

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA NUCLEAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TÉCNICAS NUCLEARES

EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO NA FUNCIONALIDADE
DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS MURINO
IRRADIADOS *IN VIVO*.
NAYARA DE OLIVEIRA ALVES
ORIENTADOR: PROF. ARNO HEEREN DE OLIVEIRA

AGOSTO - 2006

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ESCOLA DE ENGENHARIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA NUCLEAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TÉCNICAS NUCLEARES

**EFEITOS DO EXERCÍCIO FÍSICO NA FUNCIONALIDADE DE
MACRÓFAGOS PERITONEAIS MURINO IRRADIADOS *IN VIVO***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências e Técnicas Nucleares Como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Nucleares.

Área: Ciências das Radiações

Orientador: Prof. Arno Heeren de Oliveira

Nayara de Oliveira Alves

Belo Horizonte – Minas Gerais

2006

AGRADECIMENTOS

Com toda certeza, o meu primeiro obrigado é para Deus Supremo, que é onipotente e grandioso, e que permitiu que eu fizesse este trabalho, através do apoio da minha família, amigos, colegas e de todas as pessoas que ele colocou no meu caminho para me apoiar.

Ao Professor Arno pelo conhecimento transmitido, além do companheirismo e do elo de amizade que se consolidou durante o período deste trabalho, como também a seus filhos Newton, Fernando e Flávia pela acolhida e pelo carinho.

A professora Jane Lima pelo carinho, paciência, e dedicação ao meu trabalho e por me presentear com sua amizade.

A todos os professores e funcionárias do Departamento de Engenharia Nuclear, por terem contribuído direta e indiretamente para o sucesso do meu trabalho, com palavras de incentivo e compreensão durante esses dois anos de convivência.

Às professoras Lise Labejof e Maria Isabel Severo do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Santa Cruz, por me co-orientarem, de maneira carinhosa e paciente, fazendo-me adquirir o conhecimento de maneira fácil.

A professora Fátima Noronha que abriu as portas do laboratório de Biologia de Microrganismo Intracelulares, com um sorriso contagiante envolvendo-se com o trabalho, colaborando com idéias e principalmente por me apresentar à Miriam Morato Duarte, pessoa dedicada, responsável e companheirona dos fins de semana “no laboratório” e que participou diretamente dos experimentos. Obrigada Miriam!

Ao Professor Clemente e sua esposa Rosário, por toda atenção, apoio incondicional, abrigo, afeto a mim e as minhas filhas.

A Adelaide e ao Batista do Biotério da Faculdade de Farmácia, pelo calor humano nos dias frios.

Enfim, me faltam palavras para agradecer meus pais, esposo e filhas, agradeço com: simplesmente amo vocês!

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO I: Revisão Bibliográfica.....	3
1-Mecanismo de Interação das Radiações com o Tecido Biológico.....	3
-Eficiência Biológica Relativa.....	3
2-Grandezas Dosimétricas.....	4
-Dose Absorvida.....	5
3 - Efeitos Biológicos da Radiação.....	10
-Efeitos Radioquímicos Imediatos.....	12
-Danos Radioinduzidos na Molécula de DNA.....	14
- Características dos Efeitos Biológicos.....	16
4 – Macrófago.....	19
- Funções de Macrófago ativados.....	19
CAPÍTULO II - Material e Métodos.....	26
1- Introdução.....	26
2- Escolha dos Animais.....	26
3- Métodos de Irradiação.....	26
4- Treinamento dos Animais.....	27
5- Protocolo de treinamento.....	27
6- Sacrifício dos Animais.....	28
7- Obtenção de macrófagos peritoneais de camundongos.....	28
8- Avaliação da viabilidade celular.....	29
9- Ensaio de Quimioluminescência.....	30
10- Quantificação da produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos.....	30
11- Reagentes.....	31
CAPÍTULO III – Resultados e Discussão.....	32
1- Avaliação do treinamento moderado em natação.....	32
2-Viabilidade de macrófagos peritoneais submetidos à radiação por cobalto 60.....	33
3- Efeitos da radiação com cobalto 60 na explosão respiratória de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6.....	33
4- Efeitos do treinamento na explosão respiratória de macrófagos peritoneais submetidos à radiação por cobalto 60.....	36
5- Produção de óxido Nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 submetidos a radiação por cobalto 60 e ativados com IFN- γ e LPS.....	38
CONCLUSÃO.....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	42
ANEXO.....	48

LISTA DE ABREVIATURAS:

Bq - Becquerel

C - Coloumb

CAT - Catalase

D - Dose Absorvida

DNA – Ácido desoxirribonucléico

EBR - Eficiência biológica relativa

EF - Exercício Físico

eV - Eletronvolt

Gy - Gray

GPx - Glutathione peroxidase

H - Dose Equivalente

H_E - Dose Equivalente Efetiva

HPA - Hipotalâmica-pituitária-adrenal

H_T - Equivalente de Dose

INF γ - Interferon gama

keV - Quiloelétronvolt

LPS – Lipopolissacarídeo

MeV - Megaeletronvolt

MTT- 3-(4,5-di-metilazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium brometo

NO - *Nitric oxide* (óxido Nítrico)

NOS - Óxido nítrico sintase

PMN – Neutrófilo Polimorfonuclear

PMA - *Phorbol-Myristate-Acetate* (Éster de Forbol)

PBS – Salina tamponada com fosfato

Q - Fator de qualidade

R - Roentgen

rad - Radiation absorbed dose

RPMI – Meio de cultura (Roswell P. Mem. Inst.)

ROIs - Espécies Reativas de Oxigênio

SD – Sedentário

SFB – Soro fetal bovino

SMF - Sistema monocítico fagocitário

SNS - Sistema nervoso simpático

SOD - Superóxido dismutase

Th - T helper

TNF –Fator de necrose tumoral

TLE - Transferência Linear de Energia

Wr - Fator de ponderação

μm - Micrometro

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores para o Fator de Qualidade	7
Tabela 2 – Fator de ponderação para órgãos e tecidos ICPR, 2005).....	8
Tabela 3 – Fator de Ponderação da Radiação (ICPR 60,1991)	10
Tabela 4 – Efeitos da Radioexposição de Corpo Inteiro em Adultos (ICRP 60,1991).....	18
Tabela 5 - Tempo de exaustão inicial e final para os quatro grupos de animais submetidos à EF aquático, com 10 dias e 20 dias.	32

ANEXO

Tabela 1– Média e desvio padrão da leitura de intensidade de Luz (mV) referentes ao gráfico 4A.....	48
Tabela 2 – Média e desvio padrão da leitura de intensidade de Luz (mV) referentes ao gráfico 4B.	49
Tabela 3– Média e desvio padrão da leitura de intensidade de Luz (mV) referentes ao gráfico 5A.....	50
Tabela 4– Média e desvio padrão da leitura de intensidade de Luz (mV) referentes ao gráfico 5B.	51
Tabela 5– Média e desvio padrão da leitura de intensidade de Luz (mV) referentes ao gráfico 6A.....	52
Tabela 6– Média e desvio padrão da leitura de intensidade de Luz (mV) referentes ao gráfico 5B.	53

LISTA DE FIGURAS

Fig. 1- Ação das radiações e seus danos do DNA	15
Figura 2 - Conseqüências da irradiação na molécula do DNA.....	15
Figura 3-Espécies Reativas de oxigênio (VIEIRA, 2003).....	22
Figura 4 – Treino de adaptação com exercício aquático	27
Figura 5 - Exercício aquático de camundongo com um peso na cauda.....	28
Figura 6 - Ensaio calorimétrico de MTT.....	29
Figura 7 - Simulação das explosões respiratórias do oxigênio no meio intracelular.	30
Figura 8 - Produção de ROIs por macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 irradiados com cobalto 60.....	35
Figura 9 - Efeito do exercício físico na explosão respiratória de macrófagos peritoneais submetidos à radiação com cobalto 60.	37
Figura 10 -Efeito do exercício físico na explosão respiratória de macrófagos peritoneais submetidos à radiação com cobalto 60.	38
Figura 11 – Produção de NO por macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 submetidos à radiação por cobalto 60 e ativados com IFN- γ e LPS.	40

RESUMO

Os macrófagos são células do sistema imunes originados da medula óssea e fazem parte da primeira linha de defesa do organismo, atuando no controle antimicrobiano e antitumoral através de múltiplos eventos regulatórios em várias funções. A interação dos macrófagos com outros componentes do sistema imune ocorre na resposta inata e específica. Uma das funções de macrófagos é a fagocítica, por ativação do sistema fagocitário mononuclear. Uma vez internalizadas, as partículas estranhas são digeridas nos lisossomas para posterior apresentação para linfócitos na imunidade específica. A função fagocítica em macrófagos induz uma resposta caracterizada por aumento no consumo de O_2 molecular.

A radiação ionizante causa efeitos no organismo, como a destruição de células pela radiólise da água, através do aumento da explosão respiratória estimulando a formação de radicais livres íon hidrogênio e radical hidroxila que são altamente tóxicos as células. Os efeitos biológicos da radiação podem ser desde a quebra da molécula do DNA até aberrações cromossômicas.

O exercício físico pode aumentar várias funções de macrófagos, incluindo a quimiotaxia, taxa de metabolismo de nitrogênio, a atividade citotóxica e a capacidade fagocítica. Atuando também como agente agressor de células aumentando a formação de radicais do hidrogênio e do oxigênio, porém, por outro lado dispara o aumento na formação de agentes antioxidantes, causando um equilíbrio no estresse oxidativo e reduzindo os prejuízos que estes radicais poderiam causar as células. Constata-se um verdadeiro sistema de interação e comunicação entre os agentes agressores e os macrófagos. Este estudo analisou os efeitos do exercício físico na funcionalidade de macrófagos peritoneais irradiados com radiação gamma com taxas de dose de $2,0Gy.h^{-1}$ e $4,0Gy.h^{-1}$.

Os resultados encontrados mostraram que o exercício físico moderado torna-se necessário na recuperação da função de explosão respiratória de macrófagos murino para taxa de $2,0Gy.h^{-1}$ e que a duração do exercício é fator importante na regulação positiva da função de produção de radicais de oxigênio e nitrogênio, por essas células.

ABSTRACT

Macrophages are cells of the immune system originated in the bone marrow and make part of the first line of defense's organism, acting in the antimicrobial control and antitumoral through multiple events of regulations in several functions. Macrophages interaction with other components of the immune system occurs in the innate and specific answer. One of the macrophages functions is the phagocytic, activation of mononuclear phagocytic system. Once when in the interior, the strange particles are digested in the lysosomes for posterior presentation for lymphocytes in the specific immunity. The phagocytic activity of macrophages induces an answer characterized by increase in the consumption of O₂ molecular.

The ionizing radiation causes effects in the organism, like destruction of cells by water ionizes, through the increase of the respiratory explosion stimulating the free radical ion hydrogen and radical hydroxyl formation that are highly toxic the cells. The biological effects of the radiation can be since the DNA molecule breakage until chromosomal aberrations.

The physical exercise can increase several macrophages functions, including quimiotaxis, nitrogen metabolism rate, cytotoxic activity, and phagocytic capacity. Also acting as cells agent aggressor increasing the formation of radical of the hydrogen and of the oxygen, however, increase formation of anti-oxidizers agents, causing a balance in the oxidative burst and reducing the prejudices that these radical could cause the cells. It is verified an interaction and communication among agents aggressors and the macrophages. This study analyzed the effects of the physical exercise in the macrophages functionality broadcast peritoneal with radiation gamma with dose rates of 2,0Gy.h⁻¹ and 4,0Gy.h⁻¹.

The results showed that the conservative physical exercise becomes necessary in the function recovery of respiratory explosion of murine macrophages for rate of 2,0Gy.h⁻¹ and that the exercise duration is an important factor in the production of radical of oxygen and nitrogen for these cells.

INTRODUÇÃO

O organismo possui uma grande capacidade de reagir e se adaptar a agentes agressores internos e externos, aos quais é submetido. Quando exposto a estímulos agressores, como por exemplo radiações, incluindo as ionizantes e o estresse pelo exercício físico, o organismo pode sofrer danos moleculares que levam até a morte de células devido o aumento de agentes oxidativos. Paralelamente, o organismo aciona seu sistema de defesa que passa a combater esses estímulos agressores (GALLE, 2000).

Nas últimas décadas, vários estudos têm sido realizados na tentativa de melhor compreender os efeitos biológicos da radiação ionizante (RaioX e Gama) em diferentes etapas do metabolismo, proliferação e da morte celular por necrose ou apoptose. Um dos efeitos moleculares provocados pela radiação ionizante é a quebra do DNA, o que leva a formação de novas células com aberrações cromossômicas, como também destrói o tecido. Porém, as células têm uma incrível capacidade de reparar danos, por isto, nem todos os efeitos da radiação são irreversíveis. Em muitos casos, as células são capazes de reparar qualquer dano e funcionarem normalmente (JIMO MIN et al.,2003; LABEJOF, 1998). Dessa forma, cada tipo celular pode ser classificado segundo sua taxa de reprodução, que também indica sua relativa sensibilidade à radiação. Assim, as células sanguíneas como os eritrócitos (glóbulos vermelhos) e os glóbulos brancos incluindo os linfócitos, neutrófilos e macrófagos estão em constante reprodução e são as mais sensíveis. Todavia, a aplicação da radiação é controlada pela ICRP que possui grandezas dosimétricas visando o controle da dose e taxa de dose aplicada em humanos (SCHARBELE e SILVA, 2000). Várias são as células do sistema imunológico que sofrem alterações com a radiação gama e com o exercício físico, dentre elas encontramos os macrófagos, que fazem parte da primeira linha de defesa do organismo, devido a sua grande capacidade secretora e de adaptação a diferentes condições metabólicas (AGRAWAL et al.,2001; FERNANDEZ et al.,1999; MENEGUELLO ,2004; WOODS et al., 2000). Sabe-se que os macrófagos possuem inúmeras funções na resposta imune inata e específica que constituem seus mecanismos microbicidas. Na primeira, são aptos a realizar fagocitose, produzem citocinas que direcionam a imunidade específica e dispara mecanismos microbicidas como a explosão respiratória. Na imunidade específica podem atuar como células processadoras e apresentadoras de antígenos e como célula efetora,

devido ao seu potencial de produção de radicais do nitrogênio (BELOSEVIC, 1988; SEGAL, 1993; ROSEN, 1995).

