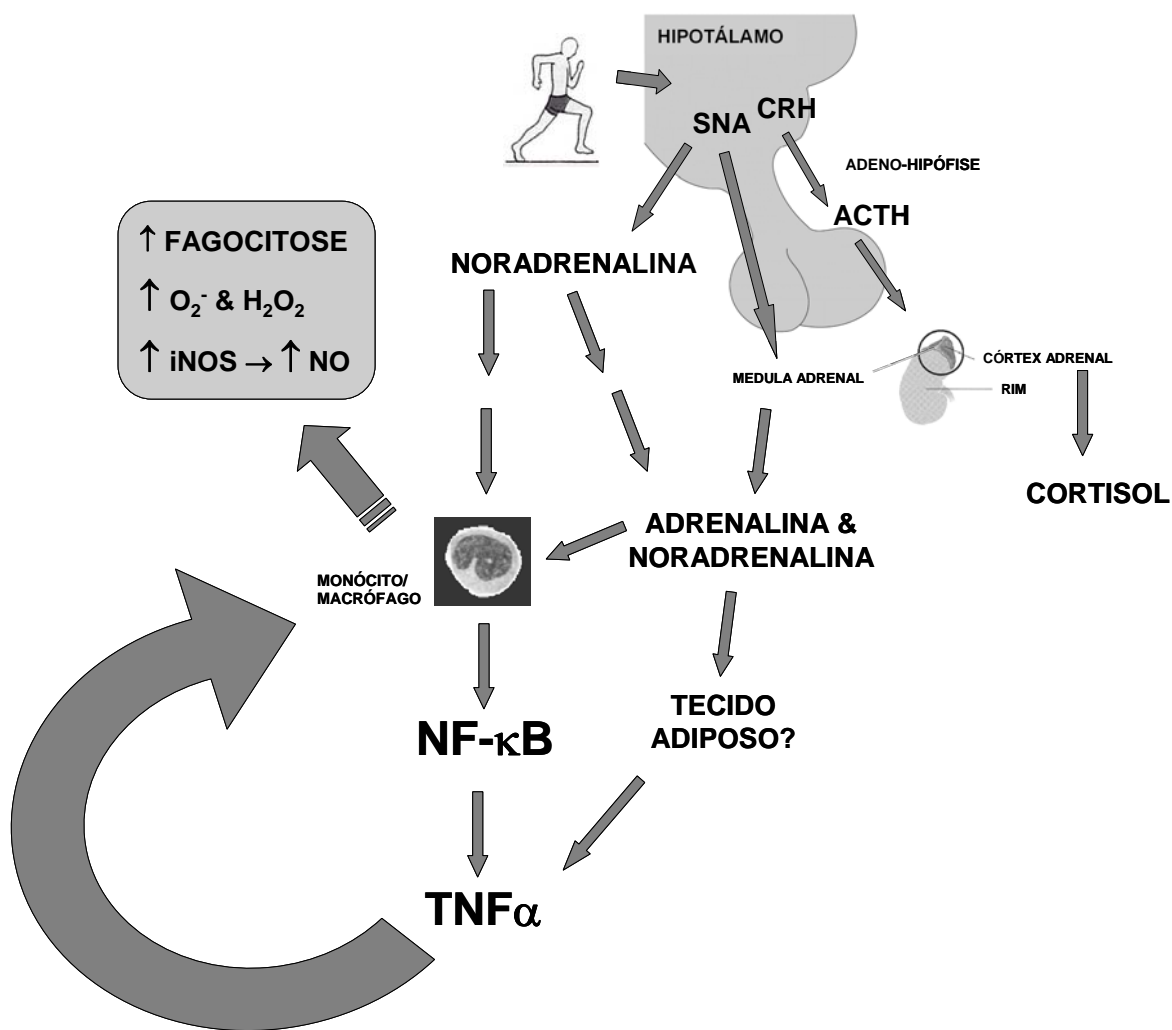


Figura 18. Hipótese para a ativação de monócitos/macrófagos pelo exercício físico **moderado agudo**. Em sessões agudas de exercício moderado a ativação simpática levaria à estimulação de macrófagos através de receptores β -adrenérgicos com ativação da via do NF- κ B e produção de $\text{TNF}\alpha$ que promove estimulação autócrina dos monócitos/macrófagos.

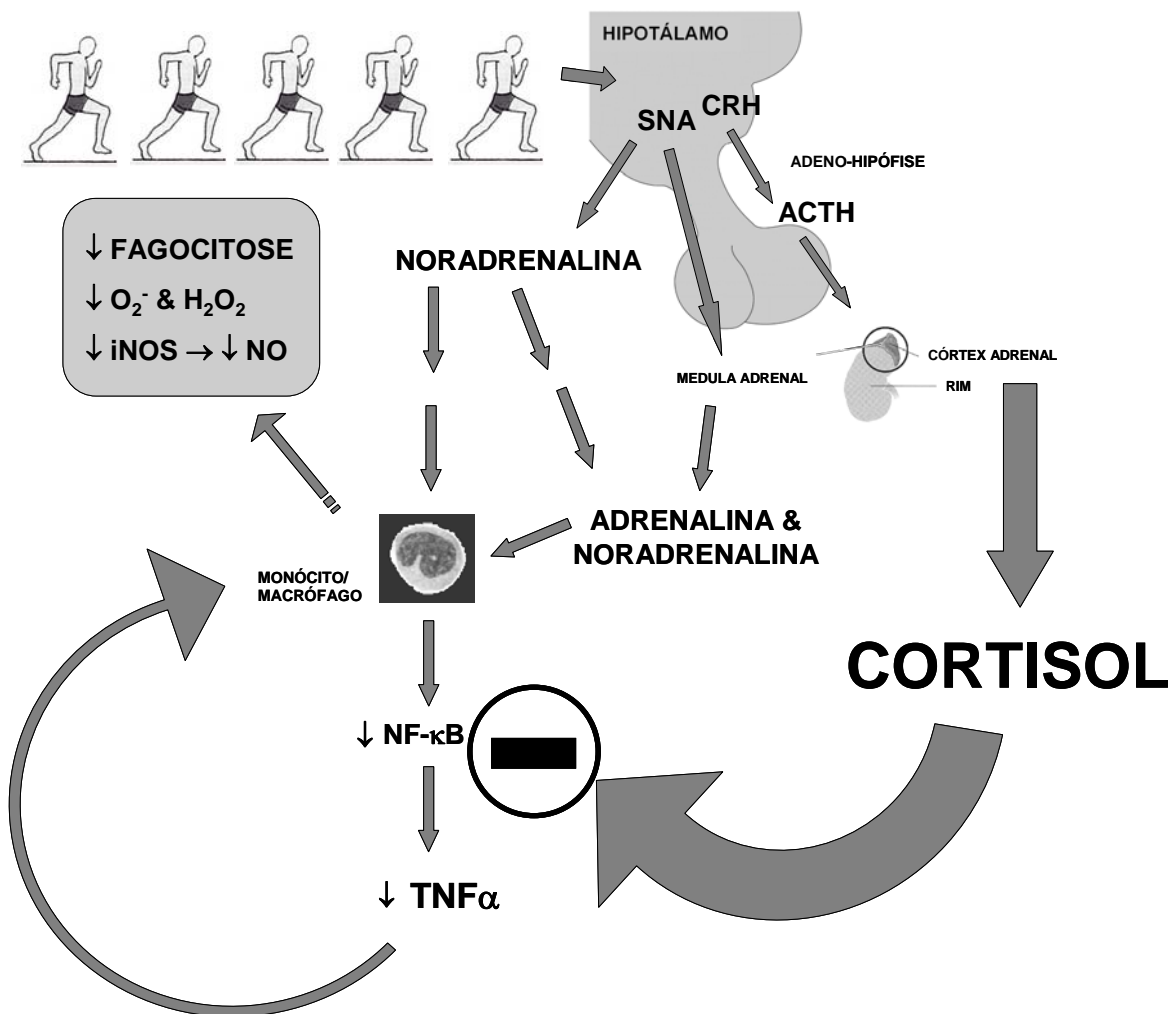


Figura 18. Hipótese para a ativação de monócitos/macrófagos pelo exercício físico **crônico e/ou de alta intensidade**. Durante o treinamento físico prolongado ou após sobrecargas de exercício de alta intensidade e longa duração, a ativação simpática seria sobrepujada pelos efeitos inibitórios da secreção de cortisol (cujos efeitos são de longa duração). O bloqueio da ativação da via do NF-κB estimulada pelo SNA Simpático promoveria o bloqueio na produção de TNFα com conseqüente inibição da estimulação autócrina sobre os monócitos/macrófagos.

8. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos a partir do presente trabalho sugerem que o exercício de natação de 1 h em tanque aquecido com sobrepeso de 5% incorporado à cauda dos animais seja um tipo de atividade física bastante moderado em termos de estresse oxidativo mas que, ao mesmo tempo, é capaz de levar a uma potente estimulação imunológica de monócitos/macrófagos sem induzir estresse oxidativo sistêmico. Individualmente, os dados sugerem o seguinte:

- 1) O protocolo de exercício utilizado é capaz de estimular a função imunológica de monócitos/macrófagos impondo-lhes um poder fagocitário mas de 2 vezes maior que o dos animais controle;
- 2) A estimulação imunológica observada é acompanhada de enorme incremento na produção de peróxido de hidrogênio e de NO (especialmente quando avaliado em termos da produção de nitritos em incubações de 1 h);
- 3) O incremento na produção de NO está relacionado à expressão da enzima NO sintase induzível (iNOS = NOS-2) que normalmente é ativada em situações de estresse oxidativo;
- 4) Apesar de os dados serem sugestivos de estimulação de monócitos/macrófagos pelo estresse oxidativo, a baixa expressão de HSP70 nos monócitos/macrófagos associada à ausência de estresse oxidativo sistêmico (metabolismo eritrocitário da GSH e concentrações de TBARS no plasma) indicam que os efeitos do exercício agudo sobre a funcionalidade imunológica de monócitos/macrófagos sejam dependentes de outros fatores ativados pelo exercício;
- 5) Uma vez que o exercício físico agudo incrementa as concentrações plasmáticas de catecolaminas e $TNF\alpha$, não se pode descartar a possibilidade de que esses fatores neuro-endócrinos estejam mediando a resposta de monócitos/macrófagos ao exercício. Esta possibilidade está sendo investigada atualmente em nosso laboratório.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGARWAL BB, MEHTA K. Determination and regulation of nitric oxide production from macrophages by lipopolysaccharides, cytokines, and retinoids. **Methods Enzymol**, **269**:166-171, 1996.
- AKERBOOM TPM, SIES H. Assay of glutathione, glutathione disulfide, and glutathione mixed disulfides in biological samples. **Methods Enzymol.**, **77**:373-82, 1981.
- ALESSIO HM, HAGERMAN AE, FULKERSON BK, AMBROSE J, RICE RE, WILEY RL. Geration of reactive oxygen species after exhaustive aerobic and isometric exercise. **Med. Sci.Sports Exerc** **32**:1576-81, 2000.
- ANDERSON ME. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples. **Methods Enzymol.**, **113**:548-55, 1985.
- ARAI M, NAGASAWA T, KOSHIHARA Y, YAMAMOTO S, TOGARI A. Effects of β -adrenergic agonists on bone-resorbing activity in human osteoclast-like cells. **Biochim Biophys Acta**, **1640**: 137-142, 2003.
- AVITSUR R, KAVELAARS A, HEIJNEM C, SHERIDAN JF. Social stress and the regulation of tumor necrosis factor- α secretion. **Brain Behav Immunity**, **19**:311-317, 2005.
- BARJA DE QUIROGA G. Brow fat thermogenesis and exercise: Two exemples of physiological oxidative stress? **Free Radic Biol Med** **13**: 325-340,1992.
- BELLÓ-KLEIN A . **Dano Oxidativo e Regulação Biológica pelos Radicais Livres**. In: Estresse Oxidativo e antioxidantes. MARRONI NAP, Canoas, Ed ULBRA, p:15-19, 2002.
- BLOOMER RJ, GOLDFARB AH. Anaerobic exercise and oxidative stress: a review. **Can J Appl Physiol**, **29**:245-263,2004.
- BOGDAN C. Nitric oxide and the immune response. **Nat Immunol**, **2**:907-16,2001.

- BRADFORD, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, **72**:248-254, 1976.
- BUEGE JA, AUST SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol*, 52:302-310, 1978.
- BURCHILL BR ,OLIVER JM, PEARSON CB,LEINBACH ED, BERLIN RD Microtubule dynamics and glutathione metabolism in phagocytizing human polymorphonuclear leukocytes. *J. Cell Biol.*, 76:439-447 (**Dosagem do metabolismo da GSH após fagocitose**),1978.
- CAPO C , MECONI S,SANGUEDOLCE M-V ,BARDIN N,FLATAU G,BOQUET P,MEGE JL Effect of Cytotoxic Necrotizing Factor-1 on Actin Cytoskeleton in Human Monocytes: Role in the Regulation of Integrin-Dependent Phagocytosis. **J. Immunol.**, **161**:4301-4308,1998.
- CAZZOLA R, RUSSO-VOLPE S, CERVATO G, CESTARO B. Biochemical assessments of oxidative stress, erythrocyte membrane fluidity and antioxidant status in professional soccer players and sedentary controls. **Eur J Clin Invest**, **33**:924-30, 2003.
- CHEN AR, MCKINNON KP, KOREN HS. Lipopolysaccharide (LPS) stimulates fresh human monocytes to lyse actinomycin D-treated WEHI-164 target cells via increased secretion of a monokine similar to tumor necrosis factor. **J Immunol**, **135**:3978-3987, 1985.
- COHEN MS TK Gray Phagocytic cells metabolize 25-hydroxyvitamin D3 in vitro. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **81**:931-934,1984.
- CONNOLY PH,CAIOZZO VJ,ZALDIVAR F, NEMET D, LAISON J,HUNG SP, HECK JD, HATFIELD GW,COOPER DM.Effects of exercise on gene expression in human peripheral blood mononuclear cells. **J Appl Physiol**, **97**:1461-1469, 2004.
- COOPER CE, VOLLAARD NB, CHOUETI T, WILSON MT.Exercise, free radicals and oxidative stress. **Biochem Soc Trans**,**30**:280-285,2002.
- COSTA ROSA LFBP, CURI R MURPHY C NEWSHOLME P. Effect of adrenaline and phorbol myristate acetate or bacterial lipopolysaccharide on stimulation of pathways of macrophage glucose, glutamine and O₂ metabolism. **Biochem J**, **310**: 709-714, 1995.