Tanto a radiação gama quanto o exercício físico (EF) agudo e crônico alteram os mecanismos microbicidas de macrófagos. Esses agentes induzem nessas células o estresse oxidativo, que é consequência do aumento na formação de radicais livres pela radiólise da água e pelo aumento do consumo de oxigênio. Entretanto os macrófagos são as células do sistema imune mais radio-resistentes, por causa da sua relativa diferenciação celular característica e pelo desenvolvimento da função anti-oxidante (LU, 2000; HERNANDEZ,2005; VIEIRA,2003). Uma das formas de reverter ou até mesmo restaurar algumas das funções em macrófagos, é o treinamento aeróbico, pois, o EF moderado ou até intenso, regula as funções dessas células incluindo a produção de radicais de oxigênio e nitrogênio (LEANDRO, 2002; SCHENEIDER,2004; SOUZA JR.,206, VANCINI, 2005; VIEIRA, 2003).

Na tentativa de esclarecer a contribuição do Exercício Físico para minimizar os efeitos da radiação em células do sistema imune inato, investigamos o papel do treinamento físico na funcionalidade de macrófagos de camundongos C57BL/6 irradiados com cobalto 60 ($E=2,25$ MEV) com taxas de dose de $2,0 \text{ Gy.h}^{-1}$ e $4,0 \text{ Gy.h}^{-1}$. Os parâmetros utilizados para avaliação da funcionalidade das células foram: explosão respiratória e produção de óxido nítrico.

Este estudo foi aprovado pelo CETEA (Comitê de Ética) da Universidade Federal de Minas Gerais/ UFMG, protocolo nº 021/2006.

CAPÍTULO I: Revisão Bibliográfica

1-Mecanismo de Interação das Radiações com o Tecido Biológico

-Transferência de Energia

Quando células em cultura são expostas à radiação ionizante, pode ser mostrado para a maioria dos efeitos observados que, existe uma relação entre a quantidade de energia absorvida pela célula e o efeito biológico. Outro fator relevante, tendo em vista os efeitos biológicos é, a “qualidade” da radiação, sendo que efeitos maiores serão produzidos em áreas de ionização mais freqüente, ou seja, que recebeu maior fluxo de energia. A incidência de radiação ionizante densa dará lugar a uma ionização do meio, mais intensa do que a de radiação ionizante esparsa.

Uma vez que, a quantidade de ionização é dependente da energia liberada no meio, então, a qualidade de diferentes tipos de radiação pode ser comparada tomando por base a energia média liberada por unidade de comprimento ao longo do caminho percorrido no meio irradiado. Essa quantidade é denominada Transferência Linear de Energia, ou TLE da radiação, normalmente expressa em $\text{keV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$ e depende de modo complexo, da massa, energia e carga da radiação ionizante. Radiações eletromagnéticas como raios X e gama têm uma probabilidade baixa de interagir com os átomos do meio irradiado e, portanto, liberam sua energia ao longo de uma trajetória relativamente longa. Por outro lado, partículas alfa, prótons, ou mesmo nêutrons (ou seja, partículas pesadas) liberam sua energia ao longo de uma trajetória mais curta, em decorrência da maior probabilidade de colisão com o meio. No caso de valores de TLE altos, ocorrerão, em uma dada área-alvo, muitos eventos de ionização com alta probabilidade de efeitos biológicos danosos, mesmo a baixas doses. Valores baixos de TLE, ao contrário, provocam efeitos pequenos e isolados, de tal forma que o reparo molecular é possível.

-Eficiência Biológica Relativa

A dose absorvida é uma grandeza física que, permanecendo os demais parâmetros iguais, se correlaciona com o efeito biológico. No entanto, quando a qualidade da radiação muda (de raios-X para nêutrons, por exemplo), o efeito biológico causado não é necessariamente o mesmo, ou seja, doses idênticas podem produzir efeitos diferentes em um mesmo tecido ou

órgão. Assim, para caracterizar essa diferença, o conceito de Eficiência Biológica Relativa (EBR), foi introduzido, tendo esta eficiência sido definida como sendo a razão entre a dose de uma radiação de referência, que produz um determinado efeito biológico e a dose da radiação em estudo, necessária para produzir o mesmo efeito.

A eficiência biológica relativa depende não somente da qualidade da radiação como também, do efeito biológico que está sendo observado. Quando o valor da EBR de uma radiação (alfa) é comparado com o de outra radiação (gama) o resultado representa a razão inversa das doses absorvidas que produzem a mesma extensão de um definido efeito biológico. Os fatores de ponderação de dose utilizados em proteção radiológica foram selecionados para refletir a eficiência biológica relativa de cada tipo de radiação em induzir efeitos estocásticos a baixas doses. Esta eficiência, função primordialmente, da qualidade da radiação, expressa em termos de Transferência Linear de Energia. A rigor, a EBR depende, também, de outros fatores como taxa de dose, fracionamento da dose, órgão ou tecido e mesmo da idade da pessoa irradiada (GALLE, 2000).

2-Grandezas Dosimétricas

Historicamente, as grandezas utilizadas para quantificar a radiação ionizante basearam-se no número total de eventos ionizantes ou, ainda, na quantidade total de energia depositada, em uma massa definida de material. Essa abordagem não leva em conta a natureza descontínua do processo de ionização, mas é justificada empiricamente pela observação que essas grandezas podem ser correlacionadas bastante bem com os efeitos biológicos resultantes. A aplicação das recomendações da Comissão Internacional sobre Unidades e Medidas de Radiação requer o conhecimento de uma diversidade de conceitos e grandezas, muita destas que se empregam em outros campos da ciência. Algumas grandezas, no entanto, são unicamente empregadas no campo da proteção radiológica e contêm fatores de ponderação que permitem contemplar diferentes tipos de energia da radiação incidente sobre um corpo, bem como levar em conta a radiosensibilidade relativa dos diferentes tipos de tecidos do organismo (IAEA, 2001).

-Exposição X ou Gama

Em 1928, foi adotado o Roentgen (R) como unidade de Exposição, ou seja, a quantidade de radiação X que produzia uma unidade eletrostática de carga ($3,34 \times 10^{-10}$ C) em um

centímetro cúbico de ar, em condições normais de temperatura e pressão (CNTP)). Como a unidade empregada no Sistema Internacional para Exposição é o Coulomb/quilograma ($C.kg^{-1}$), tem-se que:

$1R=2,58 \times 10^{-4} C.kg^{-1}$. A Exposição, simbolizada por X, é definida como: $X = \Delta Q/\Delta m$, onde Q é a somatória das cargas elétricas dos íons de mesmo sinal (positivos ou negativos) produzidos no ar quando todos os elétrons, gerados pelos fótons incidentes em um dado volume elementar, de massa é m, são completamente parados.

A relação entre atividade (A(t)) e Taxa de Exposição (X), depende de processos de interação da radiação no ar. No entanto, para fontes pontuais emissoras gama, a seguinte aproximação é amplamente aceitável:

$$X = \Gamma A(t).d^{-2} (R/h)$$

Γ - constante específica da radiação gama, expressa em $(R.m^2).(h.Bq)^{-1}$; d - distância entre a fonte e um dado ponto, medida em metros; A - atividade, expressa em Bq e X a taxa de exposição, expressa em $R.h^{-1}$. Pode-se observar que a taxa de exposição é diretamente proporcional à atividade do radioisótopo e inversamente proporcional ao quadrado da distância entre a fonte pontual e o ponto considerado.

-Dose Absorvida

O conceito de Dose Absorvida foi introduzido para representar a energia média depositada pela radiação incidente em um volume elementar de massa expressa por $D= \Delta E \Delta M^{-1}$, onde ΔE é a energia média depositada pela *radiação* em um volume elementar de matéria de massa ΔM . A unidade no sistema internacional é o joule por quilograma ($J.kg^{-1}$), denominado Gray (Gy). Originalmente a unidade adotada era o “rad” (radiation absorbed dose) para expressar uma unidade de “dose absorvida”, ou seja, de energia depositada por unidade de massa, sendo: $1,0 \text{ rad} = 100 \text{ erg/g}$ de material irradiado. Atualmente a unidade de dose absorvida é expressa pelo Gray, sendo que $1,0 \text{ Gy} = 100 \text{ rad}$. É possível relacionar a dose no ar, em Gray com a exposição, em R, desde que se conheça o valor da energia necessária para arrancar um de seus elétrons, cuja carga é sempre igual a $1,610 \times 10^{-19} C$.

- Dose absorvida comprometida

Grandeza expressa por

$$D(\tau) = \int_0^{\tau} \dot{D}(t) dt$$

onde t_0 é o instante em que ocorre a incorporação, $D(\tau)$ é a taxa de *dose absorvida* em um tempo t , e τ é o tempo transcorrido após a incorporação das substâncias radioativas.

Quando não especificado de outra forma, τ tem o valor de 50 anos para adultos e até a idade de 70 anos para a incorporação por crianças.

-Dose Coletiva

É da *dose efetiva* total recebida por uma população ou um grupo de pessoas, definida como o produto do número de indivíduos expostos a uma fonte de radiação ionizante, pelo valor médio da distribuição de *dose efetiva* desses indivíduos. A *dose coletiva* é expressa em Sievert (CNEN, 2005).

-Equivalente de Dose

Para fins de Radioproteção, o Gray demonstrou ser uma unidade satisfatória para medir raios-X, raios gama e elétrons, porque o dano biológico causado por estes tipos de radiação é aproximadamente proporcional à energia depositada. No entanto, esta proporcionalidade não se mantém no caso de partículas mais fortemente ionizantes, como produtos de fissão, partículas alfa, prótons, etc. Assim, foi necessário definir a grandeza (H) como a grandeza equivalente à dose absorvida no corpo humano, modificada de modo a constituir uma avaliação do efeito biológico da radiação, a dose equivalente H é definida como:

$$H = D * Q * N,$$

sendo D é a dose absorvida num ponto de interesse do tecido ou órgão humano e Q é o fator de qualidade da radiação no ponto de interesse sendo Q atribuído a diferentes tipos de radiações (igual a 1 para radiações β , γ , e X e 20 para partículas α) e N é um fator que leva em conta outros fatores que influenciam a dose absorvida (geometria de irradiação, fator de

distribuição do radioisótopo dentro do corpo etc.), sendo 1 para a grande maioria das aplicações. Usando o fator de qualidade Q é possível relacionar os danos da radiação para diferentes partes do corpo e tornar aditivos os efeitos de radiações de naturezas diferentes. O fator de qualidade é função da transferência linear de energia, geralmente expressa em $\text{KeV} \cdot \mu\text{m}^{-1}$, tendo a água como meio de referência. O fator de qualidade é utilizado apenas para aplicações rotineiras de proteção radiológica e não deve ser utilizado para avaliar os efeitos biológicos de exposições acidentais. A Equivalente de Dose (H) foi originalmente expressa em rem (roentgen equivalent man) sendo atualmente utilizada a unidade do Sistema Internacional, Sievert, (Sv), sendo que: $1,0 \text{ Sv} = 1,0 \text{ J} \cdot \text{kg}^{-1}$. Os demais parâmetros que influenciam a dose absorvida, como, por exemplo, a geometria da fonte, o fator de distribuição do radioisótopo no interior do organismo, etc., são expressos por meio de um fator de peso N, que freqüentemente pode ser considerado como unitário. Assim, $1,0 \text{ Sv} = 1,0 \text{ Gy} \times Q$, sendo Q o fator de qualidade que está relacionado com o coeficiente de transferência linear de energia (LET) da radiação na água, este último representando a energia média perdida por colisão em um elemento dl de trajetória onde o (Q) assume valores específicos, conforme mostrado na tabela 1 (SILVA, 1998 e CNEN, 2005).

Tabela 1 – Valores para o Fator de Qualidade

Tipo de Radiação	Fator de Qualidade (Q)
Raios-X, Raios Gama, Elétrons	1,0
Prótons de alta energia	10
Nêutrons de energia desconhecida	20
Partículas Alfa, Produtos de Fissão 20.	20

-Dose Efetiva

Expressa pela relação

$$E = \sum_T w_T \cdot H_T,$$

onde E é a soma das doses equivalentes ponderadas nos diversos órgãos e tecidos, H_T é a dose equivalente no tecido ou órgão e W_T é o *fator de ponderação de órgão ou tecido*. A unidade no sistema internacional é o sievert (Sv).

- Dose efetiva comprometida

Grandeza expressa por

$$E(\tau) = \sum_T w_T H_T(\tau)$$

onde H_r é a *dose equivalente comprometida* no tecido T no período de integração e W_T é o *fator de ponderação de órgão ou tecido*. Quando não especificado de outra forma, tem o valor de 50 anos para adultos e até a idade de 70 anos para a incorporação por crianças (CNEN-2005). A tabela 2 mostra os valores de W_T

Tabela 2 – Fator de ponderação para órgãos e tecidos ICPR, 2005).

ORGÃO/TECIDO	W_T
Gônadas	0,20
Medula óssea	0,12
Cólon	0,12
Estômago	0,12
Pulmão	0,05
Mama	0,05
Fígado	0,05
Esôfago	0,05
Tireóide	0,05
Pele	0,01
Superfície óssea	0,01

-Dose Equivalente

Grandeza expressa por

$$H_T = D_T W_R,$$

onde D_T é *dose absorvida* média no órgão ou tecido humano e W_R é o *fator de ponderação da radiação*. A unidade SI de *dose equivalente* é Sievert (Sv).

-Dose equivalente comprometida

Grandeza expressa por

$$H_T(\tau) = \int_0^{\tau} \dot{H}(t) dt,$$

onde t é o tempo em que ocorre a incorporação, $H(t)$ é a taxa de *dose equivalente* no momento t , e τ é o tempo transcorrido após a incorporação das substâncias radioativas. Quando não especificado de outra forma, este τ tem o valor de 50 anos para os adultos e até a idade de 70 anos para a incorporação por crianças. (CNEN, 2005).

Para a proteção radiológica, o que tem realmente interesse é a dose absorvida média em todo o tecido ou órgão (e não, apenas, em um determinado ponto), ponderada com respeito à qualidade da radiação. Os fatores de ponderação utilizados são definidos pela ICRP (Comissão Internacional de Proteção Radiológica). A grandeza H_T , pode ser determinada também através da relação $H_T = \sum W_R \cdot D_{TR}$, onde W_R é o fator de peso ou fator de ponderação da radiação definido em função do tipo e energia da radiação incidente, D_{TR} é a dose absorvida média em um órgão. Os valores de W_R , para um determinado tipo de radiação são selecionados para serem representativos dos valores de EBR (Eficiência Biológica Relativa) na produção de efeitos estocásticos a baixas doses. Convém lembrar que a razão entre a EBR é função dos diversos tipos de radiação e inversamente proporcional às respectivas doses absorvidas para um mesmo efeito biológico. Por outro lado, a TLE, (Transferência Linear de Energia) representa a quantidade de energia média perdida pela radiação em função do seu percurso em um determinado meio (dE/dl), sendo expressa, geralmente, em $\text{KeV}\mu\text{m}^{-1}$.

As radiações podem ser divididas em dois grupos, as que possuem alto TLE e as que possuem baixo TLE. As radiações consideradas de baixo TLE são os raios-X, os raios gama e os elétrons. Já as radiações de alto TLE são aquelas que possuem um alto poder de ionização e, conseqüentemente, àquelas que causam os maiores danos biológicos, ou seja, as partículas alfa, os íons pesados, os fragmentos de fissão e os nêutrons. A RBE de uma determinada radiação é função da TLE, da dose e da taxa de dose. Os fatores de qualidade, (Q), foram inicialmente estabelecidos a partir dos valores da TLE na água, mas, devido às incertezas associadas, foi necessário substituí-los pelos fatores de ponderação da radiação, W_R , conforme recomendação do ICRP-60. Os valores de W_R para um determinado tipo e energia de radiação são representativos das respectivas EBR em produzir efeitos

estocásticos a baixas doses. Os valores de w_R são compatíveis com os de Q , como pode ser visto na tabela 3(CASTRO,2005 e ICPR 60,1991).

Tabela 3 – Fator de Ponderação da Radiação (ICPR 60,1991)

Tipo de Radiação/Energia	Fator de Peso (w_R)
Prótons (exceto os de retrocesso) $E > 2,0$ MeV	5,0
Nêutrons de Energia :	
$E < 100$ keV	10
10 Kev $< E < 2,0$ MeV	20
$2,0$ Mev $< E < 20$ MeV	20
$E > 20$ MeV	10

3 - Efeitos Biológicos da Radiação

As células quando expostas a radiação sofrem a ação de fenômenos físicos, químicos e biológicos. Dependendo de sua energia a radiação pode causar ionização dos átomos formadores destas células e conseqüentemente causar danos aos tecidos. Assim, os danos biológicos começam em conseqüência das interações das radiações com os átomos formadores das células (SCHARBELE e SILVA, 2000). O corpo humano é constituído por cerca de $5,0 \times 10^{12}$ células, muitas das quais altamente especializadas para o desempenho de determinadas funções. Quanto maior o grau de especialização, isto é, quanto mais diferenciada for à célula, mais lentamente ela se dividirá. Uma exceção significativa a essa regra geral é dada pelos linfócitos, que, embora só se dividam em condições excepcionais, são extremamente radiosensíveis (GALLE, 2000). Um organismo complexo exposto às radiações sofre determinados efeitos somáticos, que lhe são restritos e outros, genéticos, transmissíveis às gerações posteriores. Os fenômenos físicos que intervêm são ionização e excitação dos átomos. Estes são responsáveis pelo

compartilhamento da energia da radiação entre as células. Os fenômenos químicos sucedem aos físicos e provocam rupturas de ligações entre os átomos formando radicais livres num intervalo de tempo pequeno. Os fenômenos biológicos da radiação são conseqüências dos fenômenos físicos e químicos. Alteram as funções específicas das células e são responsáveis pela diminuição da atividade da substância viva, por exemplo: perda das propriedades características dos músculos (SILVA, 1998). Estas constituem as primeiras reações do organismo à ação das radiações e surgem geralmente para doses relativamente baixas. Além destas alterações funcionais os efeitos biológicos caracterizam-se também pelas variações morfológicas. Entende-se como variações morfológicas as alterações em certas funções essenciais ou a morte imediata da célula, isto é, dano na estrutura celular. É assim que as funções metabólicas podem ser modificadas a ponto de a célula perder sua capacidade de efetuar as sínteses necessárias à sua sobrevivência (JIHO MIN, 2003). A irradiação de material biológico pode resultar em transformação de moléculas específicas (água, proteína, açúcar, DNA, etc.) que levam conseqüências que devem ser analisadas, em função do papel biológico desempenhado pelas moléculas atingidas. Os efeitos das destas transformações moleculares devem ser acompanhados nas células, visto serem estas as unidades morfológicas e fisiológicas dos seres vivos. O DNA, por ser responsável pela codificação da estrutura molecular de todas as enzimas das células, passa a ser a molécula chave no processo de estabelecimento de danos biológicos. No caso de exposição de seres humanos a altas doses de radiação, como em acidentes nucleares, uma grande parte das células do corpo é afetada, impossibilitando a sustentação da vida. Por outro lado, há, ainda, muita incerteza quanto aos efeitos da exposição de pessoas a baixas doses de radiação uma vez que, caso haja efeitos, estes, geralmente, são mascarados pela ocorrência natural de doenças que podem ou não ser provocadas pela exposição à radiação, como é o caso do câncer (LABEJOF, 1998).

Para que um estudo sobre os efeitos biológicos da radiação, a baixas doses seja estatisticamente válido, é preciso observar uma população de milhões de pessoas expostas a esses níveis baixos de radiação, durante várias gerações, já que os organismos dispõem de mecanismos de reparo e, mesmo que haja morte celular, as células podem vir a ser prontamente substituídas por meio de processos metabólicos normais, “neutralizando”, assim, o efeito em estudo (GALLE, 2000).

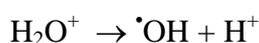
Os efeitos da radiação acontecem de acordo com a sensibilidade orgânica, pois cada órgão do corpo humano apresenta uma sensibilidade que está relacionada ao tipo de células que os compõem. Por exemplo, se as células formadoras do sangue são as mais sensíveis devido a sua taxa de reprodução ser rápida, o órgão formador do sangue são os mais sensíveis à radiação. As células musculares e nervosas são relativamente mais resistentes à radiação e, portanto, os músculos e o cérebro são menos afetados. A taxa de reprodução das células que formam um órgão não é o único critério para determinar a sensibilidade geral. A importância relativa do órgão para o bem estar do corpo também é importante. Um exemplo de sistema celular muito sensível é um tumor maligno. A camada externa de células se reproduz rapidamente e também tem um bom suprimento de sangue e oxigênio. As células são mais sensíveis quando estão se reproduzindo e a presença de oxigênio aumenta a sensibilidade à radiação. Células com oxigênio insuficiente tendem a ser inativas, tais como as células localizadas no interior do tumor maligno. Quando o tumor é exposto à radiação, a camada externa de células que estão se dividindo é destruída, fazendo com que o tumor diminua de tamanho. Se o tumor receber uma alta dose para destruí-lo completamente, o paciente também poderá morrer. Assim, é aplicada uma dose baixa no tumor a cada dia, possibilitando que os tecidos tenham chance de se recuperar de qualquer dano enquanto, gradualmente, diminui o tumor altamente sensível (GALLE, 2000).

-Efeitos Radioquímicos Imediatos

Uma vez que a água é o principal componente das células, sendo responsável por cerca de 70% da composição celular, a maior parte da radiação incidente é por ela absorvida, dando lugar às seguintes espécies reativas:



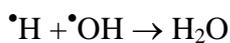
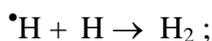
A molécula da água, afetada pela passagem da radiação, é ionizada. O elétron que deixa a molécula é 'aprisionado' por demais moléculas de água que, devido a sua natureza polar, se posicionam de tal forma que os átomos de hidrogênio, carregados positivamente, ficam mais próximos ao elétron e os átomos de oxigênio, mais distantes. Esse arranjo é denominado elétron hidratado $\cdot\text{e}^-(\text{aq})$



A molécula de água ionizada, H_2O^+ , pode, também, se dissociar, dando formação ao íon hidrogênio e ao radical livre hidroxila, conforme ilustrado acima.



É possível, ainda, por radiólise da molécula de água, a formação dos radicais livres, hidrogênio e hidroxila devido, a presença de um elétron isolado ou não emparelhados, nas últimas camadas eletrônicas que interagem quimicamente entre si ou com as moléculas do meio, modificando-as. Os principais produtos resultantes da irradiação da água tendem a reagir com as bases nitrogenadas do DNA ou, na ausência destas irão sempre competir com as reações que levam ao dano das moléculas biológicas presentes no sistema. Estas reações são mostradas abaixo.



Um organismo complexo exposto às radiações sofre determinados efeitos somáticos, que lhe são restritos e outros, genéticos, transmissíveis às gerações posteriores. Os fenômenos de ionização e excitação dos átomos são responsáveis pelo compartilhamento da energia da radiação entre as células.

Os fenômenos químicos sucedem aos físicos e provocam rupturas de ligações entre os átomos formando radicais livres num intervalo de tempo pequeno, em que os produtos da reação interagem com as moléculas orgânicas mais importantes da célula. Os radicais livres (H, OH) e os agentes oxidantes (H_2O_2) podem atacar as moléculas compostas que formam o cromossomo. No estágio biológico a reação química pode ocorrer de dezenas de minutos a dezenas de anos, dependendo dos sintomas. As alterações químicas, citadas acima, podem danificar a célula de várias maneiras, provocando a sua morte prematura, impedindo a divisão celular, ocasionando mutagênese (SCHABERLE e SILVA, 1998). Os fenômenos biológicos da radiação são conseqüências dos fenômenos físicos e químicos. Alteram as funções específicas das células e são responsáveis pela diminuição da atividade da substância viva, por exemplo: perda das propriedades características dos músculos. Estas

constituem as primeiras reações do organismo à ação das radiações e surgem geralmente para doses relativamente baixas. Além destas alterações funcionais os efeitos biológicos caracterizam-se também pelas variações morfológicas. Entendem-se como variações morfológicas as alterações em certas funções essenciais ou a morte imediata da célula, isto é, dano na estrutura celular. É assim que as funções metabólicas podem ser modificadas a ponto da célula perder sua capacidade de efetuar as sínteses necessárias à sua sobrevivência.

-Danos Radioinduzidos na Molécula de DNA

As espécies reativas $\cdot\text{e}^-(\text{aq})$, $\text{H}\cdot$ e $\cdot\text{OH}$, resultantes da transferência de energia da radiação ionizante para a água, podem atacar, em maior ou menor grau, as bases nitrogenadas contidas no DNA (Adenina, Guanina, Citosina e Timina), alterando, conseqüentemente, seu papel biológico. Experimentos mostram que o período de vida das espécies reativas $\cdot\text{e}^-(\text{aq})$ e $\text{H}\cdot$ em solução é drasticamente reduzido na presença das bases timina, uracil ou citosina, uma vez que os elétrons hidratados atacam as ligações duplas entre os carbonos 5 e 6 dos anéis desses compostos. Convém observar que o DNA, responsável pela codificação da estrutura molecular de todas as proteínas das células, passa a ser a molécula chave no processo de estabelecimento de danos biológicos. Ao sofrer a ação das radiações, a molécula de DNA pode sofrer mutações gênicas ou quebras. As mutações gênicas correspondem a alterações induzidas na molécula de DNA que resultam na perda ou na transformação de informações codificadas na forma de genes. A introdução de mutações no genoma de uma célula é considerada indispensável para a indução de um câncer por ação das radiações. No entanto, mutações radioinduzidas não evoluem obrigatoriamente para câncer. Quando uma lesão no DNA resultar em quebra da molécula, a respectiva célula, caso possua taxa de divisão elevada, passa a ter dificuldade em transferir integralmente seu patrimônio genético para as células filhas que podem morrer após uma ou duas divisões subseqüentes. Por outro lado, células diferenciadas (que não sofrem divisão) podem conviver com inúmeras quebras, sem, contudo, terem suas funções prejudicadas. No entanto, caso haja rearranjo dos fragmentos resultantes das quebras de DNA, é possível que surjam cromossomos aberrantes, afetando o funcionamento das células que os contêm. É oportuno ressaltar que nem todas as alterações introduzidas pela ação das radiações no DNA causam dano biológico. Assim é que o processo de evolução dos seres vivos ocorreu, desde o princípio, em um ambiente do qual as radiações ionizantes eram partes integrantes e interagiam com as moléculas precursoras dos sistemas biológicos. Pode-se afirmar que a

radioatividade natural teve um papel preponderante no surgimento de novos arranjos moleculares e sistemas primitivos de vida, assim como na evolução destes últimos para as formas atuais de vida (GALLE, 2000, JIMO MIN, 2003 e LABEJOF, 1998).

Por ser responsável pela codificação da estrutura molecular de todas as enzimas das células, o DNA passa a ser a molécula chave no processo de estabelecimento de danos biológicos. Ao sofrer ação direta das radiações (ionização) ou indireta (ataque de radicais livres) a molécula de DNA expõe basicamente dois tipos de danos: mutação gênica e quebras.

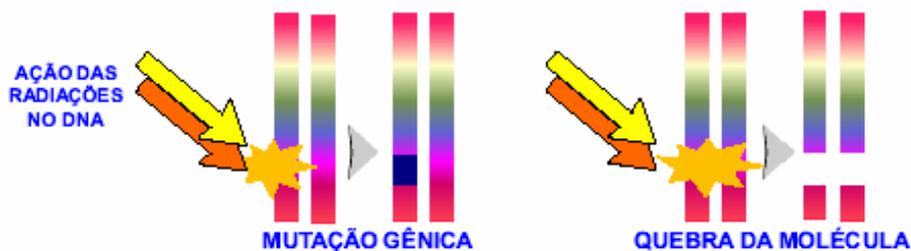


Fig. 1- Ação das radiações e seus danos do DNA

Sendo que a Mutação gênica corresponde a alterações introduzidas na molécula do DNA que resulta na perda ou transformação de informações codificadas na forma de genes e a Quebra da molécula resulta na perda da integridade física do material genético.