- COSTA ROSA LFBP, Exercise as a Time-conditioning Effector in Chronic Disease: a Complementary Treatment Strategy. **eCAM**, **1**:63-70,2004.
- CURI R, PERES CM. Como Cultivar Células. In: CURI R, PERES CM. Guanabara Koogan, 2005.
- DING AH, NATHAN CF, STUEHR DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. **J Immunol**, **141**:2407-2412, 1988.
- DRAPER HH, SQUIRES EJ, MAHMOODI H, WU J, AGARWAL S, HADLEY M. A comparative evaluation of thiobarbituric acid methods for the determination of malondialdehyde in biological materials. **Free Rad. Biol. Med.**, **15**:353-363, 1993.
- DRÖGE W, BREITKREUTZ R. Glutathione and immune function. **Proc Nutr Soc**, **59**: 595-600, 2005.
- DRÖGE W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiol Rev**, **82**: 47-95, 2002.
- DUARTE JÁ, APPELL HJ, CARVALHO F, BASTOS ML, SOARES JM. Endothelium – Derived oxidative stress may contribute to exercise induced muscle damage. **Int. J Sports Med** **14**:440-3,1993.
- ELIA G, SANTORO MG. Regulation of heat shock protein synthesis by quercetin in human erythroleukaemia cells. **Biochem. J.**, **300**:201-9, 1994.
- ELSAYED NM. Antioxidant mobilization in response to oxidative stress: a dynamic environmental-nutritional interaction. **Nutrition**, **17**:828-34,2001.
- FEHRENBACH E, PASSEK F, NIESS AM, POHLA H, WEINSTOCK C, DICKHUTH HH, NORTHOFF H. HSP expression in human leukocytes is modulated by endurance exercise. **Med Sci. Sports Exerc**, **32**: 592-600, 2000.
- FEHRENBACH E, NIESS AM. Role of Heat Shock Proteins in the exercise response. **Exec. Immunol. Rev.** **5**: 57-77,1999.
- FEINSTEIN DL, GALEA E, REIS DJ. Norepinephrine suppresses inducible nitric oxide synthase activity in rat astroglial cultures. **J Neurochem**, **60**: 1945-8, 1993.

- FENSTER CP, WEINSIER RL, DARLEY-USMAR VM, PATEL RP. Obesity, aerobic exercise and vascular disease: The role of oxidant stress. **Obes. Res.**10: 964-8,2002.
- FERRANDEZ MD, DE LA FUENT M. Effects of age, Sex and physical exercise on the phagocytosis process of murine peritoneal macrophages. **Acta Physiol. Scand.** 166:47-53,1999.
- GILLIAM MB, SHERMAN MP, GRISCAVAGE JM, IGNARRO LJ. A spectrophotometric assay for nitrate using NADPH oxidation by *Aspergillus* nitrate reductase. **Anal Biochem**, 212:359-365, 1993.
- GILLIAM MB,SHEMAN MP,GRISCAVAGE JM,IGARRO LJ. A spectrophotometric assay for nitrate using NADPH oxidation by *Aspergillus* nitrate reductase. **Anal. Biochem.**, 212:359-365, 1993.
- GOBATTO CA, de MELLO MA, SIBUYA CY, de AZEVEDO JR, dos SANTOS LA, KOKOBUN E. Maximal lactate steady state in rats submitted to swimming exercise. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**, 130: 21-7, 2001.
- GOLDFARD AH. Antioxidants: Role of supplementation to prevent exercise induced oxidative stress. **Med. Sci. Sports Exerc** 25: 232-6,1993.
- GRANGER DL , TAINTOR RR, BOOCKVAR KS , HIBBS JR JB . Determination of nitrate and nitrite in biological samples using bacterial nitrate reductase coupled with Griess reaction. **Methods (A companion to Methods in Enzymology)**, 7:78-83, 1995.
- GRANGER DL,TAINTOR RR,BOOCKVAR KS,HIBBS JB Jr. Determination of nitrate and nitrite in biological samples using bacterial nitrate reductase coupled with Griess reaction. **Methods (A companion to Methods in Enzymology)**, 7:78-83, 1995.
- GREEN LC, WAGNER DA, GLOGOWSKI J, SKIPPER PL, WISHNOK JS, TANNENBAUM SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. **Anal Biochem**, 126:131-138, 1982.
- GREEN LC,WAGNER DA,GLOGOWSKI J,SKIPPER PL,WISHNOK JS,TANNENBAUM SR. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.**, 126:131-138, 1982.

- GRIFFIN FM, GRIFFIN JA, LEIDER JESILVERSTEIN SC. Studies on the mechanism of phagocytosis: I. Requirements for Circumferential Attachment of Particle-Bound Ligands to Specific Receptors on the Macrophage Plasma Membrane. **J. Exp. Med.**, **142**:1263-1282,1975.
- GRISHAM M ,JOHNSON GG, JR LANCASTER JR . Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. **Methods Enzymol.**, **268**:237-246, 1996.
- GRISHAM M, JOHNSON GG, LANCASTER Jr JR. Quantitation of nitrate and nitrite in extracellular fluids. **Methods Enzymol**, **268**:237-246, 1996.
- GROSS SS, WOLIN MS. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. **Annu Rev Physiol**, **57**:737-769. 1995.
- GROSS SS, WOLIN MS. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. **Annu.Rev. Physiol**,**57**:737-769,1995.
- HALLIWEL B, GUTTERIDGE JMC.Free Radicals in Biology and Medicine, 2° ed, Clarendon Press, Oxford,1995.
- HALLIWELL B. Free radicals and antioxidants: A personal view. **Nutrition Reviews** **52**:253-65,1994.
- HAMILTON KL, STAIB JL, PHILLIPS T, HESS A, LENNON SL, POWERS SK. Exercise, antioxidants and HSP72: protection against myocardial ischemia/ reperfusion. **Free Radic Biol Med** **34**: 800-9,2003.
- HAMMOND GW, NOBLE GR,SMITH SJ.Lack of parallelism in antibody responses measured by enzyme immunoassay after infection due to influenza virus A/USSR/77. **J Infect Dis.**(**146**);827,1982
- HOFFMAN-GOETZ L, PEDERSEN BK. Exercise and the Immune System. A model of the response? **Immunol Today**, **15** :282-387, 1994.
- HOLLAND S, VIZI ES. Immunomodulation. **Current Opinion in Pharmacology**.(**2**) 425-7,2002.
- HOMEM DE BITTENCOURT Jr PI, YANO MM, HIRATA MH, WILLIAMS JF, CURI R. (1994). Evidence that prostaglandins modulate lipogenesis in cultured lymphocytes - a

comparison with its effect on macrophages and tumour cells. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, **33**:463-675.

HOMEM DE BITTENCOURT JR. PI. Endotélio Vascular. In: FUCHS FD, WANNMACHER L (Eds.) **Farmacologia Clínica**, 2.ed, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.126-136, 1998.

HOMEM DE BITTENCOURT JR.PI, PERES CM, YANO MM, HIRATA MH, CURI R. (1993). Pyruvate is a lipid precursor for rat lymphocytes in culture. Evidence for a lipid exporting capacity. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, **30**:631-641.

KAY CJ, BARBER MJ. Assimilatory nitrate reductase from *Chlorella*: Effect of ionic strength and pH on catalytic activity. **J Biol Chem**, **261**:14125-14129, 1986.

KEYNES RG, GARTHWAITE J. Nitric oxide and its role in ischaemic brain injury. **Curr Mol Med** **4**:179-91,2004.

KIM YM, VERA ME, WATKINS SC, BILLIAR TR. Nitric Oxide Protects Cultured Rat Hepatocytes from Tumor Necrosis Factor- α -induced Apoptosis by Inducing Heat Shock Protein 70 Expression. **J Biol Chem**, **10**:1402 – 1411, 1997.

KOBAYASHI M, PLUNKETT JM, MASUNAKA IK, YAMAMOTO RS, GRANGER GA. The human LT system. XII. Purification and functional studies of LT and "TNF-like" LT forms from a continuous human T cell line. **J Immunol**, **137**:1885-1892, 1986.

KOHN AP, SANDERS VM. Norepinephrine and beta 2-adrenergic receptor stimulation regulate CD4+ T and B lymphocyte function in vitro and in vivo. **Pharmacol Rev** **53**:487-525,2001.

KOHUT ML, SENCHINA DS, MADDEN KS, MARTIN AE, FELTEN DL, MOYNIHAN JA. Age effects on macrophage function vary by tissue site, nature of stimulant, and exercise behavior. **Exp Gerontol**, **39**:1347-1360,2004.

KOLBERG A, ROSA TG, PUHL MT, SCOLA G, JANNER DR, LAGRANHA DJ, MASLINKIEWICZ A, HECK TG, CURI R, HOMEM DE BITTENCOURT JR PI. (2006) Low expression of MRP/GS-X pump ATPase in lymphocytes of Walker 256 tumor-bearing rats is associated with cyclopentenone prostaglandin accumulation and cancer immunodeficiency. **Cell Biochem Func**, **24**:23-39.

- KONIG D,WAGNER KH, ELMADFA I, BERG A. Exercise and oxidative stress:significance of antioxidants with reference to inflammatory, muscular, and systemic stress. **Exerc Immunol Rev**,7:108-33,2001.
- KRONER EE, PESKAR BA,FISHER H, FERBER E.Control of arachidonic acid accumulation in bone marrow-derived macrophages by acyltransferases. **J Biol Chem**, 256: 360-369,1981.
- KURU O, SENTÜRK UK, DEMIR N, YESILKAYA A, ERGÜLER G, ERKLIÇ M. Effect of exercise on blood pressure in the rats with chronic NOS inhibition. **Eur J Appl Physiol**, 87: 134-140, 2002.
- KUUSELA P, HARRI N. Is swimming exercise or cold exposure for rats? **Acta Physiol Scand**, 126: 189-197,1986.
- LAMPRECHT M, GREILBERGER J, OETTL K.Analytical aspects of oxidatively modified substances in sports and exercises. **Nutrition**, 20:728-30,2004.
- LINDQUIST S, CRAIG EA. The heat-shock proteins. **Rev Genet**, 22:631-77,1988.
- LLESUY SF. **Introducción y Especies Activas de Oxígeno**. In: Estresse Oxidativo e antioxidantes. MARRONI NP, Canoas, Ed ULBRA,p: 21-32, 2002.
- LOCKE M, NOBLE EG.Stress Proteins:The exercise response. **Can J Appl Physiol**,20:155-167,1995.
- LU Q, CEDDIA MA, PRICE EA, YE SM, WOODS JA. Chronic exercise increases macrophage – mediated tumor cytolysis in young and old mice. **Am J Physiol**, 276: 482-489, 1999.
- MACKANESS GB.The influence of immunologically committed lymphoid cells on macrophage activity in vivo. **J Exp Med** 129:973-92,1969.
- MAK TW,YEH WC.Signaling for survival and apoptose in the immune system. **Arthritis Res**, 4: 243-52, 2002.
- MALM C,LENKEI R, SJÖDIN B.Effects of eccentric exercise on the immune system in men. **J Appl Physiol**, 86:461-468,1999.

- MASTALOUDIS A, LEONARD SW, TRABER MG. Oxidative Stress in athletes during extreme endurance exercise. **Free Rad Biol Med**, **31**:911-22, 2001.
- MASTALOUDIS A, MORROW JÁ, HOPKINS DW, DEVARAJ S, TRABER MG. Antioxidant supplementation prevents exercise – induced lipid peroxidation, but not inflammation in ultramarathon runners. **Free Rad Biol Med** **36**: 1329-1341, 2004.
- MASTORAKOS G, PAVLATOU M. Exercise as a stress model and the interplay between the hypothalamus-pituitary-adrenal and the hypothalamus-pituitary-thyroid axes. **Horm Metab Res.**, **37**:577-584, 2005.
- MATHU K, DENG J, GAMELLI R, SHANKAR R, JONES SB. Adrenergic modulation of cytokine release in bone marrow progenitor-derived macrophage following polymicrobial sepsis. **J Neuroimmunol**, **158**:50-57, 2005.
- MCBRIDE JM, KRAEMER WJ. Free radicals, exercise and antioxidants. **J Strength Cond Res**, **24**:175-83, 1999.
- McCORD JM, FRIDOVICH I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemocuprein. **J Biol Chem**, **244**:6049-55, 1969.
- MELO MP, CURI TCP, MIYASAKA CK, PALANCH AC, CURI R. Effect of indole acetic acid on oxygen metabolism in cultured rat neutrophil. **Gen. Pharmacol.**, **31**:573–578, 1998.
- MEYER TN, DA SILVA AL. Resposta celular ao estresse. **Rev. Ass. Méd.** **2**:181-188, 1999.
- MIKSA M, WU R, ZHOU M, WANG P. Sympathetic excitotoxicity in sepsis: pro-inflammatory priming of macrophages by norepinephrine. **Front Biosci**, **10**: 2217-29, 2005.
- MILLER LE, JÜSTEN HP, SCHÖLMERICH J, STRAUB RH. The loss of sympathetic nerve fibers in the synovial tissue of patients with rheumatoid arthritis is accompanied by increased norepinephrine release from synovial macrophages. **FASEB J**, **14**: 2097-2107, 2000.
- MITCHELL JA, KOHLHAAS KL, MATSUMOTO T, POLLOCK JS, FÖRSTERMANN U, WARNER TD, SCHMIDT HHHW, MURAD F. Induction of NADPH-Dependent

- Diaphorase and Nitric Oxide Synthase Activity in Aortic Smooth Muscle and Cultured Macrophages. **Molecular Pharmacology**, **41**:1163-1168, 1992.
- MOON SK, CHA BY, KIM CH. ERK1/2 mediates TNF-alpha-induced matrix metalloproteinase-9 expression in human vascular smooth muscle cells via the regulation of NF-kappaB and AP-1: Involvement of the ras dependent pathway. **J Cell Physiol**, **198**: 417-427, 2004.
- MOOREN FC, BLOMING D, LECHTERMANN A, LERCH MM, VOLKER K. Lymphocyte apoptosis after exhaustive and moderate exercise. **J. Appl. Physiol**, **10**:1152-63, 2002.
- MUTHU K, DENG J, GAMELLI R, SHANKAR R, JONES SB. Adrenergic modulation of cytokine release in bone marrow progenitor-derived macrophage following polymicrobial sepsis. **J Neuroimmunol**, **158**:50-57, 2005.
- NAITO H, POWERS SK, DEMIREL HA AOKI J. Exercise training increases heat shock protein in skeletal muscles of old rats. **Med Sci Sports Exerc**, **33**:729-734, 2001.
- NATALE RB. Adjuvant and neoadjuvant chemotherapy for invasive bladder cancer. **Curr Oncol Rep**, **2**:386-93, 2000.
- NEWMAN SL, MIKUS LK. Deposition of C3b and iC3b onto particulate activators of the human complement system: quantitation with monoclonal antibodies to human C3. **J. Exp. Med.** **161**:1414, 1985.
- NISS AM, DICKHUTH H-H, NORTHOFF H. Free radicals and oxidative stress in exercise-immunological aspects. **Exerc Immunol Rev**, **5**:22-26. 1999.
- OHKAWA S, OHISHI K, YONEYAMA T, HISHIDA A, KUMAGAI H. The effect of eliminating interfering substances by solid-phase extraction and sample-pH adjustment in the colorimetric assay of urinary nitrite and nitrate. **Anal Biochem**, **258**:379-381.
- OLIVEIRA JUNIOR, LP. A indução da síntese de proteínas de choque térmico (hsp) mediada pelo óxido nítrico em resposta ao exercício de resistência. **Tese de Doutorado**. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, UFRGS. Porto Alegre, 2005. 111pp.