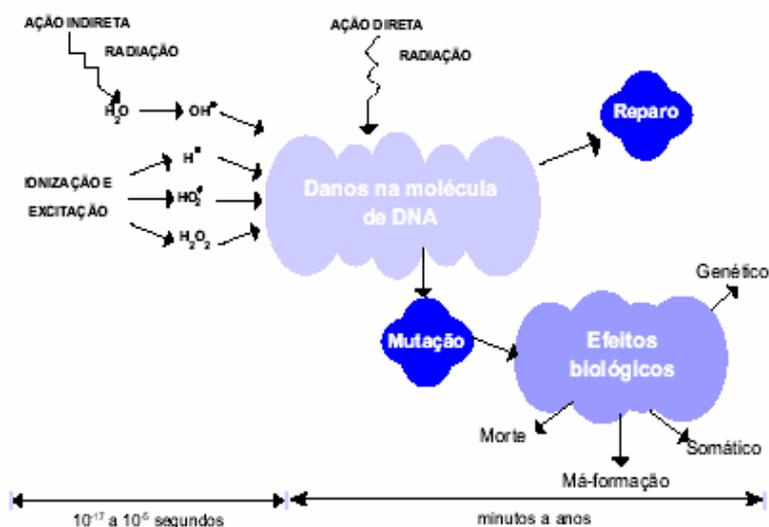


Figura 2 - Conseqüências da irradiação na molécula do DNA

Baixas doses de radiação podem causar efeitos letais ou outros incluindo antiproliferativos e imunomoduladores. Como também, pode causar efeitos antagônicos: uma radio-resistência, ou formar maior sensibilização levando a hipersensibilidade. Portanto, o conhecimento das baixas doses de radiação, pode ter importância tanto para sobrevivência celular, como para

aberrações cromossômicas. Esses efeitos dependem de vários fatores: do tipo de célula examinada, do tipo de radiação, da correlação com a energia absorvida pela unidade de massa (Dose), da Energia Linear Transferida (LET) nas células e da distribuição da dose ou ainda da seqüência de doses com diferentes intervalos de tempo (taxa de dose) (LABEJOJ, 2000). Para baixas quantidades de energia absorvida pelas células, os mecanismos reguladores da homeostase intervêm claramente, sendo a integridade do órgão conservada e o efeito de morte celular não observado. Nesses casos, é importante considerar e distinguir os efeitos secundários causados pela irradiação localizada e àqueles oriundos da irradiação global em todo o organismo (GALLE, 2000). Quando o organismo foi irradiado de corpo inteiro observou-se a destruição maciça de certas variedades de células indispensáveis à vida, particularmente as mais radiosensíveis (as menos diferenciadas), dominando o controle clínico. Este estudo indicou também uma variação de sensibilidade individual, devido a apoptose radio-induzida, dentro de uma mesma população (apoptose em células de rins) (LABEJOJ, 1998).

- Características dos Efeitos Biológicos

Os efeitos biológicos provocados pela radiação ionizante são de natureza bastante variável e dependem de fatores como dose total recebida, se esta foi aguda ou crônica, se localizada ou de corpo inteiro. As características gerais desses efeitos são:

- Especificidade: os efeitos biológicos das radiações podem ser provocados por outros agentes físicos, químicos ou biológicos.
- Reversibilidade: a célula possui mecanismos de reparo, podendo, em caso de danos parciais, re-sintetizar ou restaurar uma estrutura danificada.
- Transmissividade: a maior parte das alterações causadas pelas radiações ionizantes que afetam células e organismos não se transmitem as outras células ou outros organismos, exceção feita à irradiação das gônadas, que pode resultar em alterações transmissíveis aos descendentes.
- Radiosensibilidade: nem todas as células, tecidos órgãos ou organismos respondem igualmente à mesma dose de radiação. A radiosensibilidade das células é diretamente proporcional a sua capacidade de reprodução e inversamente proporcional ao seu grau de especialização.
- Fatores de Influência: pessoas expostas à mesma dose de radiação não apresentam, necessariamente os mesmos danos e o mesmo tempo de resposta. Por exemplo, o indivíduo

é mais vulnerável à radiação quando criança (processo de multiplicação celular mais significativo) ou quando idoso (processo de reparo celular pouco eficiente).

- Tempo de Latência: Há um período de tempo que decorre entre o momento da irradiação e o surgimento do dano visível ou detectável.
- Limiar: Certos efeitos exigem, para se manifestar, que a dose de radiação seja superior a uma dose mínima. O efeito eritema, por exemplo, é observado para uma dose limiar da ordem de 3,5 Sv, os efeitos biológicos da radiação podem ser somáticos ou hereditários. O primeiro ocorre na soma do indivíduo irradiado (corpo), enquanto que os hereditários se originam da introdução de danos em células da linhagem germinativa do sujeito e por isso manifestam-se em sua descendência (CNEN, 2005).

Para fins de proteção radiológica, os efeitos biológicos da radiação são classificados em estocásticos e determinísticos (não estocásticos). Os Efeitos Estocásticos: são aqueles cuja probabilidade de ocorrência é em função da dose, não existindo limiar, como é o caso do câncer. Assim, para qualquer indivíduo irradiado há uma chance de que certos efeitos atribuíveis à radiação se manifestem, mas só depois de um período de tempo longo (dezenas de anos) a partir do momento que ocorreu o evento de irradiação. Os efeitos determinísticos: são aqueles que surgem num curto espaço de tempo (dias, horas, minutos) a partir de um valor de dose limiar e sua gravidade é função do aumento dessa dose. Estes efeitos incluem inflamação e ulceração da pele, náusea, vômitos, anorexia, diarreia, queda de cabelos, anemia, hemorragia, infecções, etc. Esses efeitos são atribuídos, principalmente, à morte celular ou perda da capacidade de reposição de células de vida biológica relativamente curta, ou seja, aquelas que devem se manter em permanente estado de reprodução como as da medula óssea, as das camadas mais internas dos tecidos de recobrimento (pele, revestimento do sistema gastrointestinal, recobrimento de glândulas) e aquelas da linhagem germinativa.

Os efeitos determinísticos classificam-se em imediatos e retardados com base num limite, adotado por convenção, de 60 dias. O mais importante dos efeitos imediatos das radiações após exposição do corpo inteiro a doses relativamente elevadas é a Síndrome Aguda de Radiação (SAR). O efeito retardado de maior relevância é a cancerização radioinduzida, que só aparece vários anos após a irradiação. O quadro clínico apresentado por um irradiado em todo o corpo depende da dose de radiação absorvida. A unidade para expressar a dose da radiação absorvida pela matéria é o Gray (Gy), definido como a quantidade de radiação absorvida, correspondente a 1,0 Joule por quilograma de matéria. Doses muito elevadas, da ordem de centenas de grays, provocam a morte em poucos minutos, possivelmente em decorrência da destruição de macromoléculas e de estruturas

celulares indispensáveis à manutenção de processos vitais. Doses da ordem de 100 Gy produzem falência do sistema nervoso central, de que resultam: desorientação espaço-temporal, perda de coordenação motora, distúrbios respiratórios, convulsões, estado de coma e, finalmente, morte, que ocorre algumas horas após a exposição ou, no máximo, um ou dois dias mais tarde. Quando a dose absorvida numa exposição de corpo inteiro é de dezenas de grays, observa-se síndrome gastrointestinal, caracterizada por náuseas, vômito, perda de apetite, diarreia intensa e apatia. Em seguida surge desidratação, perda de peso e infecções graves. A morte ocorre poucos dias mais tarde (SCHARBELE e SILVA, 2000). Doses da ordem de alguns grays acarretam a síndrome hematopoiética, decorrente da inativação das células sanguíneas (hemácias, leucócitos e plaquetas) e, principalmente, dos tecidos responsáveis pela produção dessas células (medula). Para doses inferiores a 10 Gy, as possibilidades de uma assistência médica eficiente são maiores. As radiações, como diversos agentes químicos, também têm efeito teratogênico, isto é, provocam alterações significativas no desenvolvimento de mamíferos irradiados quando ainda no útero materno. Inquestionavelmente, as radiações ionizantes são um agente mutagênico, conclusão válida para espécies animais e vegetal, com base em resultados obtidos ao longo de seis décadas de experimentação. Na espécie humana, a detecção de tais alterações é bastante difícil. Mesmo entre os sobreviventes de Hiroshima e Nagasaki, a maior população irradiada até hoje e também a mais intensamente estudada, a ocorrência de mutações radioinduzidas não foi satisfatoriamente demonstrada (CNEN, 2002). Alguns efeitos determinísticos esperados para intervalos de doses absorvidas pelo indivíduo adulto estão ilustrados na Tabela 4.

Tabela 4 – Efeitos da Radioexposição de Corpo Inteiro em Adultos (ICRP 60,1991).

Forma	Dose Absorvida	Sintomatologia
Infra-Clínica	< 1,0 Gy	Ausência de sintomas
Hematopoiética Leve	2,0 – 4,0 Gy	Hematopoiética Leve Função medular atingida: linfopenia, leucopenia, trombopenia, anemia. Recuperação em 6 meses.
Hematopoiética Grave	4,0 – 6,0 Gy	Função medular gravemente Atingida.
Gastro-Intestinal	6,0 – 7,0 Gy	Diarréia, vômitos. Morte em 5-6 dias.
Pulmonar	8,0 – 9,0 Gy	Insuficiência respiratória, coma. Morte entre 14-36 horas.
Cerebral	> 10 Gy	Colapso do sistema nervoso Central, morte em poucas horas

4 – Macrófago

Os macrófagos são células do sistema imunes originados da medula óssea e fazem parte da primeira linha de defesa do organismo, atuado no controle antimicrobiano e antitumoral. Porém, isto ocorre através de múltiplos eventos regulatórios identificados em várias funções. As interações dos macrófagos com outros componentes do sistema imune acontecem na resposta inata e específica. Na imunidade inata essas células apresentam capacidade de fagocitar partículas estranhas e produzir citocinas, e na imunidade específica, podem atuar como células processadoras e apresentadoras de antígeno. Outra particularidade dos macrófagos, é que eles podem ser encontrados em diferentes estágios funcionais (residente, ativado e estimulado) determinados pelos sinais estimulatórios e inibitórios do microambiente em que se encontram (MENEGUELO, 2004). A produção de citocinas por outras células da imunidade inata promove a mudança de estado funcional dos macrófagos, além de induzir o recrutamento dessas células. Já foi demonstrado que a ativação de macrófagos acontece por agentes que aumentam sua sensibilidade, como interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral (TNF- α) e lipopolissacarídeo bacteriano (LPS). Esses agentes ativam vários processos metabólicos potencializando as diversas funções dos macrófagos, dentre as principais: quimiotaxia, atividade fagocítica, aumento da produção de radicais microbicidas, intermediários do oxigênio e do nitrogênio (ROIs e RNI), etc. (MENEGUELO, 2004 e BELOSEVIC *et.al*,1998)

- Funções de Macrófago ativados

Em tecidos diferentes, os macrófagos assumem as mesmas funções apesar de serem morfológicamente distintas. Assim, encontramos Micróglia no sistema nervoso central, Células de Kuppfer no fígado, Macrófagos alveolares no pulmão, Messangio intraglomerular no glomérulo de Malpighi renal, Macrófagos sinusais no baço, Macrófagos das serosas (peritônio, pericárdio e pleura) e Células de Langerhans na pele, todos esses tipos celulares fazem fagocitose, processam e apresentam antígenos e funcionam como células efetoras (Site: Medsduents) Essas funções são amplificadas quando os macrófagos encontram-se no estado ativado.

Em macrófagos, o alto poder fagocítico (capacidade das células de internalizar partículas estranha) é de grande importância e inclui essas células no Sistema Fagocitário

Mononuclear (SFM). Uma vez internalizadas, as partículas estranhas são digeridas nos lisossomas, para posterior apresentação para linfócitos da imunidade específica. O englobamento da partícula estranha por si só induz uma resposta de macrófagos caracterizada por aumento no consumo de O_2 molecular, que é reduzido a superóxido (O_2^-) em uma reação catalizada pela NADPoxidase presente na membrana plasmática. O superóxido formado é metabolizado a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) que por sua vez interage com O_2 gerando radical hidroxila (OH^\bullet) e oxigênio molecular O_2 (SEGAL, 1993, ROBINSON, 1994, ROSEN, 1995). É relevante ressaltar que a digestão intracelular, processo posterior ao englobamento, é potencializada por interferon gama que estimula a fusão dos lisossomas com o fagossoma e induz o aumento do metabolismo de diversas enzimas hidrolíticas dos lisossomas, entre elas a NADPoxidase que leva ao aumento da produção espécies reativas do oxigênio (ROS ou ROIs) (BELOSEVIC et al.,1988). À produção aumentada de ROIs denominamos explosão respiratória. Apesar de macrófagos não estimulados serem capazes de produzir ROIs, a ativação dessas células potencializa o processo de explosão respiratória que é extremamente necessário como mecanismo microbicida, mas também deletério para célula, quando produzido em excesso, devido às suas atividade oxidantes (SOUZA JR. et al.,2005).

Diferentemente dos ROIs, a produção das espécies reativas do nitrogênio (RNS) é dependente da ativação de macrófagos por citocinas como o $IFN-\gamma$ liberadas principalmente por linfócitos Th1, ou por produtos derivados de bactérias como o LPS. Esses estímulos ativam a via de sinalização para biossíntese de óxido nítrico (*nitric oxide*-NO) e consequente indução gênica para expressão da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS ou NOS 2). Essa enzima cataliza a reação de conversão do substrato L-arginina a NO e L-citrulina (IBUKI et al., 2000; SANTOS, 2002). O NO é um radical gasoso que dá origem a espécies reativas incluindo o cátion nitrosonium (NO^+), o ânion nitroxila (NO^-) e o peroxinitrito ($ONOO^-$) (SANTOS, 2002). Todos os RNS atuam inibindo a respiração mitoconrial, a síntese de DNA e a atividade da enzima aconitase do ciclo de Krebs. Dessa forma, desempenham também importante função microbicida, porém com maior eficiência sobre microrganismos resistentes aos ROIs (MCKNNEY et al.,2004).

Além da influência regulatória dos produtos de linfócitos sobre os macrófagos essas células também são ativadas por hormônios produzidos pelo sistema nervoso simpático (SNS) e pelo eixo hipotalâmica-pituitária-adrenal (HPA). Assim, estímulos externos como exercício físico e radiação parecem ativar indiretamente o sistema imunológico. Certamente,

pode-se dizer que esses estressores exerçam sua influência regulatória sobre os componentes celulares do sistema imunológico por ativação do SNS e pelo eixo do HPA ou ainda, por células ou tecidos de outros órgãos (J.A. WOODS *et al.* 2000).

- Efeitos da Radiação Ionizante na Produção de Radicais Livres por Macrófagos

A radiação ionizante (raios-X, gama) age levando à formação de radicais livres do oxigênio devido a reações de radiólise. Algumas espécies de radicais livres, ao interagir com o DNA ou com a membrana celular causam danos irreversíveis levando a morte celular. Entretanto, esses efeitos ao material genético e as células, foram observados com doses acima de 5,0Gy, ocorrido em 15% de fragmentação espontânea do DNA em tecido tumoral (AGRAWAL, *et al.* 2001) O anion superóxido forma-se no citoplasma por ação das enzimas xantina oxidase e aldeído oxidase (1) ou durante a auto-oxidação de catecolaminas, na membrana citoplasmática por ação da enzima NADPH oxidase e na cadeia respiratória mitocondrial por redução monoelectrónica do dióxigênio pela ubiquinona, e o óxido nítrico (NO) é sintetizado a partir da L-arginina por ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS), em células endoteliais, neuronais, macrófagos, neutrófilos e hepatócitos (2). O superóxido e o óxido nítrico podem reagir entre si (3), quando produzidos simultaneamente em células endoteliais, macrófagos e neutrófilos, dando origem à formação do anion peroxinitrito, espécie altamente oxidante, que pode reagir com proteínas, lipídios e ADN. A formação do radical hidroxila *in vivo* por via química deve-se à redução do peróxido de hidrogênio por um metal de transição, através da conhecida reacção de Fenton (4), em que o peróxido de hidrogênio reage com a forma reduzida do metal dando origem ao radical hidroxila, a um íon hidróxido e à forma oxidada do metal. O radical superóxido pode desempenhar o papel do metal redutor, através da reacção de Haber-Weiss, na qual o peróxido de hidrogénio é reduzido pelo superóxido a radical hidroxila, íon hidróxido e dióxigênio (5). No entanto, a principal via de formação do radical hidroxila resulta do efeito indireto da radiação ionizante sobre os tecidos vivos, ou seja, a radiólise da água por absorção da energia da radiação que conduz à excitação e ionização da molécula, com formação, após as etapas de difusão e reacção nos “clusters” (cerca de 10^{-6} s), entre outras, das espécies radicais (VIEIRA, 2003)

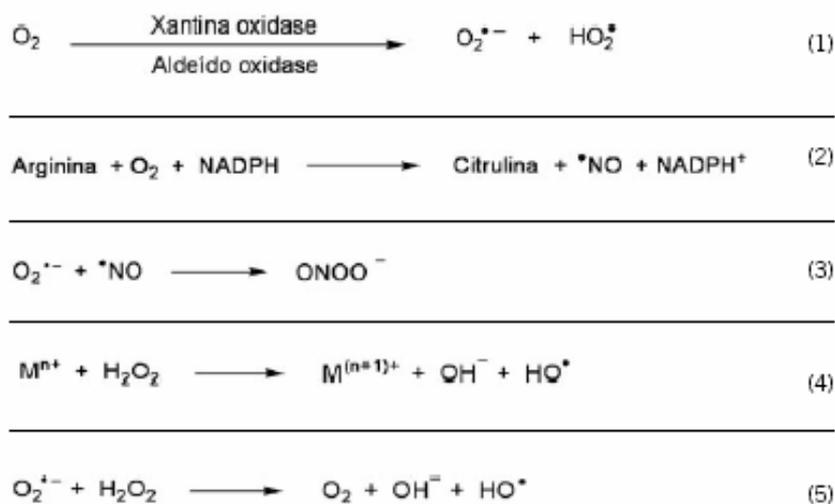


Figura 3-Espécies Reativas de oxigênio (VIEIRA, 2003).

Em macrófagos, foram demonstrados os efeitos da radiação ionizante na indução da expressão da enzima óxido nítrico sintase e o conseqüente aumento da síntese óxido nítrico. Macrófagos irradiados com CO-60, *in vitro*, com doses variando entre 0.5 Gy e 10 Gy, apresentaram um aumento significativo na formação de óxido nítrico, entre 2.5 e 5.0 Gy após 4h e 24h do tratamento com INF e LPS enquanto, baixas doses de radiação de 1.25 Gy.h⁻¹, se aplicada seis horas antes ou depois da estimulação com IFN e LPS inibem a indução iNOS (HILDEBRANDT, G. et al.,2003). Dessa forma, o tempo e a dose de radiação podem modular a função dos macrófagos. Em outro estudo com macrófagos peritoneais *in vivo*, utilizando baixas doses de radiação (4,0cGy), a produção de anion superóxido foi aumentada quando os macrófagos eram tratados com substância ativadora da proteína kinase C (PKC), o PMA, mas a radiação apenas não altera a produção de O₂⁻. Para mostrar o efeito das baixas doses de radiação no aumento de ROIs uma estratégia interessante foi a utilização de *Zymosan* para induzir a atividade fagocítica. Os dados mostraram que o aumento de O₂⁻ em macrófagos ativados, não aconteceu pela atividade (IBUKI *et al.*, 2000 e SUSU *et al.*, 2005).

A participação das espécies de radicais livres na apoptose *in vivo* e *in vitro* foi investigada através do uso de agentes antioxidantes superóxido dismutase, catalase, vitamina E e LPS, após a irradiação gama. Os resultados obtidos mostraram que o estresse oxidativo causado pela irradiação gama, pode ser reduzido por agentes antioxidantes. Provavelmente esses agentes protegem a membrana mitocondrial, o que foi observado pelo microscópio em cultura celular (HERNANDEZ, et al. 2005).

- Efeitos do Exercício Físico na Produção de Radicais Livres por Macrófagos.

Tanto o Exercício Físico (EF) moderado como o EF intenso pode aumentar várias funções em macrófagos, incluindo a quimiotaxia, a aderência, a taxa de metabolismo do nitrogênio, a atividade citotóxica e a capacidade fagocítica, e a produção de peróxido de hidrogênio e óxido nítrico. Os mecanismos subjacentes a estas respostas ainda permanecem desconhecidos, mas podem estar associados a fatores neuroendócrinos (FERNANDEZ, FUENTE, 1999; MENEGUELLO, 2004 e LEANDRO, 2002). De forma geral, o EF agudo provoca um aumento na concentração de leucócitos na circulação. A leucocitose observada durante e após o exercício decorre principalmente do aumento da concentração de neutrófilos. Este aumento parece resultar da migração de células do tecido endotelial para o sangue ou como parte da resposta inflamatória às lesões no tecido muscular (LEANDRO, 2002).

Os neutrófilos polimorfonucleares (PMN) compreendem a sub-população de leucócitos de maior número na circulação sanguínea. Para desempenhar suas funções nos tecidos, os PMN migram na direção de partículas a serem ingeridas (quimiotaxia). Assim podem reconhecer, aderir e engolfar muitos micróbios, bactérias e vírus (fagocitose) e descarregar o conteúdo de seus grânulos citoplasmáticos nos vacúolos fagocíticos (desgranulação). Além disso, os PMN são mediadores da lesão tecidual durante a inflamação, via liberação de espécies reativas de oxigênio e outros fatores tóxicos (atividade oxidativa) (AGRAWAL *et al.*, 2001).

Assim como os neutrófilos, muitas funções de macrófagos podem ser afetadas pelo EF moderado. Porém, essas manifestações dependem da duração e intensidade do EF. Em estudo realizado para avaliar o efeito do treinamento moderado em macrófagos obtidos de ratos envelhecidos. Os animais foram submetidos a exercício moderado de natação 1,0h por dia, durante seis semanas. Observou-se que a capacidade funcional de macrófagos em Ratos envelhecidos treinados (EV-TR), aumenta a quimiotaxia em 2,4 vezes em relação aos envelhecidos (EV) e 3,7 em relação aos adultos (AD); a produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi aumentada em 3,5 vezes em relação aos EV e aos AD; a produção de óxido nítrico (NO) foi aumentada em 84% nos EV-TR em relação aos EV (Meneguello). Em outro estudo comparativo entre camundongos jovens e velhos, machos e fêmeas, utilizou-se o EF moderado com 1,0:30 min de natação, como também o EF intenso de natação até a exaustão. Os macrófagos peritoneais dos animais submetidos à EF intenso tiveram aumento nos níveis de corticosterona que é uma característica de situação de estresse induzido pelo EF. Os

animais jovens aumentaram o nível de corticosterona, como também a atividade de quimiotaxia em relação aos velhos, mas os níveis em fêmeas jovens, nas duas funções, foram mais elevados do que em machos jovens. A atividade fagocítica e a produção de anion superóxido, também aumentaram no EF agudo em relação ao EF moderado em animais jovens em relação aos velhos, porém, sem apresentar diferenças entre os sexos (FERNANDEZ e FUENTE, 999). Alguns pesquisadores demonstraram que a quantidade de radicais livres no tecido biológico está aumentada após o exercício agudo/ e ou crônico e que esse aumento coincide com a presença de danos teciduais (SCHENEIDER, 2004). O Estresse oxidativo causado pelo EF, como treinamento, esportivo e competição, elevam acentuadamente a taxa metabólica da célula aumentando a formação de anion superóxido, peróxido de hidrogênio e radical hidroxila, dentre outros.

Outro fator de estresse oxidativo é a duração do EF. Em estudo de Quimioluminescência urinária, realizado com humanos, o estresse oxidativo foi estimulado, variando seu aumento, de acordo com a duração e com o tipo do exercício. E observou-se que no início do exercício a capacidade antioxidante plasmática apresentou uma alta na concentração de lactato no sangue, no entanto com o Exercício Físico intenso prolongado, indicou uma elevação no plasma de produtos de peroxidação lipídica (SOUZA JR. et al. 2005).

Diversos estudos da década de 80 apresentaram resultados nos quais repetidas cargas de exercício levaram a danos ou envelhecimento acelerados do músculo em indivíduos ou cobaias. Entretanto, em estudo feito com o acompanhamento de atletas durante muitos anos, verificou-se que seu potencial metabólico e sua capacidade funcional muscular não eram prejudicados. Apontaram como possibilidade de mecanismo protetor o fato de terem encontrado incremento nos níveis de ferro e cobre no suor de atletas após o exercício, especulando que a excreção de tais metais no suor diminuiria a extensão do dano oxidativo mediado por tais metais. A partir destes estudos levantou-se a possibilidade de que o exercício regular pudesse promover um aumento adaptativo dos mecanismos de defesa do músculo esquelético capaz de proteger contra as lesões produzidas por espécies reativas de oxigênio (SCHENEIDER, 2004).

A indicação de que o organismo se adapta ao estresse oxidativo, pode ser determinado pelo sistema antioxidante, que está dividido em enzimático e não enzimático. O primeiro inclui as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx). A catalase desempenha importante papel na eliminação do H_2O_2 , promovendo o seu metabolismo á água. A GPx também funciona como mecanismo de

proteção contra o estresse oxidativo, convertendo a glutatona reduzida (GSH) à glutatona oxidada (GSSG), removendo H_2O_2 e formando água. Dessa forma, tanto a CAT quanto a GPx evitam o acúmulo de radical superóxido e de peróxido de hidrogênio para que não haja produção de radical hidroxila, contra o qual não existe sistema enzimático de defesa. O perfeito equilíbrio entre as enzimas antioxidantes (CuZnSOD, MnSOD, CAT, GPx) é importante para a manutenção da integridade celular (SCHENEIDER, 2004).

O EF regular é capaz de gerar adaptações ao estresse oxidativo, mitigando e/ou inibindo os efeitos prejudiciais causados pelos radicais livres. Isto acontece devido a uma série de relações entre os sistemas pró e antioxidante e os sistemas enzimáticos (SCHENEIDER, 2004). Em geral, os danos musculares causados pelo estresse oxidativo são mais acentuados em indivíduos pouco treinados, que realizam EF acima do seu estado de condicionamento físico. Em contrapartida, o EF moderado é um tratamento que altera positivamente a homeostase de células e tecidos, por diminuir os níveis basais de danos oxidativos e aumentar a resistência ao estresse oxidativo, e nesse sentido é de grande benefício para a saúde (VANCINI et al., 2005).

Em macrófagos o EF aumenta a atividade citotóxica e este evento correlaciona com o aumento da produção do NO. Este, componente chave para a resposta imune antimicrobiana e antitumoral é atenuado por explosão oxidativa (A. KNETHEN, 2002). Os efeitos do NO foram observados em estudo com exercício de corrida, durante oito semanas. Verificou-se que as células aumentaram sua funcionalidade, como também a produção de IL-2 e IL-4, sugerindo que a atividade física regular aumenta os mecanismos de defesa (H. SIGIURA et al., 2000). Em contrapartida, em estudos com humanos, o EF intenso pode reduzir efetivamente o sistema imune e a progressão de doenças crônico-degenerativas, como o câncer e doenças cardiovasculares (VITALA et al., 2004). Em geral os danos associados ao estresse oxidativo induzido pelo EF em humanos, são mais acentuados em indivíduos pouco treinados que não estão em condições de realizar EF (LAMPRECHT. M. et al. 2004).

CAPÍTULO II - Material e Métodos

1- Introdução

Foram utilizados cinco grupos de animais, que foram irradiados em diferentes taxas de dose, separados em quatro grupos, sendo a metade submetida a exercício físico e a outra metade não passou por exercício. O exercício físico executado foi a atividade aquática, escolhida por se tratar de uma atividade aeróbia, onde provavelmente ocorrerá aumento de ventilação pulmonar. Para o tratamento estatístico foi utilizado o método fatorial.

2- Escolha dos Animais

Para todos os experimentos *in vitro* foram utilizados camundongos machos com 8 semanas de idade e peso aproximadamente de 20 a 28g, da linhagem C57BL/6. Estes animais foram produzidos no Centro de Bioterismo (CEBIO) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais e mantidos no biotério da Escola de Farmácia da mesma Universidade. Os animais foram divididos em 05 grupos de acordo com a dose e taxa de dose de 2.0Gy.h^{-1} e 4.0Gy.h^{-1} , para irradiação de corpo inteiro por Cobalto-60, sendo a identificação de cada grupo por caixas. Após a irradiação os grupos foram subdivididos em quatro outros grupos. Sendo, dois grupos de 4 animais, caracterizados como $2,0\text{Gy.h}^{-1}$ e cinco dias e $4,0\text{Gy.h}^{-1}$ e cinco dias respectivamente e dois grupos com 8 animais cada um, Exercício Físico (EF) de $2,0\text{Gy.h}^{-1}$ e $4,0\text{Gy.h}^{-1}$, e Sedentário (SD) de $2,0\text{Gy.h}^{-1}$ e $4,0\text{Gy.h}^{-1}$. Além do grupo Controle que não foi irradiado com 12 animais. Os grupos foram identificados em caixas etiquetadas.