- ORTEGA E FORNER MA, BARRIGA C. Exercise-induced stimulation of murine macrophage chemotaxis: role of corticosterone and prolactin as mediators. **J Physiol (Lond)**, **498**:729-734, 1997.
- OSTROWSKI K, ROHDE T, ASP S, SCHJERLING P, PEDERSEN BK. Pro and anti-inflammatory cytokine balance in strenuous exercise in humans. **J Physiol**, **15**: 287-91, 1999.
- OTTON R, DE MELO FEP, ALBA-LOUREIRO TC, SAMPAIO SC. Obtenção de células do sangue Periférico. In: CURI R, PERES CM ED. Como cultivar células. Guanabara Koogan, São Paulo, 114-121, 2005.
- PARHAM P. **Elementos do Sistema Imune e seu Papel**. In: PARHAM P Ed. O sistema Imune, Artmed Editora, Porto Alegre, 2001.
- PARKIN J, COHEN B. An overview of the immune system. **Lancet**, **357**:1777-89, 2001.
- PEAKMAN M, VERGANI D. **Anatomia e células do sistema imune**. In: Peakman M, VERGANI D, Ed, Imunologia Básica e clínica, 1ª ed, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 3-10, 1999.
- PEDERSEN BK, HOFFMAN-GOETZ L. Exercise and the immune system regulation, integration and adaptation. **Physiol Rev**, **180**:1055-81, 2000.
- PEDERSEN BK, WOODS JA, NIEMAN DC, Exercise-induced immune changes – an influence on metabolism? **Trends Immunol**, **22**: 473-475, 2001.
- PEDERSEN BK. Exercise and cytokines. **Immunol Cell Biol**, **78**:532-535, 2000.
- PEIJIE C, HONGWU L, FENGPENG X, JIE R, JIE Z. Heavy load exercise induced dysfunction of immunity and neuroendocrine responses in rats. **Life Sci**, **72**:2255-2262, 2003.
- PERJIE C, HONGWI L, FENGPENG X, JIE R, JIE Z. Heavy load exercise induced dysfunction of immunity and neuroendocrine responses in rats. **Life Sciences**, **72**:20-4, 2003.
- PETERSEN AM, PEDERSEN BK. The anti-inflammatory effect of exercise. **J Appl Physiol**, **98**:1154-1162, 2005.

- PICK E., MIZEL D. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using automatic enzyme immunoassay reader. **J Immunol Methods**, **46**:211-226, 1981
- POCKELEY AG. Heat Shock Proteins as regulators of the immune response. **Lancet**, **362**: 469-476, 2003.
- POWERS SK, HOWLEY ET. Regulação da Temperatura. In: POWERS SK, HOWLEY ET, (Ed.) **Fisiologia do exercício**: Teoria e aplicação do condicionamento e do desempenho, 3ª ed, Manole, São Paulo, 112-18, 2000.
- POWERS SK, LENNON SL. Analysis of cellular responses to free radicals: focus on exercise and skeletal muscle. **Cop Nutr Soc**, **58**:1-12, 1999.
- PRIOR BM, LLOYD PG, REN J, YANG HT, LANGHLIN MH, TERJUNG RL. Arteriogenesis: role of nitric oxide. **Endothelium**, **10**:207-16, 2003.
- QUINDRY JC, STONE WL, KING J, BROEDER CE. The effects of Acute Exercise on Neutrophils and plasma oxidative stress. **Med Sci Sports Exerc**, **35**:1139-45, 2003.
- RADEGRAN G, HELLSTEN Y. Adenosine and nitric oxide in exercise-induced human skeletal muscle vasodilatation. **Acta Physiol Scand**, **168**:575-91, 2000.
- RAHAT MA, MAROM B, BITTERMAN H, WEISS-CEREM L, KINARTY A, LAHAT N. Hypoxia reduces the output of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) in monocytes by inhibiting its secretion and elevating membranous association. **J Leukoc Biol**. 2006 publicado online em 24 de Janeiro de 2006; DOI:10.1189/jlb.0605302
- RITOSSA F. A new puffing pattern induced by temperature shock and DNP in *Drosophila*. **Experientia**, **13**: 571-573. 1962.
- RUSSO M., The role of macrophages in the chemotactic response of polymorphonuclear Leukocytes to lipopolysaccharides. **Proc Soc Exp Biol Med**, **164**:326-330, 1980.
- SALO DC, DONOVAN CM, DAVIES KJ. HSP70 and other possible heat shock or oxidative stress proteins are induced in skeletal muscle, heart, and liver during exercise. **Free Rad Biol Med**, **11**:239-246, 1991.

- SANGUEDOLCE MV, CAPO C, BONGRAND P, MEGE JL. Zymosan-stimulated tumor necrosis factor- α production by human monocytes: down-modulation by phorbol ester. **J. Immunol.** **148**:2229, 1992.
- SANTORO MG. Heat Shock Factors and the control of the stress response. **Biochem Pharmacol**, **59**:55-63, 2000.
- SCHMIDECK WR, HOSHINO K, SCHMIDECK M, TIMO-IARIA C. Influence of environmental temperature on the sleep-wakefulness cycle in the rat. **Physiol Behav**, **8**:363-371, 1972.
- SCHNEIDER CD, OLIVEIRA AR. Radicais livres de oxigênio e Exercício? Mecanismos de formação e adaptação ao Exercício Físico. **Revista Bras Med Esporte**, **10**, 2004
- SIGNORINI JL, SIGNORINI SL. Atividade física e radicais livres. Aspectos biológicos, químicos, fisiopatológicos e preventivos. São Paulo, **Cone**, **2**:1-5, 1993.
- SIGOLA LB, ZINYAMA RB. Adrenaline inhibits macrophage nitric oxide production through β 1 and β 2 adrenergic receptors. **Immunology** **100**: 359-363, 2000.
- SILVERSTEIN AM. **A history of immunology**. Academic Press, SAN DIEGO, 1989
- SINGH MP, SINGH G, SINGH SM. Role of host's antitumor immunity in exercise-dependent regression of murine T-cell lymphoma. **Comp. Immunol Microbiol Infect Dis**, **28**:231-48, 2005.
- SIU PM, BRYNER RW, MARTYN JR. ALWAY SE. Apoptotic adaptations from exercise training in skeletal and cardiac muscles. **FASEB J**, **18**:1150-2, 2004.
- SPEIDL WS, TOLLER WG, KAUN C, WEISS TW, PFAFFENBERGER S, KASTL SP, FURNKRANZ A, MAURER G, HUBER K, METZLER H, WOJTA J. Catecholamines potentiate LPS – induced expression of MMP-1 and MMP-9 in human monocytes and in the human monocytic cell line U937: possible implications for peri-operative plaque instability. **FASEB J**, DOI 10.1096/fj.03-0454fje; acessado em 26-01-2006; no prelo desde 2005.

- SUGIURA H, NISHIDA H, SUGIURA H, MIRBOD SM. Immunomodulatory action of chronic exercise on macrophage and lymphocyte cytokine production in mice. *Acta Physiol Scand*, **174**:247-256, 2002.
- SUGIURA H, SUGIURA H, NISHIDA H, INABA R, MIRBOD SM, IWATA H. Effects of different durations of exercise on macrophage functions in mice. *J Appl Physiol*, **90**:789-794, 2001.
- TIDBALL JG. Interactions between muscle and the immune system during modified musculoskeletal loading. *Clin Orthop Relat Res*, **403**:100-109, 2002.
- URSO ML, CLARKSON PM. Oxidative stress, exercise and antioxidant supplementation. *Toxicology*, **189**:41-54, 2003.
- VANCINI RL, BARBOSA DE LIRA CA, ABOULAFIA J, NOVAILHETAS ULA. Radical Livre, Estresse Oxidativo e Exercício Físico, **UNIFESP**, 1-10, 2005.
- VESELY MJJ, EXON JE, CLARK JE, FORESTI CJ, GREEN E, MOTTERLIM R. Heme oxygenase-1 induction in skeletal muscle cells: hemin and sodium nitroprusside are regulators in vitro. *Am J Physiol*, **275**:1087-94, 1998.
- VIDER J, LEHTMAA J, KULLISAAR T, VIHALEM T, ZILMER K, KAIRANE C. Acute immune response in respect to exercise-induced oxidative stress. *Pathophysiology*, **7**:263-270, 2001.
- WALTER RJ, BERLIN RD, JR, PFEIFFER R, OLIVER JM. Polarization of endocytosis and receptor topography on cultured macrophages. *J. Cell Biol.*, **86**:199-211, 1980.
- WILMORE JH, COSTILL DJ. **Adaptações metabólicas do treinamento**. In:___ WILMORE JH, COSTILL DJ Ed, *Fisiologia do Exercício e do Esporte*, São Paulo, Manole, 184-204, 1999.
- WILMORE JH, COSTILL DJ. **Regulação Hormonal do Exercício**. In:___ WILMORE JH, COSTILL DJ Ed, *Fisiologia do Exercício e do Esporte*, São Paulo, Manole, 184-204, 1999.
- WOODS JA, DAVIS JM, MAYER EP, GHAFFAR A, PATE RR. Exercise increases inflammatory macrophage antitumor cytotoxicity. *J Appl Physiol*, **75**: 879-86, 1993.

WOODS JA, LU Q CEDDIA MA, LOWDER T. Exercise-induced modulation of macrophage function. **Immunol Cell Biol**, **78**: 545-553, 2000.

ZINYAMA RB, BANCROFT GJ, SIGOLA LB. Adrenaline suppressions of the macrophage nitric oxide response to lipopolysaccharide is associated with differential regulation of tumour necrosis factor - α and interleukin-10. **Immunology**, **104**: 439-446, 2001.

ZOPPI CC, ANTUNES-NETO J, CASTANHO FO, GOULART LF, MOTTA MN, VAZ DE MACEDO D. Alterações em biomarcadores de estresse oxidativo, defesa antioxidante e lesão muscular em jogadores de futebol durante uma temporada competitiva. **Rev Paul Educ Fis**, **17**:119-130, 2003.

ANEXOS

ANEXO I: Tampões e Meios Utilizados

• PBS

	Concentração (mM)	1 litro
NaCl		136,88,000 g
KCl		2,7200 mg
KH₂PO₄ (anidro)	0,9	120 mg
Na₂HPO₄ (anidro)	6,4	1,710 g
Água destilada (ou MilliQ)	q.s.p 1 litro	

Acertar o pH para 7,4.

Obs.: Pode ser autoclavado. Se forem utilizar antibióticos, adicioná-los depois de autoclavar e à temperatura ambiente (esperar esfriar a solução).

• EARLE`S BALANCED SALT SOLUTION (EBSS)

SOLUÇÃO A

NaCl (FW 58,44)	1,711 M	10,0 g/100 ml
KCl (FW 74,55)	33,54 mM	250 mg/100 ml
Na ₂ HPO ₄ (FW 142,00)	101,27 mM	1,438 g/100 ml
KH ₂ PO ₄ (FW 136,1)	18,37 mM	250 mg/100 ml

SOLUÇÃO B

CaCl ₂ . 2 H ₂ O (FW 147,00)	88,44 mM	1,3 g/100 ml
--	----------	--------------

SOLUÇÃO C

MgCl ₂ . 6 H ₂ O (FW 203,30)	103,30 mM	2,1 g/100 ml
--	-----------	--------------

SOLUÇÃO DE GLICOSE

Glicose anidra (FW 180,20)	56 mM	1,0 g/100 ml
----------------------------	-------	--------------

PREPARAÇÃO

As soluções podem ser mantidas na geladeira e misturadas no momento da preparação da seguinte maneira:

- 8,0 ml de água destilada ou MilliQ ou outro aditivo
- 0,8 ml da solução A
- 0,1 ml da solução B
- 0,1 ml da solução C
- Acertar o pH para 7,4

1,0 ml da solução de glicose

Concentrações FINAIS (mM):

NaCl	136,88
KCl	2,68
Na ₂ HPO ₄	8,10
KH ₂ PO ₄	1,47
CaCl ₂	8,85
MgCl ₂	10,33
Glicose	5,60

• **HANKS` BALANCED SALT SOLUTION (HBSS)**

(não-autoclavável)

Componente	concentração final (mM)	0,5 litro (1 x)	1 litro (1 x)	1 litro (10 x)
NaCl (FW 58,44)	137,0	4 g	8 g	80 g
KCl (74,56)	3,0	112 mg	224 mg	2,24 g
Na ₂ HPO ₄ (FW 142,00)	0,3	21,3 mg	42,6 mg	4,26 g
KH ₂ PO ₄ (FW136,09)	0,5	34 mg	68 mg	680 mg
CaCl ₂ .2H ₂ O (FW 147,02)	1,3	92,5 mg	185,0 mg	1,85 g
MgCl ₂ .6H ₂ O (FW 203,3)	0,8	81 mg	162 mg	1,62 g
Na ₂ SO ₄ (FW 142,04)	0,8	57 mg	114 mg	1,14 g
HEPES (FW 238,3)*	25,0	2,979 g	5,958 g	-
ou				
MOPS (FW 209,3)	25,0	2,616 g	5,233 g	-
Acertar o pH				
Glicose (MW 180,16)	5,6	500 mg	1 g	-

Preparação e observações:

Adicionar, em um béquer, cerca de 95% da quantidade de água necessária para a preparação das soluções 1x (475 ml para meio litro e 950 ml para 1 litro) ou ainda o valor exato da mistura 10x (1 litro, por exemplo). Acrescentar todos os ingredientes, exceto a glicose, e acertar o pH em 7,4 (ou outro valor conveniente, dependendo da utilização) com HCl e/ou NaOH conforme a necessidade. Completar o volume e adicionar a glicose.