3- Métodos de Irradiação

Foi utilizado o irradiador Gama-cell com uma fonte de Cobalto-60 ($E= 1,25\text{ MeV}$) do CDTN/CNEN (Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear-Comissão Nacional de Energia Nuclear), com uma taxa de dose inicial (tempo t_0) de $13,98\text{Gy.h}^{-1}$. A partir da relação $D=Do.e^{-\lambda t}$ foi determinada a taxa de dose no momento da irradiação dos animais que foram divididos em 02 grupos irradiados de corpo inteiro com taxas de dose de 2.0Gy.h^{-1} e 4.0Gy.h^{-1} respectivamente. Após a irradiação os grupos foram

subdivididos em quatro, sendo 2 grupos de 4 animais para o experimento de cinco dias, 2 grupos de 8 animais para os experimentos de dez dias e 20 dias. Esses últimos caracterizados como grupo Exercício Físico (EF) e grupo Sedentário (SD).

4- Treinamento dos Animais

Os animais foram treinados de acordo com o protocolo de (FERRANDEZ, FUENTE, 1999). O exercício físico consistiu em 1h e 30 minutos de natação por dia, 5 dias por semana durante 2 semanas para um grupo e 4 semanas para o outro, de acordo com o experimento. Foram utilizadas piscinas individuais, de 4 litros, com sistema de aquecimento de temperatura da água, para se ter uma temperatura constante de aproximadamente $29^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Os animais do grupo de treinamento foram adaptados ao meio líquido com sessões de 30 minutos por cinco dias (Fig 1). Após o período de adaptação, foi realizado o teste de exaustão inicial com a utilização um peso adicional de 5% do peso corporal preso na cauda (Fig.4). Após 10 dias de treinamento foi realizado o teste de exaustão final com o primeiro grupo e após 20 dias de treino com o segundo grupo.



Figura 4 – Treino de adaptação com exercício aquático

5- Protocolo de treinamento

O Treinamento de exaustão de acordo com o protocolo serve para avaliar o efeito do aumento da captação de oxigênio. Os camundongos nadam com 5% do peso corporal preso a sua cauda até a exaustão, quando eles ficam submersos e não são capazes de retornar a superfície da água por 30s (REURY, F.P et al., 2003).



Figura 5 - Exercício aquático de camundongo com um peso na cauda

6- Sacrifício dos Animais

Os animais eram sacrificados por deslocamento cervical para retirada das células peritoneais. Após 72 da inoculação de 2mL de tioglicolato com injeção intraperitoneal. Em todos os experimentos de 5, 10 e 20 dias, sendo que nos grupos EF a inoculação para a obtenção de macrófagos era feita após o treino de exaustão final, e o sacrifício 72h após a inoculação.

7- Obtenção de macrófagos peritoneais de camundongos

Para obtenção de macrófagos peritoneais, os camundongos C57BL/6 eram inoculados por via intraperitoneal com 2,0 mL de tioglicolato a 3%. Após 72 horas, 5,0 mL de PBS gelado foram injetados na cavidade peritoneal desses animais e em seguida recolhidos com seringa. O líquido peritoneal rico em macrófagos era lavado por uma vez com PBS estéril, contendo 50 mg.mL⁻¹ de garamicina, a uma taxa de 2000 g por 10 minutos. As células eram contadas em câmara hemacitométrica de Neubauer e 1,0 x 10⁵ células em placas de 96 poços (NUNC) contendo 200 µL de RPMI/SFB por poço. Em seguida as células eram incubadas por 18 h a 37°C na presença de 5% de CO₂ (Estufa Forma Scientific - Model 3157, Marietta, Ohio). Logo após, a funcionalidade dos macrófagos era avaliada

utilizando os seguintes parâmetros: viabilidade celular, explosão respiratória, produção de óxido nítrico e atividade fagocítica.

8- Avaliação da viabilidade celular

A viabilidade das células do lavado peritoneal foi determinada pelo método do MTT, ensaio colorimétrico que mede a atividade da desidrogenase mitocondrial, baseado na capacidade das células viáveis reduzirem o sal 3-(4,5-di-metilazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolium brometo de cor amarela no produto formazan, um cristal de cor escura (GORDON, 1974). As células obtidas do lavado peritoneal de camundongos irradiados sedentários e treinados e os de camundongos não irradiados foram plaqueadas, em quadruplicata, em placas de 96 poços na concentração de $1,0 \times 10^5$ células em meio RPMI-1640 e 10% de SFB, e mantidas a 37° C por 24 e 48 horas. Quatro horas antes do término do tempo estabelecido, 20 μ L de MTT 5,0 mg/mL foi adicionado. Terminado o tempo estabelecido, o sobrenadante foi retirado e 150 μ L de dimetilformamida misturado com SDS 10% diluído em água na proporção de 1:1 foi adicionado a cada poço, homogeneizado bem para completa dissolução dos cristais de sal originados do metabolismo mitocondrial, responsável pela coloração (Fig 6-B). A leitura da absorbância a 570 nm era imediatamente realizada em aparelho que quantifica o numero de células em cada poço.

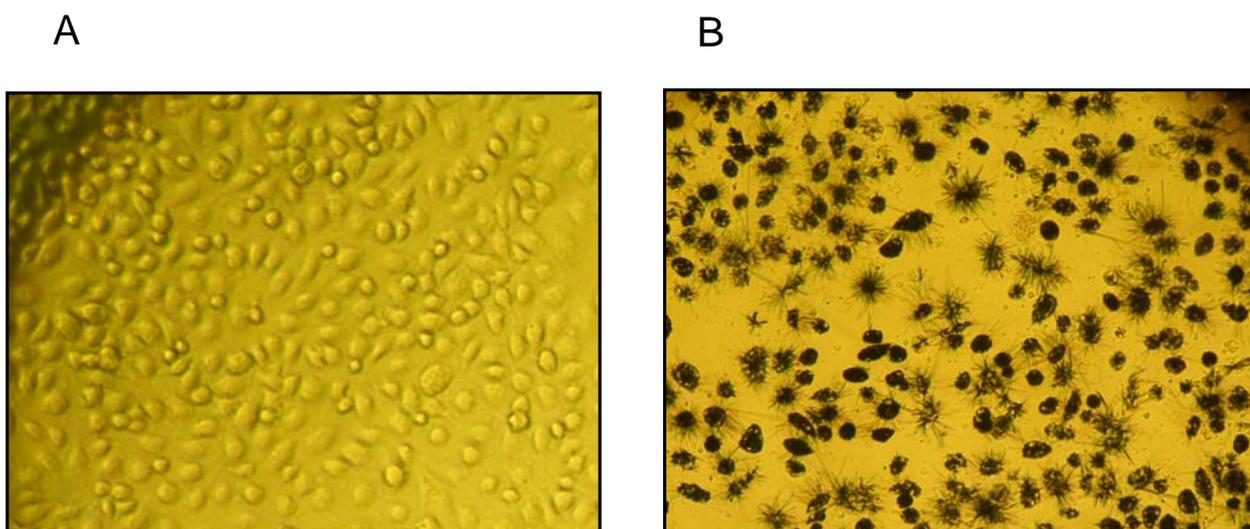


Figura 6 - Ensaio calorimétrico de MTT.

Os macrófagos aderentes cultivadas em meio RPMI/SFB10% (A) foram incubados com sal MTT formando cristais no meio intracelular. Após 4 horas os cristais escuros (B) foram dissolvidos em dimetilformamida como descrito em material e métodos.

9- Ensaio de Quimioluminescência

Macrófagos peritoneais ($5,0 \times 10^6$) de camundongos irradiados foram incubados com $2,0 \times 10^{-5} \text{M}$ de Luminol (5-amino-2, 3-dihydro-1, 4-phthalazinedione), na presença ou ausência de PMA (“Phorbol-Myristate-Acetate”) (FERRARI M., 1990). A reação foi realizada em PBS em volume final de 1,0 mL. A quantidade de radicais do oxigênio contida no interior de cada célula reage com o luminol e emite luz. A emissão de luz foi medida através da frequência de emissão em intervalos de um minuto utilizando um Luminômetro LKB-Wallac 1250. As leituras eram feitas por períodos variados de tempo, durante 60 minutos. A cada intervalo o aparelho quantifica os radicais de oxigênio que estão no interior das células.

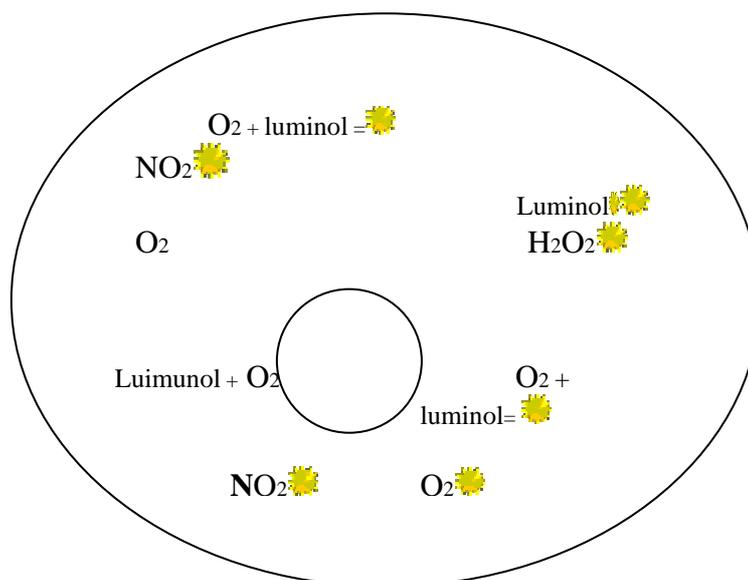


Figura 7 - Simulação das explosões respiratórias do oxigênio no meio intracelular.

10- Quantificação da produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos.

Os macrófagos incubados em placas de 96 poços foram tratados com Interferon-gama (IFN- γ) murino na dose de, 60 U/mL e com LPS purificado de *Escherichia coli* 0127

na concentração de $0,1 \text{ ng.mL}^{-1}$. Como controle foram utilizados macrófagos incubados na ausência de IFN- γ e LPS. As células eram incubadas novamente por 24 e 48, horas e os sobrenadantes eram removidos para a quantificação de óxido nítrico.

O NO foi determinado indiretamente pela quantificação do nitrito (NO_2^-) resultante de sua oxidação no sobrenadante de cultura de macrófagos através da reação colorimétrica de Griess. Para isso mistura-se na hora do uso, nas placas de 96 poços, $100 \mu\text{L}$ da amostra com $100 \mu\text{L}$ do reagente de Griess, na proporção de 1:1, 1% de sulfanilamida em 2,5% de H_3PO_4 e 0,1% de diamina-di-hidroclorido naftaleno (NEED) em 2,5% de H_3PO_4 (FERRARI, M. et al, 1990). Após 10 minutos a absorbância a 540 nm das diferentes amostras foram comparadas com os valores da curva padrão obtida pela dosagem de nitrito de sódio diluído em meio RPMI, em concentrações que variavam de 2,0 a 200 μM . Os resultados foram apresentados como média de duplicatas \pm erro padrão da média de um experimento

11- Reagentes

Todos os reagentes e drogas utilizadas neste trabalho foram de alto teor de pureza (P.A.) provenientes de um dos seguintes laboratórios: Sigma Chem. Co, Amresco, Merck, Boehringer Mannheim, Difco, BDH Laboratory Supplies e USB.

CAPÍTULO III – Resultados e Discussão

1- Avaliação do treinamento moderado em natação.

O efeito do Exercício Físico (EF) em macrófagos irradiados de corpo inteiro *in vivo* foi avaliado através do exercício de natação. Durante o exercício aquático acontece um aumento do consumo de oxigênio (VO₂) que pode ser observado através da diferença entre o tempo de exaustão inicial e final (REURY F.P et *al.*, 2003). A intensidade do EF moderada foi utilizada por se tratar de camundongos irradiados, onde a preocupação maior era a sobrevivência dos animais. Pois, estudos anteriormente mostram que a irradiação gama mesmo em baixas doses causa alguns efeitos biológicos, como também o EF intenso ou agudo aumenta o estresse oxidativo, podendo causar danos aos tecidos e ao sistema imune. Os animais do grupo irradiado com dose e taxa de dose de 2,0Gy.h⁻¹ apresentaram maior dificuldade tanto para o treino de adaptação (seções de 30 min. durante cinco dias), como para todo o treinamento (1,0:30min/dia) de 10 dias e 20 dias, mostrando um comportamento com maior nível de estresse, como também dificuldades para utilização do sobrepeso de 5% do peso corporal em relação ao grupo de 4,0Gy.h⁻¹. Entretanto, o grupo de 4,0Gy.h⁻¹ adaptou-se sem dificuldades tanto ao treino de adaptação como ao treinamento de 10 dias e de 20 dias. A diferença observada no comportamento entre os dois grupos pode estar relacionada ao tempo de exaustão inicial que foi maior em 2,0Gy.h⁻¹ do que em 4,0Gy, porém não apresentou diferença significativa no tempo de exaustão final, como é mostra na tabela 5.

Tabela 5 - Tempo de exaustão inicial e final para os quatro grupos de animais submetidos à EF aquático, com 10 dias e 20 dias.

Dose de radiação/duração do EF	Exaustão inicial	Exaustão final
2Gy 10 dias	3h 02' ± 10'	3h 05' ± 10'
2Gy 20 dias		3h 10' ± 5'
4Gy 10 dias	2h 29' ± 15'	3h ± 10'
4Gy 20 dias		3h 15' ± 10'

2-Viabilidade de macrófagos peritoneais submetidos à radiação por cobalto 60.

Para investigar o papel do treinamento físico na regulação das funções de macrófagos de camundongos C57BL/6 irradiados com cobalto 60 para as doses de 2,0 Gy e 4,0 Gy. As células peritoneais dos animais irradiados sedentários (SD), as dos treinados (EF) e as dos animais controle (sem irradiação) foram recolhidas para avaliação da viabilidade celular. Pelo ensaio de MTT observamos que tanto as células irradiadas como as células controle permaneceram viáveis após 24 e 48 horas de incubação, tempo utilizado em nossos experimentos.

3- Efeitos da radiação com cobalto 60 na explosão respiratória de macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6.

Um parâmetro utilizado para investigar possíveis alterações induzidas pela radiação na funcionalidade de macrófagos foi a produção dos radicais de oxigênio. Os macrófagos peritoneais de camundongos irradiados (CI) foram incubados na presença de luminol e ativados com PMA, potente indutor da explosão respiratória em fagócitos, através da ativação da proteína quinase C (PKC) (GORDON *et al.*, 1974). A figura 4 mostra que os macrófagos de CI submetidos à dose de radiação de 2,0 Gy produzem baixas quantidades de intermediários reativos do oxigênio (ROIs) quando comparadas ao controle. Enquanto que as células provenientes de CI com a dose de 4,0 Gy parecem não apresentar diferenças significativas para células controle.