As misturas a 1x podem ser congeladas em tubos Falcon de 50 ml

A mistura acima pode ser preparada a 10x e conservada em geladeira bastando adicionar, no momento do uso, **HEPES ou MOPS, diluir, acertar o pH e adicionar a glicose.**

* MOPS funciona na mesma faixa do HEPES podendo ser intercambiados.

Para incubações celulares de curto intervalo de tempo, utilizar SFB a 10% (v/v) ou BSA a 10% (m/v = 100 mg/ml), dependendo da finalidade.

As misturas não são autoclaváveis. Entretanto, havendo necessidade de esterilização, podem ser filtradas em filtro de nitrocelulose de 0,22 μ m ou, ainda, os reagentes podem ser preparados em soluções separadas (mais concentradas) que podem ser autoclavadas e diluídas no momento do uso. O importante é ter em mente que as soluções contendo cálcio e magnésio deve ser preparado separadamente se forem ser autoclavadas, para evitar-se a precipitação de sais de fosfato.

• TEN 10x

(1 litro)

- TRIS 0,5 M 60,55 g acertar o pH para 7,4 com HCl concentrado
- EDTA 50 mM 18,61 g
- NaCl 1,5 M 87,66 g
- Água MilliQ q.s.p 1 litro

• TEN-Tween 1x

(1 litro)

- Diluir o TEN 10x com água MilliQ a 1:10 (100 ml de TEN + 900 ml de água)
- Adicionar 450 μ l de Tween 20 ($\rho_{\text{Tween20}}=1,1$ g/ml) por litro de TEN diluído
- As concentrações finais são:

Tris	50 mM
EDTA	5 mM
NaCl	150 mM
Tween 20	0,05% (w/v)

(1 litro)

- Água MilliQ 500 ml
- Ácido acético glacial 100 ml (final 10% v/v)
- Metanol 400 ml (final 40% v/v)
- Commassie R250 1 g (0,1% w/v)

• Solução de Lise para Eletroforese

(10 ml)

- SDS 100 μ l da solução a 10% (final 0,1% w/v)
- Leupeptina 4 μ l da solução 5 mg/ml em água (final 2 μ g/ml)
- Água MilliQ 9 ml
- Agitar e conservar no freezer (-20°C)

- Adicionar 1 µl de solução de isopropanólica de PMSF 100 mM (concentração final 100 µM) por ml de solução de lise apenas no momento da homogeneização porque o PMSF é muito instável em meio aquoso.
- Quantificar células e estimar a quantidade de proteínas (10⁷ células ~1 mg de proteína) de formar a obter um homogenato a cerca de 2 mg de proteína por ml, que, quando diluído com Sample Buffer a 1:1 fornecerá solução a 1 mg/ml (50 µg/50 µl nos wells).
- **Células:** quebrar o pellet celular e adicionar a quantidade adequada de Solução de Lise. Homogeneizar as células com seringa de insulina (cerca de 10x) e **sonicar**. Centrifugar por 2 min a 15.000 x g e dosar proteína no sobrenadante **em triplicata** na leitora de ELISA. Transferir quantidade conhecida de sobrenadante para um outro Eppendorf e adicionar a mesma quantidade de Sample Buffer. Ferver as amostras por 5 min. Neste ponto, as amostras podem ser congeladas ou submetidas a eletroforese.
- **Tecidos:** homogeneizar os tecidos em Tampão de Lise (adicionando o PMSF na hora) na proporção 2-5 ml/grama de tecido. Centrifugar 2 min a 15.000 x g e dosar proteína no sobrenadante **em triplicata** na leitora de ELISA. Proceder como para as células.

• Tampão de Eletrodo para Eletroforese (Running Buffer 5x – suficiente para 12 corridas)

- Tris (grau eletroforese) 15 g
- Glicina (grau eletroforese) 72 g
- SDS (grau eletroforese) 5 g
- Dissolver os reagentes sob agitação em 1 litro de água MilliQ (o pH final deve ser 8,3). Conservar na geladeira. Aguardar que a temperatura ambiente seja atingida antes de diluir 1:5 (80 ml + 320 de água) no momento da corrida.

• Transfer Buffer

(1 litro)

- Glicina (grau eletroforese) 39 mM 2,9 g
- Tris (grau eletroforese) 48 mM 5,8 g
- SDS (grau eletroforese) 0,037% (w/v) 370 mg
- Metanol 20% (v/v) 200 ml
- Dissolver os reagentes sólidos em cerca de 700 ml de água MilliQ sob agitação e acertar o pH para 8,3 com HCl concentrado
- Adicionar o metanol e completar o volume para 1 litro.

• Sample Buffer

(Laemmli UK, Nature 277:680, 1970)

ANEXOS II: TÉCNICAS USADAS

• ENSAIO DA FAGOCITOSE DE ZIMOSAN OPSONIZADO COM SORO

Princípio

Macrófagos peritoneais, ou macrófagos obtidos a partir de monócitos do sangue circulante, ou ainda neutrófilos são preparados em suspensão, pipetados em placas de poliestireno ou vidro até o momento do experimento ou até aderirem (como no caso de monócitos/macrófagos). Depois, as células são postas em contato com partículas de Zimosan (*Saccharomyces cerevisiae* – Sigma) preparadas e opsonizadas **a fresco** com o **complemento** presente no soro homólogo (em relação às células: soro de rato, soro de camundongo, soro humano, dependendo da origem das células). Embora não seja necessário que o soro seja proveniente do mesmo indivíduo (ou animal), é sempre uma medida facilitadora retirar-se o soro do mesmo doador das células.

Material e reagentes

- Microscópio óptico (1000 X em objetiva de imersão, de preferência)
- Lamínulas circulares ou quadradas de 13x13 mm a 20x20 mm
- Placa de cultura de 6 wells (diâmetro interno 34,6 mm)
- Meio de cultura RPMI 1640 para preparar as células
- SFB (para preparar as células)
- Soro homólogo ao das células para opsonização a fresco (56°C por 30 min inativa o soro por descomplementação – ref. Griffin et al., 1975)
- PBS pH 7,4 (para lavagens e ressuspensões)
- Solução de Hemólise (caso necessário)
- HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) HBSS contendo BSA defatado a 2% (w/v)
- Macrófagos peritoneais (**5x10⁵ células**), monócitos circulantes (**5x10⁵ células**) ou neutrófilos (circulantes ou peritoneais, **2x10⁶ células**) ressuspensos **em HBSS contendo BSA** defatado a 2% (w/v = 20 mg/mL finais em termos de BSA) previamente aquecidos a 37°C em estufa de CO₂.
- Aditivos (prostaglandinas, outros lípidos, NO, HSP, inibidores, controles etc.)

Preparação do Zimosan (sempre a fresco; no dia do experimento)

- **50 mg** de Zimosan são diluídos em 100 mL de PBS (concentração **0,50 mg/mL**);
- Ferver por 30 min (agitando de vez em quando) e lavar 3 vezes (1.000 x g por 15 min ou **15.000 x g por 10 s** no instantâneo das microcentrífugas à temperatura ambiente) reservando os *pellets* (Zimosan) e descartando os sobrenadantes;

- Ressuspender o precipitado final com PBS para uma concentração de 40 X a concentração inicial (**20 mg/mL**), isto é, homogeneizando com **2,5 mL** de PBS para cada **50 mg** iniciais de Zimosan (ou **1 mL** para cada **20 mg** iniciais = **50 µL** para cada **mg** inicial de Zimosan)
- Para efeito de cálculos de quantidade de proteína adicionada, o rendimento é de aproximadamente 1:50 = 1 mg de Zimosan (sólido) para cada 50 mg (sólido) iniciais, ou seja, espera-se obter uma suspensão contendo **1 mg** de proteína de Zimosan em **50 µL** para cada **50 mg** iniciais;
- Se for necessário, diluir ou concentrar e ressuspender com PBS.

Opsonização do Zimosan (sempre a fresco; no dia do experimento)

- Para opsonização com complemento (presente no soro), **0,5 mL** de suspensão de partículas de Zimosan (a 20 mg/mL, acima) são misturados em partes iguais (0,5 mL) com soro homólogo e incubados por 30 min a 37°C em banho-maria com agitação; usar, de preferência soro de um único animal ou um único indivíduo para evitar-se reações imunológicas indesejáveis; **não usar plasma** pois corre-se o risco de coagulação durante o preparo!
- Centrifugar e lavar 3 vezes (1.000 x g por 15 min ou **15.000 x g por 10 s** no instantâneo das microcentrífugas à temperatura ambiente);
- Ressuspender a preparação opsonizada de Zimosan em **5 mL** HBSS contendo BSA defatado a 2% w/v (20 mg/mL finais em termos de BSA);

Ensaio de Fagocitose

MONÓCITOS/MACRÓFAGOS:

- Semear as células em **lamínulas** de vidro para microscópio 20x20 mm colocadas dentro de placas de 6 wells para cultura;
- Pode-se optar por placas de 24 wells (diâmetro 15,2 mm) caso disponha-se de lamínulas de 13x13 mm circulares;
- As células (**5x10⁵** monócitos/macrófagos no total ou 2 mL de suspensão fresca a **2,5 x10⁵** células/mL) devem ser deixadas por **30 min** em estufa incubadora a 37 °C em meio RPMI1640 contendo SFB a 10% (v/v) para aderirem ao vidro;
- Após a adesão dos **macrófagos**, o meio é aspirado e substituído por 1 mL de HBSS pré-aquecido contendo BSA defatada a 2% (w/v) para iniciar o ensaio da fagocitose;
- Para a **fagocitose por monócitos/macrófagos**, adicionar Zimosan opsonizado (pré-aquecido por 10 min a 37°C) num volume equivalente a 10% do volume de meio presente nas placas (por exemplo **200 µL** para **2 mL** de meio contendo BSA defatado) e misturar com o meio que contém as células (pré-aquecidas por 10 min a 37°C) e incubar por **30 min** a 37 °C sob agitação;
- A fagocitose é interrompida colocando-se as placas de cultura (contendo as células) em gelo por 10 min e, depois, contando-se as partículas fagocitadas;
- Contar as células (neutrófilos diretamente; macrófagos sobre as lamínulas de microscópio), ambas em câmara de Neubauer. Adição de violeta cristal/ácido acético 2% (violeta genciana em ácido acético) a 10:1 às amostras de células facilita a contagem;
- A visualização das partículas fagocitadas também é facilitada contando-se as células com objetiva de imersão (1000X): monócitos/macrófagos, cobrindo-se a

lamínula onde estão aderidos com outra lamínula para adicionar-se o óleo; para neutrófilos (que estão diretamente na câmara), cobrir a câmara de Neubauer com lamínula e contar com óleo de imersão;

NEUTRÓFILOS:

- No caso de **neutrófilos**, onde não há necessidade de adesão às placas ou lamínulas (porque as células crescem em suspensão), as células (**2×10^6 no total ou 1 mL a 2×10^6 células/mL**) são semeadas diretamente em HBSS pré-aquecido contendo BSA defatada a 2% (w/v);
- Para a **fagocitose por neutrófilos**, misturar partes iguais de células (pré-aquecidas por 10 min a 37 °C = **1 mL**) com Zimosan opsonizado (pré-aquecido por 10 min a 37 °C = **1 mL**) e incubar por 30 min a 37 °C sob agitação;
- A fagocitose é interrompida colocando-se as placas de cultura (contendo as células) em gelo por 10 minutos e, depois, contando-se as partículas fagocitadas;
- Contar as células (neutrófilos diretamente; macrófagos sobre as lamínulas de microscópio), ambas em câmara de Neubauer. Adição de violeta cristal/ácido acético 2% (violeta genciana em ácido acético) a 10:1 às amostras de células facilita a contagem;
- A visualização das partículas fagocitadas é facilitada contando-se as células com objetiva de imersão (1000X): monócitos/macrófagos, cobrindo-se a lamínula onde estão aderidos com outra lamínula para adicionar-se o óleo; para neutrófilos (que estão diretamente na câmara), cobrir a câmara de Neubauer com lamínula e contar com óleo de imersão;
-
-

CONTAGENS E RESULTADOS:

- Contar de 50 a 100 células;
- Considera-se para fagocitose a presença de **2 ou mais** partículas de Zimosan por célula;
- Os resultados podem ser expressos em **percentagem de células que fagocitam mais que 2 partículas** e/ou computando-se a **média de partículas fagocitadas** pelas células em consideração.
- **APÓS AS CONTAGENS**, as células podem ser extraídas convenientemente para determinação de conteúdos de GSH, GSSG, TBARS e espécies reativas do oxigênio (H_2O_2 , O_2^-) e do nitrogênio (NO, NO_2^- , NO_3^-). Alternativamente, as células podem ser fixadas com glutaraldeído para serem submetidas a microscopia pós-fagocitose.

● Técnica Medida da Produção de Peróxido (por macrófagos diretamente nas microplacas de cultura)

PRINCÍPIO:

Trata-se do clássico método de Pick & Mizel (1981) para determinação da produção de superóxido (pela redução do citocromo c) e peróxido de hidrogênio (pela

oxidação do vermelho de fenol na presença de peroxidase de rabanete, HRP) por macrófagos cultivados/incubados in situ (sem a retirada das células ou dos sobrenadantes). Como o O_2^- e o H_2O_2 vão reagindo com os corantes à medida em que vão sendo produzidos, a presente técnica, apesar de perder em sensibilidade para outros métodos, tem a compensação de medir o acúmulo dos produtos investigados, além de ganhar em facilidade de execução.

Macrófagos e neutrófilos respondem a estímulos de membrana (particularmente os ativadores da PKC) produzindo um “burst” oxidativo, especialmente via NADPH oxidase, que reduz o oxigênio molecular a superóxido.

Reagentes

EARLE`S BALANCED SALT SOLUTION (EBSS)

PMA (= TPA)

- Preparar solução $2 \mu\text{M} = 1,23 \mu\text{g/mL}$ (MW=616,8 g/mol) para usar $10 \mu\text{L}$ em $100 \mu\text{L}$ finais (diluição 1:10, concentração final $200 \text{ nM} = 123 \text{ ng/mL}$). Diluir a partir de soluções-estoque em etanol ou DMSO (normalmente tem-se solução a 1 mg/mL e $100 \mu\text{g/mL}$). **ATENÇÃO:** PMA é um fortíssimo promotor tumorigênico. A exposição continuada ao mesmo leva a vários tipos de câncer!

FENOLSULFOFTALEÍNA

- Preparar solução $560 \mu\text{M}$ (Fenol Vermelho, sal de sódio, Sigma) = **$0,2 \text{ mg/mL}$** em EBSS. Calcular o volume a ser preparado lembrando que todos os wells (do ensaio para peróxido) serão cobertos com $100 \mu\text{L}$ desta solução de *phenol red*.

Solução de PHENOL RED-HRP de ensaio

- Diluir a peroxidase *horeseradish peroxidase* (HRP, Tipo II, sódio, salt-free, Sigma, contendo ~ 190 unidades de purpurogalina/mg de atividade específica) a **19 U/mL diretamente** em solução de fenolsulfoftaleína (acima). Esta solução serão a solução de ensaio utilizada em todos os wells.

NaOH 1 N

- A ser utilizado em todos os wells ($10 \mu\text{L}$ cada) para parar a reação (matar as células) e alcalinizar o meio para um ponto (pH 12,5) onde o Phenol Red deixa de operar como um indicador de pH (é o mesmo utilizado nos meios de cultura de células).

H_2O_2

- A partir de uma solução de peróxido de hidrogênio concentrada (30%) preparar uma curva de calibração para ser utilizada na determinação de peróxido. Ao contrário da redução do citocromo (cuja alteração de comprimento de onda máximo é bem definida), no caso da oxidação do Phenol Red, não é possível deixar as células no pH original (pelo fato de que o corante é indicador de pH) sendo necessário elevar o pH de todos os wells para 12,5. Por causa disso, torna-se necessário um termo de comparação (curva de peróxido).
- Solução de H₂O₂ a 30% = 30 g/100 mL = 300 g/L. sendo MW = 34 g/mol, a solução a **30% = 8,824 M** e cada 1% = 294,1 mM. Como o peróxido decompõe-se mesmo na geladeira e ao abrigo da luz, normalmente a concentração de H₂O₂ nos frascos de peróxido de hidrogênio é menor de 8 M. Muitas vezes, as concentrações giram em torno de 6 M.
- Para saber-se a concentração de H₂O₂ nos frascos-estoque, tomar uma alíquota de **10 µL** da solução concentrada (teoricamente 30%) e diluir em **5 mL** (1:500) de solução Tris (50 mM)/EDTA (0,25 mM) pH 8,0 (que estabiliza o peróxido). Preparar a solução adicionando 60,55 mg de Tris-Base e 0,93 mg de EDTA -Na₂ em 10 mL de água. Acertar o pH com HCl concentrado.
- Medir a absorbância da solução de peróxido diluída 1:500 em Tris-EDTA pH 8,0 utilizando cubeta de quartzo no espectrofotômetro (**240 nm**) com a lâmpada de deutério (UV) previamente ligada e aquecida por pelo menos meia hora (todas as lâmpadas de deutério atuais funcionam assim: se não aquecer, as leituras flutuam). Considerar para os cálculos $\epsilon_{\text{H}_2\text{O}_2}^{240\text{ nm}} = \mathbf{0,0435\text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}}$. Como as cubetas utilizadas têm 1 cm de caminho óptico, basta dividir a absorbância encontrada por 0,0435 que o resultado será a concentração de peróxido na amostra diluída 1:500 em milimolar. Depois, basta multiplicar o resultado por 500 para obter-se a concentração de H₂O₂ no frasco de peróxido a 30%.
- Preparar curva de H₂O₂ de forma a ter-se concentrações de 1 a 50 µM nas placas. 50 µM = 50 nmol/mL = 5 nmol/100 µL. Ou seja, a concentração máxima deverá fornecer 5 nmols no well que, quando diluídos com 100 µL, fornecerá 50 µM. As demais concentrações podem ser obtidas por diluições em série. Assim, preparar solução de H₂O₂ contendo 5 nmols a serem pipetados em 10 µL = 500 nmol/mL = 0,5 µmol/mL = 0,5 mM. Ou seja, deve ser preparada uma solução de peróxido a 0,5 mM a partir da solução-estoque 30%. Efetuar a diluição com Tris-EDTA pH 8,0. Por exemplo, se a solução 30% estiver a 5 M, a diluição deve ser de 1:10.000. É melhor fazer duas diluições em série de 1:100 (10 µL/1 mL) que diluir direto a 1:10.000 (1µL/10 mL).
- Efetuar diluições em série, a partir da solução **0,5 mM** de forma a obter-se:

**CONCENTRAÇÃO
nos wells**

quantidade em 10 µL

- 0,5 mM (sem diluição) = 5 nmols
- 0,4 mM (80 μ L da **0,5 mM** + 20 μ L de Tris-EDTA) = 4 nmols
- 0,3 mM (60 μ L da **0,5 mM** + 40 μ L de Tris-EDTA) = 3 nmols
- 0,2 mM (50 μ L da **0,4 mM** + 50 μ L de Tris-EDTA) = 2 nmols
- 0,1 mM (50 μ L da **0,2 mM** + 50 μ L de Tris-EDTA) = 1 nmol
- 0,05 mM (50 μ L da **0,1 mM** + 50 μ L de Tris-EDTA) = 0,5 nmol
- 0,01 mM (20 μ L da **0,05 mM** + 80 μ L de Tris-EDTA) = 0,1 nmol
- ZERO mM (s ó Tris-EDTA direto na placa) = 0,0 nmol

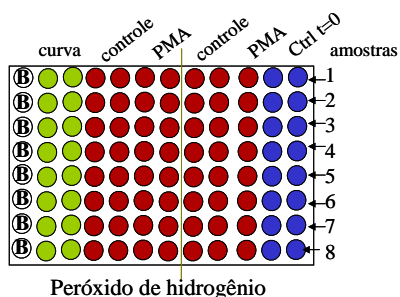
PREPARAÇÃO DAS PLACAS PARA OS ENSAIOS

- Em ambos os casos (O_2^- e H_2O_2), plaquear as células (macrófagos do lavado peritoneal, monócitos circulantes, macrófagos-foam cells) em meio de cultura (RPMI1640 ou DMEM) com 10% de SFB (v/v) e pré-incubá-las a 37°C em atmosfera umidificada contendo 5% de CO_2 em **placas de 96 wells**.
- Na preparação das células, para alcançar-se a quantidade desejada ($2-5 \times 10^5$ células/well), pode-se semear **200 μ L** de uma suspensão de **$1-2,5 \times 10^6$ células/mL** (CONTAR AS CÉLULAS ANTES!).
- Permitir a adesão por cerca de 30-60 min (padronizar e usar sempre o mesmo tempo! Isso é fundamental, especialmente porque a produção de espécies reativas do oxigênio por macrófagos é sempre maior quanto mais no princípio do processo de adesão das células ao fundo das placas).
- Depois desse período, aspirar as células não aderentes e lavar 3 x com EBSS (ou PBS).
- Adicionar os reagentes para as determinações de O_2^- e H_2O_2 .

REAÇÃO PARA PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

- Reservar alguns wells para os blanks da placa (**110 μ L** de EBSS)
- Adicionar 100 μ L de solução de Phenol Red-HRP em todos os wells.
- Adicionar 10 μ L de NaOH 1 N nos controles t=0 (a produção de peróxido é abortada)
- Adicionar 10 μ L de PMA 2 μ M em todos os wells em que se pretende medir a produção de H_2O_2
- Adicionar 10 μ L de EBSS nos controles celulares (sem ativação)
- Pipetar a curva de peróxido de hidrogênio (10 μ L por ponto)

- Incubar as células por 1 h (para o PMA estimular o *burst oxidativo*)
- Depois da incubação, parar a reação com 10 µL de NaOH 1 N em todos os wells (menos nos blanks da placa e nos controles de tempo zero, onde já fora adicionado o NaOH no início)
- Efetuar as leituras a 600 nm.



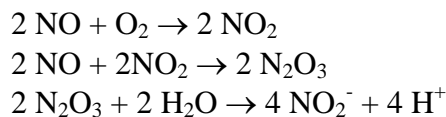
Observações:

1. Es leituras, embora possam e devam ser feitas diretamente nas leitoras de ELISA, podem também ser efetuadas nos sobrenadantes celulares (quando as células forem cultivadas em volumes maiores e em tipos de placas diferentes) usando-se espectrofotômetro. Neste caso, é preferível que os reagentes sejam adicionados às placas para evitar perdas (se os reagentes não estiverem presentes durante a estimulação, o que se lê não é exatamente a produção total, mas um acúmulo observado durante a incubação).
2. A viabilidade celular, após o ensaio do superóxido, pode ser avaliada pela técnica de exclusão do trypan blue: aspira-se o sobrenadante, lavam-se as células e adicionam-se 50 µL de trypan blue em salina.
3. Até a concentração de 5×10^5 células/wells, não há interferência na absorbância a 550 ou 600 nm.
4. O cálculo do peróxido produzido é feito por interpolação dos dados contra a curva-padrão.

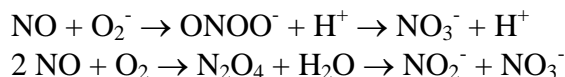
• DETERMINAÇÃO COLORIMÉTRICA DE NITRATOS E NITRITOS EM MICROPLACAS – MÉTODO DA NITRATO REDUTASE/GRIESS

PRINCÍPIO:

Óxido nítrico (NO) é produzido em pequenas quantidades por vários tipos celulares gerando nitratos e nitritos através das seguintes reações:



Outras reações envolvem:



O NO, além de se autooxidar, gerando nitritos (NO_2^-), reage prontamente, na circulação, com oxi-hemoproteínas, gerando nitratos (NO_3^-). Também, NO_2^- reagem estequiometricamente com a oxi-hemoglobina formando NO_3^- . Quantidades significativas de NO_2^- acumulam em fluidos biológicos, como fluido cerebrospinal, fluidos sinoviais, exudatos pleurais, pericárdicos e peritoneais, além de serem produzidos em altas quantidades por células imunológicas ativadas, como macrófagos e neutrófilos. Já na circulação, praticamente todo o NO_2^- gerado a partir do NO é convertido em NO_3^- . Desta forma, as avaliações da produção de NO in vivo podem ser estimadas pela medida de NO_3^- e NO_2^- .

A presente técnica de determinação de nitratos e nitritos baseia-se na redução enzimática de **nitratos a nitritos** na presença de nitrato redutase (EC 1.6.6.2) de *Aspergillus*, NADPH e FAD, e posterior reação dos nitritos formados (ou presentes inicialmente nas amostras) com o reagente de Griess (mistura de sulfanilamida e naftiletilenodiamina, específico para NO_2^-). Entretanto, como o excesso de NADPH utilizado inibe a reação de Griess, é necessário oxidar-se todo o NADPH não utilizado na redução dos nitratos. Isto pode ser obtido pela adição de piruvato e LDH (que fornece lactato que é estável às expensas de NADPH) ou pela adição de ferricianeto de potássio ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$) que oxida o NADPH a 25°C na presença da própria redutase [6,7]. Em nosso laboratório, a incubação das amostras por 45 min com a nitrato redutase pura elimina todo o excesso de NADPH presente (o que pode ser monitorado a 340 nm). Em nossas mãos, a adição de ferricianeto, mesmo diluído 1:10, interfere nos resultados.

PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS:

A preparação das amostras com a diluição adequada é importante para minimizar a interferências de várias substâncias que podem reduzir a taxa de redução de nitratos ou a efetividade da reação de Griess. Por exemplo, fosfatos são ativadores da nitrato redutase dependendo da força iônica do meio de reação [7], mas em concentrações maiores que 50 mM têm efeito inibitório sobre a enzima [8]. Assim, tampão HEPES 50 mM pH 7,4 ou PBS pH 7,4 podem ser usados na homogeneização de tecidos enquanto que a diluição de amostras de urina deve ser feita de 1:20 a 1:50 com tampão fosfato (de sódio ou potássio) pH 7,0. Amostras de plasma ou soro podem ser analisadas diretamente após desproteinização (por ultrafiltração ou precipitação em meio ácido seguida de neutralização por causa da reação da redutase que não pode acontecer em meio ácido).