Os macrófagos apresentam função importante na regulação imunológica e proteção contra infecção por exercerem atividade endocítica intensa, secretarem enzimas, proteínas plasmáticas, ROIs e outros. De acordo com o estado de ativação, os macrófagos são classificados em residentes, inflamatórios e ativados. Macrófagos residentes estão presentes nos tecidos e demonstram atividade funcional e produção de ROIs baixas. Quando ativados, os macrófagos aumentam o consumo de oxigênio seguido de redução unieletrônica, levando à formação de ROIs (HALLIWELL *et al.* 1992).

A produção de ROIs é aumentada em macrófago devido à ativação de um complexo enzimático associado à membrana que é dependente de estímulos externos como ação de linfocinas ou quando uma partícula estranha, como microrganismos, entra em contato com a membrana plasmática. Neste caso, os ROIs formados atuam como microbicidas

possibilitando a destruição de microorganismos no interior do macrófago. Por outro lado, esses radicais agem também causando prejuízos as células e tecidos. Estudos mostraram que danos na membrana celular e organelas ocorrem como resultado direto da interação dos ROIs ou pela formação de peróxidos e seus produtos (COOPER *et al.*,2002). A capacidade dos radicais OH para iniciar e propagar a peroxidação em fosfolípídios de membrana pode levar a danos na membrana e conseqüentemente na célula devido à ruptura na integridade mitocondria, quebra na fita de DNA e inativação de proteínas (VITALA, P.E.*et al.*,2004).

O aumento da produção de ROIs constituem indicadores da ocorrência de ativação dos macrófagos. Estudos recentes mostraram que exposição a LDR (*Low dose ionizing radiation*) aumenta a função de macrófagos e resposta de células T CD8+ em camundongos C57BL/6 (PANDEY R. *et al.*,2005). A dose de 4,0 cGy *in vivo* induz a produção de ROIs por macrófagos que contribui para o aumento da atividade citotóxica de macrófagos após baixas doses de irradiação gama (H.SIGIURA *et al.*,2000). Os resultados encontrados na figura 4 revelam a importância da taxa de dose de cobalto 60 em macrófagos peritoneais. Por um lado, a redução na explosão respiratória observada na taxa de dose de 2,0 Gy sugere uma desativação de macrófagos, o que pode torná-los mais susceptíveis a infecções por microorganismos intracelulares. Enquanto que, a dose de 4,0 Gy parece não alterar a explosão respiratória de macrófagos, após cinco dias de irradiação. As três curvas possuem o mesmo formato a partir de 15 minutos, apresentando uma diminuição quase exponencial da leitura. Isto sugere que no tempo de 15 minutos provavelmente esteja ocorrendo máxima produção de ROIs e conseqüentemente maior ligação desses radicais ao luminol. Os resultados são apresentados na figura 8, A e B.

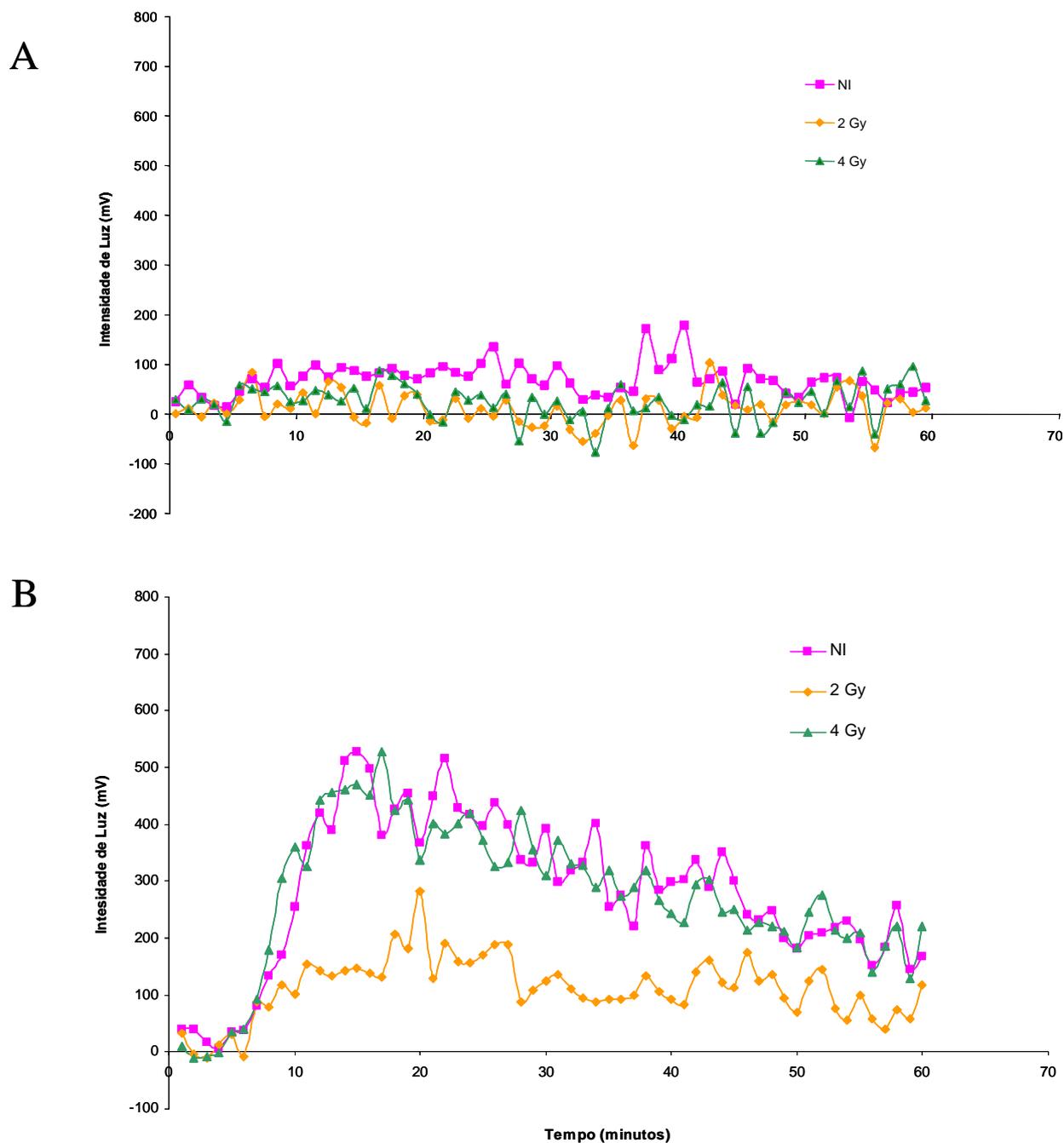


Figura 8 - Produção de ROIs por macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 irradiados com cobalto 60.

As células peritoneais foram recolhidos após 5 dias de irradiação nas doses de 2,0 Gy e 4,0 Gy. Os macrófagos controles (NI) e irradiadas ($1,0 \times 10^4$ células) foram incubadas com Luminol ($2,0 \times 10^{-4}$ M) na ausência (A) ou presença (B) de PMA. A produção de ROIs foi quantificada como descrito em material e métodos.

4- Efeitos do treinamento na explosão respiratória de macrófagos peritoneais submetidos à radiação por cobalto 60.

O exercício físico está associado à geração de radicais livres do oxigênio (COOPER *et al.* 2002; CAZZOLA *et al.*,2003 e ZOPPI, 2003). Já foi demonstrado que o exercício agudo e/ou crônico aumenta a quantidade de ROIs nos tecidos biológicos e esse aumento coincide com a presença de danos teciduais (CAZZOLA,2003). Neste estudo, o EF moderado foi utilizado por ativar efetivamente a produção de ROIs sem prejudicar diretamente os macrófagos. O efeito do EF foi observado em macrófagos de CI para a dose de 2,0Gy (Fig 5A e 5B) e 4,0Gy (Fig 9 A e B) e comparados com macrófagos controle (NI). Um parâmetro importante utilizado foi a duração da atividade física: 10 e 20 dias de treinamento. Nas figuras 5A e 6A podemos observar que, após 10 dias de EF, a explosão respiratória em macrófagos de CI com 2,0Gy e 4,0Gy respectivamente, teve um discreto aumento quando comparada a macrófagos de CI sedentários. Os níveis de produção de ROIs em macrófagos de CI treinados se aproximam daqueles produzidos por macrófagos controle. Esses dados sugerem o envolvimento do EF na recuperação da função de macrófago. Após 20 dias de EF (Fig. 5B e 6B) observamos que a explosão respiratória aumenta nos macrófagos de CI com 2,0Gy e 4,0Gy treinados e sedentários alcançando níveis acima do grupo controle, NI. Esses resultados ficam evidentes quando comparamos o perfil das três curvas do gráfico A com o B, tanto na figura 8 quanto na figura 9. Nossos resultados sugerem que a duração do EF é fator importante, não só na recuperação da função de macrófago como também na regulação positiva da função de produção de ROIs por essas células.

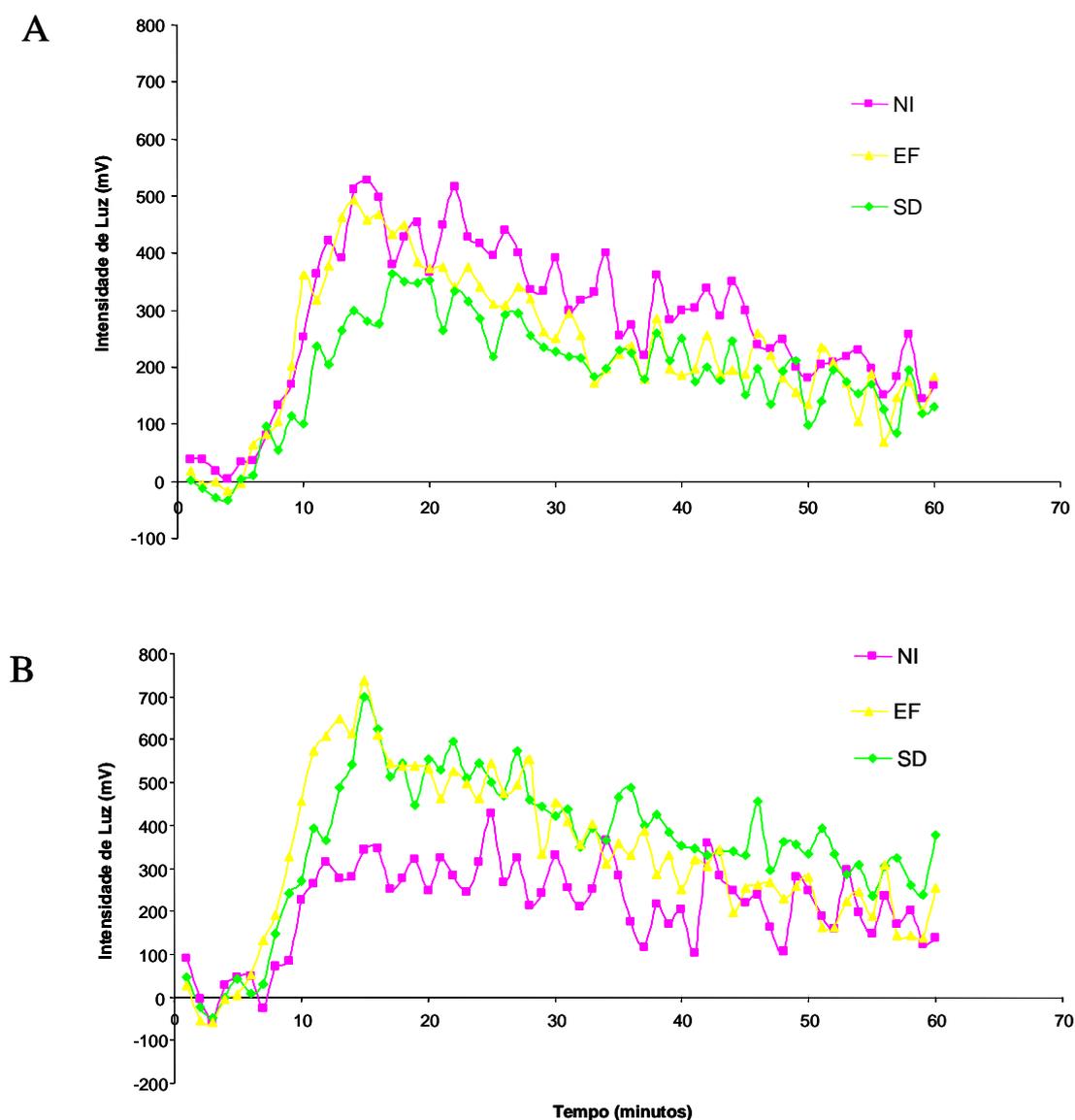


Figura 9 - Efeito do exercício físico na explosão respiratória de macrófagos peritoneais submetidos à radiação com cobalto 60.

Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 foram irradiados na dose de 2,0Gy e em seguida divididos em dois grupos: submetidos a exercício físico (EF) e sedentários (SD). Como controle foram utilizados macrófagos de camundongos não irradiados (NI). As células foram incubadas com luminol e PMA após 10 dias (A) e 20 dias (B) de treinamento. A produção de radicais livres do oxigênio era quantificada com descrito em Material e Métodos.