1. **Amostras de urina:** diluir de 1:20 a 1:50 em tampão fosfato pH 7,0 e utilizar 80 µl da solução diluída incubando por **1 h** à temperatura ambiente (25 °C) ou **30 min** a 37 °C.
2. **Meios de cultura:** meios, como RPMI1640, contêm altas concentrações de nitrato e, portanto, **não podem** ser utilizados em experimentos quando alterações mínimas na produção de NO são esperadas. Utilizar cerca de 40 µl de meio e incubar **2 h** à temperatura ambiente (25 °C) ou **1 h** a 37 °C.
3. **Plasma e soro:** amostras de plasma ou soro devem ser ultrafiltradas em filtros de cut-off de 10 a 30 kDa (Amicon ou Millipore ou Sigma M0911 – PTGC polysulfone membrane – cut-off 10 kDa low-protein binding adsorption for serum and plasma – ultrafree MC filter unit – 400 µl – máx. 5.000 x g). Alternativamente, amostras de soro, plasma ou leite podem ser desproteinizadas pela mistura de 500 µl de amostra com 100 µl de ácido sulfossalicílico a 35% (w/v) que são misturadas (vórtex) e incubadas à temperatura ambiente por 30 min. Depois da incubação as proteínas são precipitadas por centrifugação a 10.000 x g por 15 min a 4 °C. O sobrenadante (200 µl) deve ser neutralizado com 300 µl de tampão NH₄Cl a 5% (w/v) e 60 µl de NaOH 5% (w/v) antes de ser ensaiado para nitratos e nitritos [1]. Nos ensaios usar, no máximo, **40 µl** de plasma ou soro e incubar as amostras por **3 h** à temperatura ambiente (25 °C) ou **1 h 30 min** a 37 °C. **Heparina** usada como anticoagulante pode desenvolver precipitado com o reagente de Griess e deve ser evitada. Para plasmas, usar, então, **citrato** ou **EDTA** como anticoagulantes. Se for utilizado **soro**, o sangue pode ser coletado sem anticoagulante e deixado coagular por 30 min à temperatura ambiente. Depois, as amostras devem ser centrifugadas a 1000 x g a 4 °C por 10 min. Amostras de urina e soro podem, então, ser estocadas a -70 °C até serem analisadas. Depois de descongeladas, plasmas, soros e amostras de urina devem ser centrifugadas a 16.000 x g por 5 min antes de serem ultrafiltradas e processadas para nitratos e nitritos [3].
4. **Homogenatos de tecidos:** homogeneizar as amostras em PBS pH 7,4 (5 a 10 ml/g de tecido) e centrifugar a 10.000 x g por 20 min a 4 °C. Ultracentrifugar o sobrenadante a 100.000 x g por 15 min a 4 °C. Ultrafiltrar em filtros de cut-off de 10 a 30 kDa (Amicon ou Millipore ou Sigma M0911 – PTGC polysulfone membrane – cut-off 10 kDa low-protein binding adsorption for serum and plasma – ultrafree MC filter unit – 400 µl – máx. 5.000 x g).
5. **Interferências:** antioxidantes interferem na reação de cor. Azida, ácido ascórbico, ditioneitol (DTT) e β-mercaptoetanol interferem também na reação de Griess em concentrações tão baixas quanto 100 µM. Aminoácidos contendo grupos tióis interferem. Não interferem os demais aminoácidos, alquilaminas, açúcares e lípidos.

SENSIBILIDADE:

Para nitratos, utilizando-se um máximo de 80 µl, o limite de detecção é de cerca de 2,5 µM. O limite de detecção para o plasma é maior já que são utilizados apenas 40 µl de amostra no máximo. Para ensaio de nitritos apenas (sem a reação de redução com nitrato redutase), onde se pode utilizar até 100 µl de amostra, o limite de detecção é de aproximadamente 2,0 µM. A absorbância das amostras deve ficar em torno de 0,05 e 1,20. Fora desta faixa, as amostras devem ser rediluídas de maneira conveniente para evitar-se erros .

REAGENTES:

(usar apenas água MilliQ nas preparações para evitar contaminações com nitratos e nitritos)

- PBS pH 7,4 – se for para homogeneizar tecidos (estocar em geladeira por até 30 dias)
- TAMPÃO FOSFATO – Tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,4 (estocar em geladeira por até 30 dias): Na₂HPO₄ anidro (FW 141,96 g/mol) = 283,92 mg/100 ml de água MilliQ/NaH₂PO₄ anidro (FW 119,98 g/mol) = 239,96 mg/100 ml de água MilliQ. Misturar as duas soluções de fosfato (que estão a 20 mM) em um béquer acertando o pH até 7,4.
- Ácido fosfórico 5% (v/v) em água = 2,50 ml de ácido fosfórico concentrado + 47,50 ml de água MilliQ
- Reagente de Griess I (SULFA) – Sulfanilamida 1% em ácido fosfórico 5% = 500 mg de sulfanilamida (FW 172,2 g/mol, Sigma S9251) em 50 ml de ácido fosfórico 5% – concentração da solução- estoque = 58,07 mM; concentração final no ensaio = 13,8 mM – conservar em geladeira
- Reagente Griess II (NEDD) – Naftiletlenodiamina diidrocloreto 0,1% em água MilliQ = 50 mg de NEDD (FW 259,2 g/mol, Sigma N9125) em 50 ml de água – concentração da solução-estoque = 3,86 mM; concentração final no ensaio = 0,9 mM – conservar em geladeira
- NADPH – preparar, no dia do ensaio, solução de β-NADPH (FW 833,4 g/mol, Sigma N1630) a 24,15 mM (2,0 mg em 100 µl de água MilliQ); esta solução deve ser diluída 1:11,5 com a solução de FAD, que, posteriormente será usada na proporção de 1:21 no ensaio, perfazendo uma diluição final de 1:241,5 cuja concentração de NADPH é 100 µM no ensaio
- FAD – preparar, no dia do ensaio, solução de FAD (flavina adenina dinucleotídeo, FW 829,5 g/mol, Sigma F6625) a 1,206 mM (1,0 mg em 1 ml de água MilliQ ou 500 µg em 500 µl de água); esta solução deve ser diluída 1:11,5 com a solução de NADPH, que, posteriormente será usada na proporção de 1:21 no ensaio, perfazendo uma diluição final de 1:241,5 cuja concentração de FAD é 5 µM no ensaio
- MISTURA DE COFADORES – A mistura é preparada apenas no momento do ensaio pela adição de 10 µl de NADPH 24,15 mM, 10 µl de FAD 1,206 mM e 95 µl de TAMPÃO FOSFATO. As concentrações dos cofadores na mistura são: 0,105 mM de FAD e 2,100 mM de NADPH. Dependendo das quantidades utilizadas, os volumes podem ser multiplicados mantendo-se a proporção: 100 µl de NADPH + 100 µl de FAD + 950 µl de TAMPÃO FOSFATO. Considerando-se que existem curvas e blanks a serem corridos juntamente com as amostras, os volumes estimados serão: 400 µl para 10 amostras, 600 µl para 20 amostras, 800 µl para 30 amostras e 1 ml para 40 amostras (o que preenche totalmente uma placa de 96 wells contando com as curvas)
- NITRATO REDUTASE – Dissolver todo o conteúdo (aproximadamente 10 U) de um frasco de Nitrato Redutase de *Aspergillus* (Sigma N7265) em 2 ml de água MilliQ de maneira a obter-se uma suspensão a 5 U/ml. Deixar a enzima reativar a 23°C por 30 min antes de utilizá-la [3]. No momento dos ensaios, diluir a enzima 1:5 com TAMPÃO FOSFATO de forma a obter-se uma solução de 1 U/ml (80 µl da enzima a 5 U/ml para 400 µl finais: adicionar 320 µl de TAMPÃO FOSFATO). Essa quantidade é suficiente para 10 amostras e as curvas correspondentes. Para outros volumes, seguir a

mesma proporção: 600 µl (120 µl de enzima + 480 µl de TAMPÃO FOSFATO) para 20 amostras, 800 µl (160 µl de enzima + 640 µl de TAMPÃO FOSFATO) para 30 amostras e 1 ml (200 µl de enzima + 800 µl de TAMPÃO FOSFATO) para 40 amostras (o que preenche totalmente uma placa de 96 wells contando com as curvas). Como são adicionados sempre 10 µl de enzima diluída para um total de 100 µl de ensaio (antes da adição dos reagentes de Griess), a diluição da enzima é 1:10 e sua concentração final fica 0,1 U/ml nos wells. Trabalhando-se sem a adição de FAD, temos utilizado a enzima sem diluir, até porque isso parece facilitar o consumo do excesso de NADPH que interfere no ensaio de Griess.

- **CASO SEJA NECESSÁRIO, Ferricianeto de Potássio** – $K_3[Fe(CN)_6]$ 21 mM (FW 329,2 g/mol) = 6,9 mg em 1 ml de água MilliQ, concentração final no ensaio = 1 mM

REAÇÃO:

1. Pipetar 200 µl de TAMPÃO FOSFATO nos wells que constituirão os blanks da leitora (nada mais será pipetado nestes wells).
2. Pipetar as curvas em duplicatas (80 µl por well) conforme esquema abaixo.
3. Pipetar até 80 µl de amostras (plasma, no máximo 40 µl) e completar o volume adequadamente para 80 µl finais com TAMPÃO FOSFATO.
4. Adicionar 10 µl da MISTURA DE COFADORES (curvas e amostras desconhecidas) SE AS LEITURAS FOREM DESTINADAS À DETERMINAÇÃO DE NITRATOS OU NO_x TOTAIS. SE AS AMOSTRAS FOREM DESTINADAS APENAS À DETERMINAÇÃO DE NITRITOS, PASSAR DIRETO PARA O ITEM 11.
5. Adicionar 10 µl da Nitrato redutase 1 U/ml (ou 5 U/ml se não for adicionado FAD) em TAMPÃO FOSFATO (curvas e amostras desconhecidas).
6. Incubar **à temperatura ambiente** por **1 hora**, se as amostras forem de urina, **2 horas**, se as amostras forem de meios de cultura ou exsudatos, ou **3 horas**, se as amostras forem de plasma, soro, leite ou homogenatos teciduais ou ainda
7. Incubar a $37^\circ C$ por **30 min**, se as amostras forem de urina, **1 hora**, se as amostras forem de meios de cultura ou exsudatos, ou **1 hora e meia**, se as amostras forem de plasma, soro, leite ou homogenatos teciduais.
8. **NÃO É NECESSÁRIO AGITAÇÃO DURANTE AS INCUBAÇÕES COM A REDUTASE.**
9. Caso seja julgado necessário, adicionar 10 µl de Ferricianeto de potássio 21 mM para consumir o excesso de NADPH (curvas e amostras desconhecidas). Neste caso, incubar as placas por 10 min a $25^\circ C$ para permitir a ação da redutase sobre o ferricianeto [5]
- 10. Caso não seja utilizado ferricianeto, incubar a $37^\circ C$ por 45 min adicionais.**
11. Pode-se monitorar o consumo de NADPH a 340 nm.
12. Adicionar 50 µl de reagente de Griess I (SULFA) (curvas e amostras desconhecidas).
13. Adicionar 50 µl de reagente de Griess II (NEDD) (curvas e amostras desconhecidas).
14. Agitar e incubar na própria leitora à temperatura ambiente ($25^\circ C$) por **10 min**.

15. Ler em seguida a **540 nm**. Incubações por períodos de tempo maiores que 30 min podem resultar em artefatos. Entretanto, isto não invalida os resultados desde que curvas sejam feitas acompanhando todos os ensaios [4].

CURVAS DE CALIBRAÇÃO

- Padrão de nitrato de sódio (NaNO_3 , FW 84,99): preparar solução 20 mM ou 21 mM e diluir 1:100 (100 μl de solução concentrada para 10 ml de solução final) com água MilliQ para obter-se solução-mãe de 200 μM ou 210 μM . para 20 mM preparar solução contendo 1,700 mg em 1 ml de água MilliQ e diluir 1:100; para 21 mM, preparar solução contendo 1,785 mg em 1 ml de água MilliQ e diluir 1:100.
- Padrão de nitrito de sódio (NaNO_2 , FW 69,00): preparar solução 20 mM ou 21 mM e diluir 1:100 (100 μl de solução concentrada para 10 ml de solução final) com água MilliQ para obter-se solução-mãe de 200 μM ou 210 μM . para 20 mM preparar solução contendo 1,380 mg em 1 ml de água MilliQ e diluir 1:100; para 21 mM, preparar solução contendo 1,449 mg em 1 ml de água MilliQ e diluir 1:100.

WELL	CONCENTRAÇÃO FINAL NO WELL (μM)			
	NITRATO (μl) volume final 210 μl	TAMPÃO FOSFATO (μl)	volume	final 200 μl
A1/A2	0	80	0	0
B1/B2	5	75	5	4,76
C1/C2	10	70	10	9,52
D1/D2	15	65	15	14,29
E1/E2	20	60	20	19,05
F1/F2	25	55	25	23,81
G1/G2	30	50	30	28,57
H1/H2	35	45	35	33,33

A3/A4 = BLANKS COM 200 μl ou 210 μl DE TAMPÃO FOSFATO conforme o caso.

Se o objetivo for medir apenas os nitritos ou correr uma curva de calibração de nitritos em paralelo com a curva de nitratos, pode-se efetuar a seguinte curva sem a necessidade da adição de COFATORES e da ENZIMA. Neste caso o volume de padrão total é de 100 μl (110 μl se houver ferricianeto) e deve ser completado com TAMPÃO FOSFATO OU ÁGUA MILLIQ caso os volumes utilizados sejam menores que 100 μl (ou 110 μl).

ÁGUA MilliQ OU NO WELL (μM)	CONCENTRAÇÃO FINAL
---	--------------------

WELL	NITRITO (μl) volume final 210 μl	TAMPÃO FOSFATO (μl)	volume final	200 μl
A1/A2	0	100	0	0
B1/B2	5	95	5	4,76
C1/C2	10	90	10	9,52
D1/D2	15	85	15	14,29
E1/E2	20	80	20	19,05
F1/F2	25	75	25	23,81
G1/G2	30	70	30	28,57
H1/H2	35	65	35	33,33

A3/A4 = BLANKS COM 200 μl ou 210 μl DE TAMPÃO FOSFATO conforme o caso.

Valores de referência [5]:

Fluido biológico	NO_3^- (μM)	NO_2^- (μM)
Urina	250-2000	ND
Saliva	200-600	30-210
Plasma	15-60	ND
Suco gástrico	50-85	0,40-60,00
Leite	20-30	ND

ND= não determinado neste estudo

Obs.: os valores de concentração de nitritos mais elevados neste estudo representam amostras de indivíduos com patologias gástricas.

Meio de cultura RPMI1640 contém cerca de 2-3 μM de nitritos. Tratamento de amostras *in vitro* com L-NAME ou L-NMMA (250 μM) provoca uma inibição de 100% na produção de NO_x via NO sintase induzível em macrófagos. Tratamento de macrófagos com: LPS, aumenta nitritos e reduz peróxido de hidrogênio; com $\text{IFN}\gamma$, reduz nitritos e aumenta peróxido de hidrogênio; com LPS e $\text{IFN}\gamma$, aumenta muito nitritos e reduz peróxido de hidrogênio [2].

Cálculos:

Na leitora de microplacas, programar o cálculo automático, com base nas curvas de calibração. Alternativamente, pode-se traçar curvas com auxílio de calculadora ou do Excel. Para tecidos, a quantidade de NO_x nas amostras, após homogeneização e dosagem, é dada por:

$$\text{NO}_x \text{ (nmol/g de tecido)} = \frac{\text{concentração } (\mu\text{M}) \times [\text{volume do homogenato (ml)} + 0,7 \times \text{peso (g)}]}{\text{peso do tecido (g)}}$$

• EXPRESSÃO DE HSP70 E ANÁLISE POR SDS-PAGE E Western blotting

Para análise da expressão de HSP &) os leucócitos serão coletados pela técnica de Percoll citada anteriormente, após 6 horas do término do exercício físico. Para cada amostra preparada, quantidades iguais de proteínas (cerca de 30µg, determinada pelo método de Bradford, abaixo) serão separadas durante 4 horas (a 15 mA/ gel) à temperatura ambiente (25°C) por eletroforese em gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE). Será utilizado sistema vertical Slab Gel BIO_RAD Mini-Protean II (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA,USA) e tampão de corrida constituído de Tris a 25 mM, glicina a 192 mM e SDS a 1% (m/v), pH 8,3 usando-se 1cm de gel de empilhamento(entrada) a 4% (m/v) e gel de separação a 10% (m/v) em termos de monômero de acrilamida, para corridas em géis de 10 cm em tampão de amostra redutor constituído de Tris-HCL 62,5 mM pH 6,8, glicerol a 10% (v/v), SDS a 2% (v/v) e β-mercaptoetanol a 5%, conforme descrito em Santoro et all (1989). Como marcador de peso molecular será utilizado a mistura de padrões de pesos moleculares previamente coloridos (BIO_RAD Kaleidoscope Polypeptide Standards) com as seguintes proteínas: miosina (200 kDa), fosforilase b (92,5 kDa), BSA (69kDa), ovalbumina(46kDa), anidrase carbônica (30kDa) e lisosina (14kDa). Depois das corridas os géis serão destacados das placas de suporte, tendo os géis de separação sido removidos.

Após as corridas os géis serão corados e fixados sob agitação contínua com solução de Azul Comassie Brilhante 0,1% (m/v), metanol 40% (v/v), ácido acético 10%(v/v) durante 20 min e submetidos a descoloração com agitação por cerca de 2 horas em solução de ácido acético glacial a 5% (v/v) até que fossem evidenciados os padrões de peso molecular (ainda fortemente corados contra o fundo parcialmente descorados dos géis). Os géis serão então, transferidos para filtro de papel Whatman 3 MM, envoltos em película de PVC e secos a 80°C por 2 horas em secador de géis BIO_RAD Gel Dryer a vácuo programável. Depois de secos, os géis corados serão submetidos a densitometria no equipamento (Amerham Pharmacia Biotec) Vídeo Documentation System de aquisição digital e processamento de imagens.

As amostras contidas em géis destinados a processamento por Western blotting, como descrito em Elia & Santoro (1994) serão transferidos diretamente para membrana de nitrocelulose (Millipore) em sistema refrigerado BIO_RAD Blot Cell a 70 V até um total de 150 V X h. Após a transferência, as bandas, contendo proteínas serão evidenciadas pela coloração com vermelho Ponceau, sal de sódio (Sigma) a 0,3% (m/v) em solução TCA a 3%. Após a verificação, as membranas serão descoradas em tampão TEM (Tris 50 mM pH 7,4 EDTA 5 mM, NaCl 150 mM) Antes do “immunoblotting”, os filtros de nitrocelulose serão hibridizados comBSA a 1% (m/v) em água a fim de recobrirem-se as porções da membrana onde não houve transferência de proteínas, promovendo-se então bloqueio de

ligação inespecífica de anticorpos ao filtro. Para o Western blotting das HSP70, as membranas serão incubadas à temperatura ambiente durante 18 h sob agitação enérgica em tampão TEM-Tween 20 a 0,05% (v/v) na presença de anticorpo monoclonal BRM-22 de ascite de camundongo (hibridoma BRM-22) contra HSP&) humana (Amersham), diluído a 1:1000, que reage especificamente com o polipeptídeo de 73 kDa, HSP72 (ou HSP&) induzível). Depois disso, os filtros serão lavados 3 vezes sob agitação por 10 min com 5 ml de TEM-Tween e incubados por 1 h com 5 ml de solução contendo o segundo anticorpo, IgG RPN 1177 (de cabra, contra imunoglobulinas de camundongo, biotilado, Amersham) em TEM-Tween sob agitação. Depois disso, repetiu-se a lavagem dos filtros, como descrito acima e os filtros serão submetidos a reação com o segundo anticorpo de coelho por 1 h adicional. Após a lavagem, as membranas serão submetidas a reação com o revelador 4-CL-Naftol (BIO_RAD) em tampão contendo NaCl 83 mM, Tris-HCl 17 mM, pH 7,4 e H₂O₂ a 0,15%. Imediatamente após o aparecimento das manchas de interesse com boa resolução, os filtros serão retirados do revelador, lavados com água a fim de evitar-se superexposição e submetidos a secagem em estufa por 30 min a 37°C. Conforme a necessidade em cada caso, as manchas serão registradas digitalmente (VDS, Amersham Pharmacia Biotech) e as imagens analisadas para os cálculos posteriores.

CÁLCULO DAS CONCENTRAÇÕES DE PROTEÍNAS NAS AMOSTRAS ANALISADAS

Na determinação de proteínas nas amostras, quando demandado em cada caso, serão utilizados os métodos de Bradford (1976) e de Lowry et al (1951), conforme indicado. Em ambas as determinações, serão utilizadas como padrão de referência, soluções de albumina sérica bovina (BSA) fração V (Sigma). A razão para a escolha de um outro método será a sensibilidade e interferência de certos componentes das preparações a serem analisadas. O método de Bradford, baseado na ligação do Azul Comassie Brillhante G-250 0,01% (m/v) em meio de ácido fosfórico 8,5% (m/v)-etanol 4,7% (m/v) a proteínas das amostras, com formação de complexo que absorve intensamente a 595 nm (BIO_RAD Protein Assay kit, Bio-Rad Laboratories, GmbH, DR), apresenta, na faixa de algumas dezenas de microgramas de proteína ensaiada, sensibilidade um pouco maior que o método de Lowry et al. Este, por sua vez, baseia-se na ligação do reagente de Folin-Ciocalteu a hidroxilas fenólicas presentes em amostras protéicas hidrolisadas previamente em meio alcalino, com formação de complexo cromogênico que pode ser monitorado espectrofotometricamente a 750 nm. Por outro lado, em amostras contendo dodecil-sulfato de sódio (SDS), EDTA, EGTA, sacarose, Triton X-100 e Tris, devido à razoável interferência apresentada, optou-se pela utilização do método de Lowry et al.

• DOSAGEM DE PROTEÍNAS PELO MÉTODO DE BRADFORD EM MICROPLACAS

Princípio: ligação do Commassie Brilliant Blue G250 às proteínas que causa alteração na absorbância máxima de 465 para 595 nm.

Reagentes (quantidades para 1 litro de reagente):

- Etanol a 95% em água MilliQ, 50 ml (47,5 ml de etanol absoluto + 2,5 ml de água)
- Ácido orto-fosfórico a 85% (w/w, que é o ácido fosfórico concentrado), 100 ml

- Commassie Brilliant Blue G250, 100 mg/50 ml de etanol a 95%

Preparação:

- Dissolver o Commassie Blue no etanol 95%
- Misturar a solução Commassie Blue (50 ml) com o ácido fosfórico (100 ml)
- Adicionar 850 ml de água MilliQ em uma proveta de 1 litro
- Adicionar a mistura de Commassie Blue em ácido fosfórico à água
- Misturar o reagente em béquer sob agitação moderada (para não fazer muita espuma)
- Filtrar o reagente em papel de filtro comum (Whatman no.1)
- Estocar em frasco âmbar limpo e lavado com água MilliQ
- Estabelecer curva com padrões de albumina bovina sérica (BSA)
- Guardar o frasco em geladeira (estável por 6 meses)

ENSAIO:

- Em uma microplaca (para leitora de ELISA) pipetar 210 µl de água para os blanks em triplicata
- Pipetar 10 µl da solução cuja concentração protéica deve ser determinada em triplicata
- Pipetar 200 µl do reagente de Bradford por well
- Agitar por 10 s na própria leitora de ELISA
- Efetuar leitura a **595 nm** à temperatura ambiente de 2 min a 20 min após a reação

OU

- Em uma microplaca (para leitora de ELISA) pipetar 220 µl de água para os blanks em triplicata
- Pipetar 20 µl da solução cuja concentração protéica deve ser determinada em triplicata
- Pipetar 200 µl do reagente de Bradford por well
- Agitar por 10 s na própria leitora de ELISA
- Efetuar leitura a **595 nm** à temperatura ambiente de 2 min a 20 min após a reação

OU AINDA

- Em uma microplaca (para leitora de ELISA) pipetar 110 µl de água para os blanks em triplicata
- Pipetar 10 µl da solução cuja concentração protéica deve ser determinada em triplicata
- Pipetar 100 µl do reagente de Bradford por well
- Agitar por 10 s na própria leitora de ELISA
- Efetuar leitura a **595 nm** à temperatura ambiente de 2 min a 20 min após a reação

Observações:

- As amostras ou padrões devem conter de 0,3 a 10,0 µg de proteína nos 10 µl a serem ensaiados ou 0,6 a 20 µg de proteína em 20 µl (concentrações de 0,1 a 1,0 mg/ml) dependendo da curva utilizada.
- Utilizar **apenas** a faixa linear da curva.
- Caso a absorbância da amostra em questão caia num ponto fora da curva (ou na porção não-linear, de alta concentração), deve ser efetuada nova diluição de maneira a obter-se uma preparação que, com 10 µl ou 20 µl, caia dentro da curva.
- A cor é estável por cerca de 1 h mas é conveniente efetuar-se a leitura em até 20 min após a reação

Interferentes:

- Meios excessivamente alcalinos
- Detergentes presentes na vidraria (Triton X-100, SDS etc.)

Tolerância máxima para interferentes:

- SDS 0,1% w/v e Triton X-100 a 0,1% v/v que devem ser utilizados como brancos a serem descontados no ensaio.

CURVA DE BSA: Preparar 2 ml de solução de BSA a 1 mg/ml em água **EXATAMENTE MEDIDOS**. Efetuar diluições em série, em tubos de microcentrífuga limpos, da seguinte maneira:

- 750 µl da solução a 1 mg/ml + 250 µl de água e agitar (vórtex): concentração = 0,750 mg/ml
 - 500 µl da solução a 1 mg/ml + 500 µl de água e agitar (vórtex): concentração = 0,500 mg/ml
 - 500 µl da solução a 0,500 mg/ml + 500 µl de água e agitar (vórtex): concentração = 0,250 mg/ml
 - 500 µl da solução a 0,250 mg/ml + 500 µl de água e agitar (vórtex): concentração = 0,125 mg/ml
 - 500 µl da solução a 0,125 mg/ml + 500 µl de água e agitar (vórtex): concentração = 0,0625 mg/ml
 - 500 µl da solução a 0,0625 mg/ml + 500 µl de água e agitar (vórtex): concentração = 0,03125 mg/ml
 - utilizar o restante da solução a 1 mg/ml para o ponto 1,000 mg/ml
 - utilizar água MilliQ para o ponto 0,000 mg/ml (este não é o blank da leitora de ELISA)
-
- Preparar duas curvas: uma com 10 µl e outra com 20 µl de cada solução-padrão em, no mínimo, triplicatas.
 - Calcular as concentrações exatas das soluções-padrão e colocar estes valores nas curvas. Se o r^2 for menor que 0,9, refazer as curvas.
 - Caso a curva perca linearidade a partir de um certo valor de concentração, calcular a equação da reta utilizando-se apenas os pontos onde existe linearidade.
 - Anotar a equação das retas (que são válidas por seis meses) para 10 e 20 µl no frasco do reagente.
 - Anotar no frasco a absorbância máxima tolerada dentro da faixa de linearidade.
-
- **Observação:** Pode-se determinar o conteúdo protéico em células plaqueadas em microplacas mesmo sem sua remoção adicionando-se o reagente de Bradford diretamente na placa de cultura. Para efeito de cálculos das quantidades de reagentes e/ou diluições a serem efetuados, considere-se que 10^7 células apresentam aproximadamente 1 mg de proteína. Assim, em 110 µL, normalmente usados em placas de 96 wells para leitoras de ELISA, a concentração final será de cerca de 9 mg/mL e vai estourar a curva. Seguindo mesmo raciocínio, 10^6 células apresentam cerca de 0,1 mg e em 110 µL perfazem cerca de 0,9 mg/mL (dentro da faixa de leitura), enquanto que 10^5 células (0,01 mg de proteína, aproximadamente) em 110 µL perfazem cerca de 0,09 mg/mL (no limite inferior da curva). Estando as células em placas de 96 well, o procedimento é direto porque o máximo de células que se consegue plaquear nas mesmas é de cerca de 5×10^5 células. Placas de

24 wells (~10 mm de diâmetro, área = 0,7854 cm²) permitem o plaqueamento de cerca de 10⁶ células aderidas no total. Neste caso também é possível efetuar-se a adição do reagente de Bradford (110 µL) diretamente nos wells. Se as placas forem maiores (e.g. 6 wells, ~35 mm de diâmetro (área = 9,6211 cm²), a quantidade de células em monocamadas também será proporcionalmente maior (em relação às áreas). Neste caso, com cerca 10⁷ (= 10 x 10⁶) células por well na confluência, é possível raspar-se as células em 1 mL de água, sonicá-las e retirar-se uma alíquota de 10 µL para ler na leitora de ELISA da maneira convencional. Na verdade, o conhecimento do número exato de células utilizadas é uma medida mais precisa do que acontece no intracelular quando não são utilizadas subfrações celulares, mas sim células íntegras.

- **DETERMINAÇÃO DE GSH E GSSG EM MICROPLACAS (Baseada em ME Anderson. Methods Enzymol 113: 548 1985).**

Para determinação dos conteúdos intracelulares de glutatona (GSH) e dissulfeto de glutatona (glutatona “oxidada”, GSSG), as células (cerca de 10⁷) serão lavadas duas vezes em PBS (4°) e imediatamente rompidas em 200 µl de ácido metafosfórico 5% (m/v) com homogeneização por micropipeta para análise cinético-espectrofotométrica pelo método de reciclagem com o ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzóico] (= DTNB) e GSSG redutase (GSRd) de Anderson (1985). A rápida homogeneização das células em meio ácido é um passo de extrema importância para a inativação das tiol-transferases e γ -glutamiltanspeptidases responsáveis pela transformação da GSH em outros derivados peptídicos, levando a subestimativas das concentrações reais do tripeptídeo.

Além disso, a acidificação previne a auto-oxidação da GSH que ocorre rapidamente em pH superior a 7,0 (Anderson, 1985; Akerboom & Sies, 1981). Por outro lado apesar da auto-oxidação da GSH em GSSG em meio ácido ocorrer numa taxa mínima (0,1 a 0,2% por hora), pelo fato de as concentrações intracelulares de GSSG serem naturalmente muito baixos (menos de 1% da concentração de GSH), os processamentos das amostras para dosagem de GSSG deve ser efetuado o mais rapidamente possível, a fim de evitar-se resultados falsamente superiores aos valores reais (Akerboom & Sies, 1981). Em preparações celulares frescas (macrófagos, linfócitos e hepatócitos) as células serão submetidas à incubação com o tampão de hemólise para a retirada de eritrócitos, por apresentarem significativa atividade de enzimas relacionada ao metabolismo de GSH, podem interferir nos resultados, mesmo quando em baixa densidade celular.

A primeira parte do ensaio consistiu na determinação do conteúdo de glutatona “total” (GSH + GSSG) medido em equivalentes de GSH pelo método de reciclagem com DTNB que leva à oxidação estequiométrica da GSH em GSSG com formação do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico (TNB) e posterior restituição da GSH pela redução altamente específica com GSSG redutase (GSRd, EC 1.6.4.2) na presença de NADPH. A taxa de formação de TNB, proporcional à soma inicial de GSH e GSSG, será então monitorizada a 412 nm (ϵ TNB = 13,6 mM.cm) Alternativamente, pode-se monitorar a taxa de consumo de NADPH a 340 nm (ϵ NADPH = 6,66 mM . cm) ou fluorimetricamente (excitação a 366 nm/emissão de 400-3000nm). O método empregado é bastante sensível, específico e reproduzível. Contudo , como a velocidade da reação depende não somente da concentração inicial de GSH + GSSG, mas, também, da atividade da GSRd, fatores que interfiram na atividade enzimática, levarão invariavelmente a falsos resultados. Por isso

além de ter sido sempre utilizada a curva de calibração (0,5; 1,0; 2,0; 3,0; e 4,0; nmol) com padrão de GSH precisamente preparado a cada ensaio, serão efetuadas leituras de amostras com adição de padrão, sendo os resultados obtidos idênticos aos observados para amostras separadamente. A incubação será iniciada pela adição de 700µl de NADPH (concentração final 0,17 mM) e 100 µl de DTNB (final 1,26 mM), ambos em tampão fosfato de sódio 143 mM (pH 7,5), a cerca de 25µl de amostra (em MPA 5%) em um volume final 990µl em cubeta de 1cm de caminho óptico a 37° C, tem sido registrada a absorbância a 412 nm em jaqueta termostatzada com aquisição direta e processamento cinético automático (em espectrofotômetro Amersham-Pharmacia Biotec Ultrospec 2000, USA) até a estabilização das leituras (12min). Em seguida, serão adicionados 10µl de GSRd (atividade final na cubeta de 0,5 U/ml) sob agitação e as amostras serão analisadas espectrofotometricamente a 412 nm por cerca de 20 min adicionais.

Antes da determinação do conteúdo de GSSG, alíquotas de 100µl das mesmas amostras ensaiadas para GSH “total” serão retiradas para conjugação da GSH presente com N-etil-maleimida (NEM,Fluka) segundo metodologia descrita em Akerboom & Sies (1981). Serão adicionados, então 35µl de NEM 200mM (concentração final 50 mM) diretamente às amostras dissolvidas em MPA 5%. Depois, a mistura será neutralizada, cuidadosamente sob a agitação, até pH 5,5 pela adição de 20 µl de KOH 2M em tampão de ácido piperazina – N,N'-bis-(etanossulfônico) (= PIPES, Boehringer, pKa= 6,8 a 25°C, faixa de trabalho de 6,1 a 7,5) 0,3 M. A inclusão de PIPES, ou outros agentes tamponantes como MOPS (ácido morfolinopropanossulfônico), previne alcalinização local, durante a neutralização, o que levaria a auto-oxidação da GSH, favorecida em pHs maiores que 7,0. O excesso de NEM, que em concentrações tão baixas quanto 10µM inibe o processo de dosagem da GSSG por reciclagem em até 30% é efetuado por extração com 500µl de acetato de etila 3 vezes, sendo o excesso de solvente evaporado em concentrador SpeedVac e por passagem em corrente de nitrogênio. Posteriormente, cerca de 25µl de amostras são ensaiados pelo método da reciclagem, como descrito para a GSH, exceto que as amostras são inicialmente incubadas com GSRd por 5 min a 37°C, tendo sido monitorada a absorbância a 340nm (consumo de NADPH) até a estabilização. Depois é adicionado o DTNB e as leituras a 412nm (produção de TNB) são acompanhadas espectrofotometricamente conforme descrito acima. A diferença entre os valores obtidos para glutatona “total” e GSSG fornece os valores dos conteúdos de GSH procurados.

• TBA-RS

Introdução

Os radicais livres são continuamente produzidos na fosforilação oxidativa e outros sistemas biológicos, reagindo rapidamente com a maioria das moléculas orgânicas. Estes radicais podem reagir com lipídios de membranas, proteínas, DNA e também glicídios(Meerson,1982). Quando reagem com lipídios de membrana, causam a lipoperoxidação destes através de uma série de reações com conseqüente formação de malondialdeído e outras substâncias que, aquecidos na presença de ácido tiobarbitúrico, formam a base de shif, que pode ser medido a 535 nm (Halliwell& Gutteridge,1995)

Procedimento Experimental

- Centrifugar as amostras;

- Em outro ependorf colocar 250 ul da amostra e 750 ul de TCA, centrifugar esta mistura 3 minutos – 3000 rpm
- Pipetar 500 ul de TBA + 500 ul de mistura em tubos de ensaio;
- Ferver à 100°C por 15 minutos;
- Ler a 535 nm.
- Cálculo:
- Onde:
- C= conc. TBA em nmol/mg prot.
- A= Absorbância da amostra
- $\epsilon = 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$

$$C = \frac{A \times 4}{\text{Prot} \times 0,156}$$

• SEPARAÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES (LINFÓCITOS E MONÓCITOS) DO SANGUE PERIFÉRICO

TÉCNICA DO HISTOPAQUE 1077

Esta técnica baseia-se na separação de mononucleares do sangue periférico ou plasma rico em leucócitos de amostras tratada com anticoagulante (heparina) pela centrifugação em gradiente descontínuo de polissacarose (que se agrega aos eritrócitos e granulócitos precipitando-os durante a centrifugação) na presença de EDTA e diatrizoato de sódio.

Procedimento:

- Adicionar cerca de 3 ml de histopaque em tubos cônicos para centrifugação de 15 ml (Falcon ou Similar);
- Inclinar os tubos cerca de 45° e decantar, sem misturar, a amostra de sangue (3 a 6 ml) sobre a camada de histopaque com o auxílio de um pipetador automático (Pipette-Aid ou similar);
- Centrifugar as amostras imediatamente a 400 X g por 30 min em centrífuga com rotor tipo swinging-bucket à temperatura ambiente;
- Coletar diretamente (sem aspirar o sobrenadante) a camada opaca (contendo mononucleares) da interface entre o plasma (camada superior) e o histopaque (camada média), com o auxílio de uma pipeta Pasteur (de preferência de plástico, para evitar a adesão de monócitos, caso estes sejam as células de interesse) tomando o cuidado de não aspirar a camada inferior (eritrócitos e granulócitos);
- Transferir os mononucleares para outro tubo de 15 ml e diluir o conteúdo com PBS para um volume de cerca de 10 vezes o volume de mononucleares;
- Centrifugar (swinging-bucket) a suspensão a 250 X g por 10 min à temperatura ambiente para precipitar as células. Caso seja necessário maior pureza, descartar o sobrenadante e ressuspender novamente as células em 10 volumes de PBS centrifugando-se a preparação novamente a 250 X g por 10 min (temperatura ambiente). A centrifugação a baixa rotação favorece a exclusão das plaquetas que tendem a ficar no sobrenadante. Caso estas células não venham a comprometer os

experimentos, a lavagem dos mononucleares, após a separação com histopaque, pode ser feita com força de até 1000 X g 10 min uma única vez;

- Caso a remoção das plaquetas seja crítica, a segunda lavagem pode ser feita a 50 X g por 10 min à temperatura ambiente;
- Caso as células de interesse venham a ser os linfócitos, a preparação final (após as lavagens com PBS) deve ser ressuspensa em meio de cultura (RPMI 1640) e incubada por cerca de 1-2 horas a 37°C para promover a adesão dos monócitos. Depois deste período, as garrafas devem ser agitadas e as células presentes no sobrenadante constituem-se essencialmente de linfócitos;
- Caso seja de interesse os monócitos, estes podem ser obtidos a partir da monocamada que se estabelece nas garrafas de cultura após a incubação de 37°C. Entretanto, esta preparação contém uma quantidade razoável de linfócitos (especialmente tipo B) que podem representar até 40% da população de células aderidas às garrafas. Assim, se a questão **pureza dos monócitos** for essencial, deve-se utilizar um dos procedimentos a seguir: separação com Percoll(recomendada) ou utilização de Nycoprep (que pode ser efetuada no lugar da separação por histopaque)
- Obs: as preparações devem ser realizadas à temperatura ambiente até o momento das incubações (ou cultivos) celulares para evitar-se a formação de grumos de leucócitos que se forma a baixas temperaturas.

HISTOPAQUE Pode ser preparado e esterelizado por filtração a partir dos componentes individuais:

Ficoll 400 (Sigma, F4375).....	57g/L
Diatrizoato de sódio (sigma, S4506).....	90 g/L
Citrato de Sódio Tribásico X 2 H ₂ O 13mM.....	3,82 g/L
(pode ser usado EDTA Na ₂ a 0,13% no lugar do citrato.....	1,3 g/L
Água MilliQ.....	q.s.p. 1L

• TÉCNICA DE PERCOLL

Esta técnica baseia-se na separação de monócitos do sangue periférico em duas etapas 1° Separação dos mononucleares pela técnica de histopaque; 2° Separação dos monócitos pela técnica do Percoll (semelhante ao NycoPrep). Baseia-se no mesmo princípio de centrifugação em gradiente descontínuo de Nycodez em solução ligeiramente hipertônica.

Reagentes

- Histopaque (densidade 1,077 g/ml)
- Percoll (Amersham Biosciences, densidade 1,130 g/ml)
- NaCl 1,5 (FW 58,44=8,179 g/L)
- Na₂HPO₄ anidro 9,15 mM (FW 142=1,299g/L)
- NaH₂PO₄ anidro 1,49 mM (FW= 178,8 mg/L)
- Citrato de sódio tribásico biidratado 13mM (FW 294,1= 3,82 g/L)

PREPARAÇÃO

- Percoll Isotônico= 1 parte de NaCl 1,5M + 9 partes de Percoll puro (e.g. 50 ml de NaCl 1,5M + 450 ml de Percoll)
- Gradiente de Percoll= partes iguais (1:1) de Percoll Isotônico + PBS citratado
- A osmolalidade do gradiente é de cerca de 300 mOsm/Kg enquanto que a osmolalidade plasmática é de aproximadamente 285 mOsm/kg e sua densidade é de 1,064 g/ml.

Procedimento

- Adicionar cerca de 3 ml de Histopaque em tubos cônicos de 15 ml (Falcon ou similar)
- Inclinar os tubos cerca de 45° e decantar, sem misturar, a amostra de sangue (de 3 a 6ml) sobre a camada de Histopaque com o auxílio de um pipetador automático (Pipette-Aid ou similar);
- Centrifugar as amostras imediatamente a 400 X g por 35 min em centrífuga com rotor tipo swinging-bucket à temperatura ambiente;
- Coletar diretamente (sem aspirar o sobrenadante) e a camada opaca (contendo os mononucleares) da interface entre o plasma (camada superior) e o Histopaque (camada média), com auxílio de uma pipeta Pasteur (de plástico, para evitar adesão de monócitos) tomando o cuidado de não aspirar a camada inferior (eritrócitos e granulócitos);
- Transferir os mononucleares para outro tubo de 15 ml e diluir o conteúdo com PBS citratado para um volume de cerca de 10 vezes o volume de mononucleares;
- Centrifugar (swinging-bucket) a suspensão a 250 X g por 10 min à temperatura ambiente para precipitar as células. Caso seja necessário maior pureza, descartar o sobrenadante e ressuspender novamente em 10 volumes de PBS citratado centrifugando-se a preparação novamente a 250 X g por 10 min (temperatura ambiente). A centrifugação a baixa rotação favorece a exclusão das plaquetas que tendem a ficar no sobrenadante. Caso estas células não venham a comprometer os experimentos, a lavagem dos mononucleares, após a separação com histopaque, pode ser feita com força de até 1000 X g a 10 min uma única vez;
- Caso a remoção de plaquetas seja crítica, a segunda lavagem pode ser feita a 50 X g por 10 min à temperatura ambiente;
- Ressuspender os mononucleares em cerca de 3-6 ml de PBS citratado e decantar a suspensão sobre o Gradiente de Percoll da mesma forma como realizado para o gradiente de Histopaque;
- Centrifugar os monócitos que se localizam próximos à interface entre o Percoll (camada inferior) e o PBS citratado (camada superior);
- Lavara os monócitos 1 vez com PBS citratado a 500-1000 X g por 10 min e utilizar as células.
- Obs: as preparações devem ser realizadas à temperatura ambiente até o momento das incubações (ou cultivos) celulares para evitar-se a formação de grumos de leucócitos que se forma a baixas temperaturas.