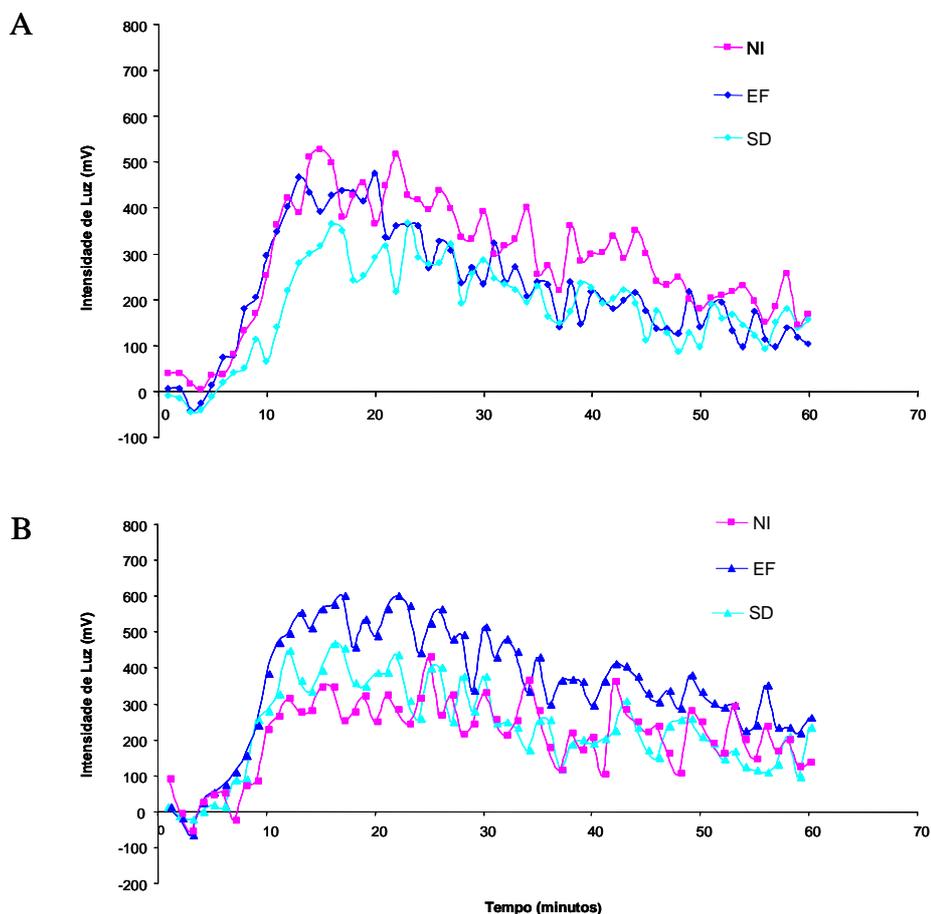


Figura 10 -Efeito do exercício físico na explosão respiratória de macrófagos peritoneais submetidos à radiação com cobalto 60.

Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 foram irradiados na dose de 4,0Gy e em seguida divididos em dois grupos: submetidos a exercício físico (EF) e sedentário (SD). Como controle foram utilizados macrófagos de camundongos não irradiados (NI). As células foram incubadas com luminol e PMA após 10 dias (A) e 20 dias (B) de treinamento. A produção de radicais livres do oxigênio era quantificada com descrito em Material e Métodos.

5- Produção de óxido Nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 submetidos a radiação por cobalto 60 e ativados com IFN- γ e LPS.

A produção de NO por macrófagos é dependente da natureza e ordem de sinais estimulatório. Vários autores mostraram que tanto a radiação ionizante quanto o exercício físico regulam positivamente a produção de NO por macrófagos ativados com IFN- γ e/ou

Lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) (IBUKI, 2000), mas não existem dados sobre o efeito conjunto da radiação e do EF na produção de NO por estas células. Assim, para determinar o efeito do exercício físico moderado na produção de NO por macrófagos peritoneais de CI, as células foram ativadas com IFN- γ associado a LPS, potentes indutores de NO. Foi observado que os macrófagos irradiados nas doses de 2,0 e 4,0 Gy e submetidos à EF por 10 e 20 dias não produzem concentrações quantificáveis de NO assim como as células NI. Esses dados mostram, como outros autores (NISHIZUKA, Y. 1992), que a radiação sozinha não é sinal ativador de macrófago para a produção de NO e que a associação com o EF não altera essa resposta de macrófago não ativado. Na figura 7A podemos observar, para ambas as doses de irradiação, que os macrófagos de CI sedentários tratados com IFN- γ e LPS, produziram menos NO do que macrófagos controle (NI) também tratados. Já os macrófagos provenientes de camundongos irradiados e treinados por um período de 10 dias, produzem mais NO do que macrófagos CI sedentários. Essa diferença é maior em camundongos que receberam a dose de 4,0Gy de irradiação quando comparamos dentro do grupo de CI sedentário e treinado como quando comparamos CI sedentários e NI (Fig. 7A). Após 20 dias de treinamento os macrófagos de CI sedentários atingem níveis de NO₂-próximos dos macrófagos controle. O treinamento durante 20 dias parece não alterar a produção de NO por macrófagos de CI em nenhuma das doses de irradiação utilizadas (Fig 7B).

Os dados da literatura referentes ao papel da radiação ionizante na regulação da produção de NO por macrófagos mostram que altas doses (6,0 Gy) e baixas doses (1,0-5,0 Gy) de irradiação aumentam a indução da proteína NOS2 por macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 e por linhagem celulares de macrófagos J774.1 e RAW 264.7 respectivamente, quando ativadas com IFN- γ e/ou LPS e conseqüentemente a produção de NO. Diferentemente, nossos dados mostram que macrófagos de CI produzem menos NO que o controle e que o EF pode contribuir para os níveis de NO de macrófagos de CI alcançarem os níveis produzidos por macrófagos NI. Esse resultado contrário pode ser explicado por dois fatos: nossos experimentos foram realizados *in vitro* com células de animais previamente irradiados, diferentemente dos demais trabalhos onde os macrófagos eram obtidos dos animais para posterior irradiação *in vitro* (PANDEY et al. 2005). Outro fato importante a ser discutido é que a avaliação da produção de NO realizada por outros autores foi 24 horas após irradiação em contraste com os tempos de 10 e 20 dias usada em nosso experimento.

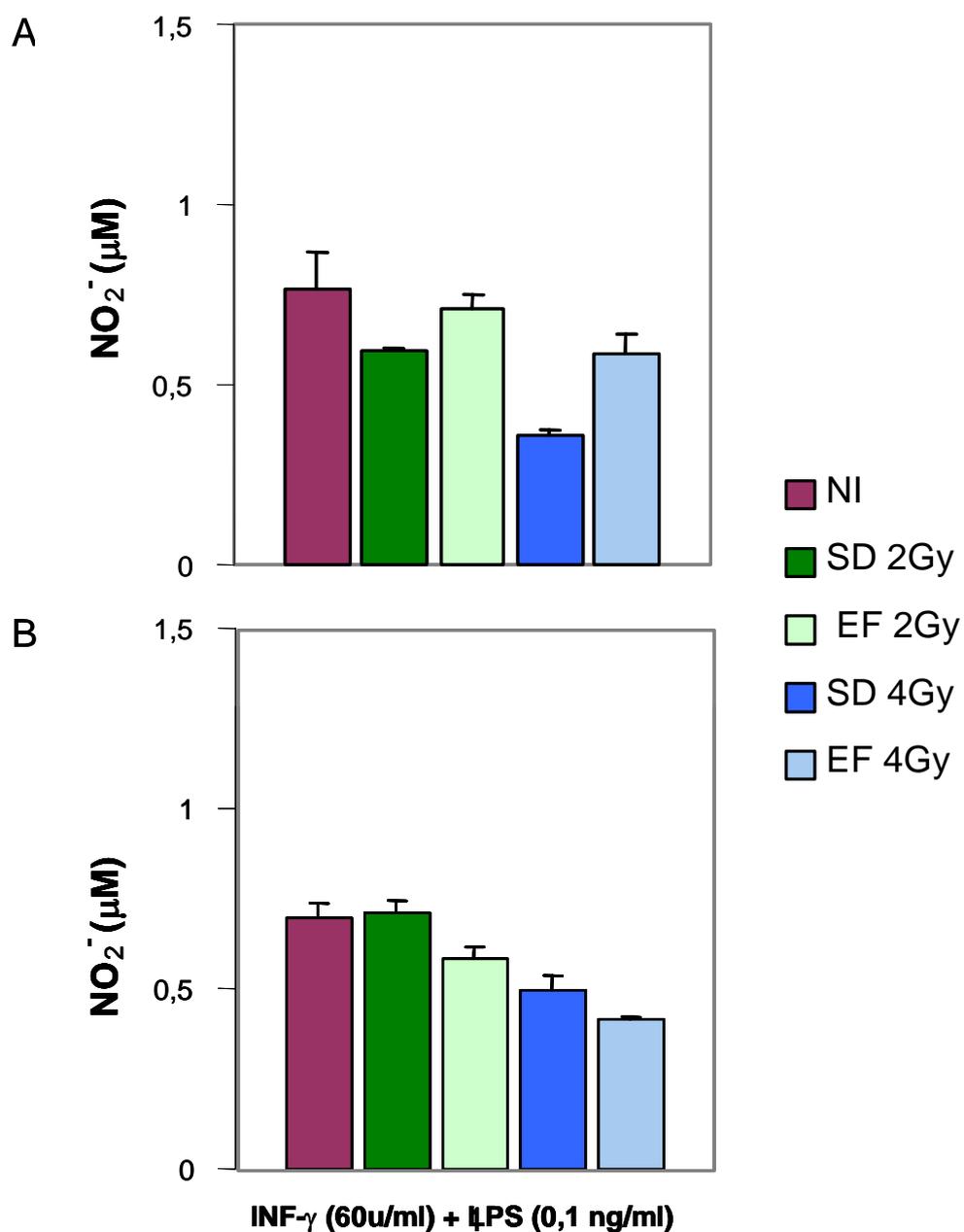


Figura 11 – Produção de NO por macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 submetidos à radiação por cobalto 60 e ativados com IFN-γ e LPS.

Macrófagos peritoneais de camundongos C57BL/6 irradiados com 2,0Gy e 4,0Gy de cobalto 60 foram recolhidos após 10 (A) e 20 dias (B) de treinamento (EF). As células foram tratadas com IFN-γ na concentração de 60 U/mL combinada com 0,1 ng/mL de LPS e após 48 horas incubação, o nitrito foi quantificado no sobrenadante das culturas celulares.

CONCLUSÃO

As conclusões decorrente desse estudo foram:

- A irradiação *in vivo* de camundongos C57BL/6 com cobalto 60 com taxas de dose de 2,0 Gy.h⁻¹ e 4,0 Gy.h⁻¹ não afeta a viabilidade de macrófagos peritoneais que permanecem em cultura, como o controle, por 24 e 48 horas.
- A dose de radiação modula a explosão respiratória de macrófagos de camundongos C57BL/6. Assim, a dose de 2,0 Gy parece inibir a produção de intermediários reativos do oxigênio (RÓIs) quando comparadas ao controle, enquanto a dose de 4,0 Gy parece não alterar essa função.
- O EF moderado mostrou-se necessário na recuperação de função de explosão respiratória de macrófagos provenientes de camundongos C57BL/6 irradiados com Cobalto 60 na taxa de 2,0 Gy.h⁻¹
- A duração do EF é fator importante, não só na recuperação de macrófagos de camundongos irradiados como também na regulação positiva de função de produção tanto de RÓIs como de NO, por essas células.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 - Andreas von Knethen and Bernhard Brune (2002) Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor α by Nitric Oxide in Monocytes/Macrophages Down-Regulates p47 $phox$ and Attenuates the Respiratory Burst. *The Journal of Immunology*; 169: 2619–2626.

2 - Anjali Agrawal, Dharamainder Choudhary, Meenakshi Upreti, P.C.Rath and R.K. Kale (2001) Radiation induced oxidative stress: I. Studies in Ehrlich solid tumor in mice. *Molecular and Cellular Biochemistry* 223: 71–80.

3- Belosevic, M., C. E., Meltzer, M. S. & Nacy, C. A. (1988). Regulation of activated macrophage antimicrobial activities: identification of lymphokines that cooperate with IFN- γ induction of resistance to infection. *The Journal of Immunology* 141: 890-896.

4 - Castro, Robson Costa (2005). Cálculo de Dose Equivalente em órgãos de pacientes a Fotonêutrons Gerados em Aceleradores Lineares Clínicos. Dissertação de Mestrado, Departamento de Engenharia Nuclear, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

05 - Cláudia Dornelles Schneider e Alvaro Reischak de Oliveira.(2004). Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico. *Rev Bras Med Esporte* _ Vol. 10, Nº 4.

06 - Cazzola R, Russo-Volpe S, Cervato G, Cestaro B.(2003). 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

07 –CNEN-NN-3.01 Norma, Diretrizes Básicas de Proteção Radiológica (2005).
Resolução CNEN 27/2005, Alterações DOU 14/11/2005

08 - CNEN. Yannick Nouailhetas *et al.*(2002).Radiações ionizantes e a vida, apostila educativa.

09 - Cooper CE, Vollaard NB, Choueiri T, Wilson MT.(2002) Exercise, free radicals and oxidative stress. *Biochem Soc Trans*; 330:280-5.

10 - Droge W.(2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physical Ver* ; 82:47-95.

11 - Ferrandez & Fuente (1999) Effects of age, sex and physical exercise on the phagocytic process of murine peritoneal. *Acta Physiologica Scandinavica* ; 166 : 47

12 -Ferrari, M., Fornasiero, M.C., Isetta, A.M.(1990). MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *J Immunol Methods*. 131(2):165-72,

13- Galle, Pierre e Paulin, R. (2000) In *Biophysique 1, Radiobiologia e Radiopatologia*. Masson, Paris.

14 -Gordon, S., Unkeless, J. C. & Cohn, Z. A. (1974). Induction of macrophage plasminogen activator by endotoxin stimulation and phagocytosis; evidence for a two-stage process. *J. Exp. Med*. 140: 995-1010.

15 - Halliwell, B., Gutteridge, J. M. C. & Cross, C. E. (1992). Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J. Lab. Clin. Med*. 119: 598-620.

16 - Hernandez, Flores G.,Gomes, Contreras PC, Dominguez,Rodriguez JR, Lerma Diaz JM, Ortiz, Lazareno PC, Cervantes, Munguia R.(2005). Gamma-Irradiation induce apoptosis in peritoneal macrophages by oxidative stress. Implications of oxidants in caspase mitochondrial pathway. *Anticancer Research*; 25: 4091-4100.

17 - Hibbs, J. B. Jr., Taintor, R., Vavrin, Z. & Rachlin, E. (1988). Nitric Oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Bioch. Biophys. Res. Commun*. 157 (1): 87-94.

18 - Hildebrandt, Guido (2003). Inhibition of the iNOS Pathway in Inflammatory Macrophages by Low-Dose X-Irradiation In Vitro. Is There a Time Dependence? *Strahlentherapie und Onkologie*. 2003. 158 – 166

19 – IAEA International Atomic Energy Agency (2001). “*Absorbed dose determination in external beam radiotherapy: An International Code of Practice for Dosimetry based on Standards of Absorbed Dose to Water*”. Technical Report Series n 398, IAEA, Vienna

20- Ibuki, Y e Goto,R (2000). Enhancement of O₂- production from resident peritoneal macrophages by low-dose in vivo gamma-irradiation. *Biology Pharmacology Bull*; 23(9):1094-1096

21 - ICRP 60; (1991) “*1990 Recommendations of the International Commission on Radiological Protection*”. Annals of ICRP, 21, Nos.

22 - Jiho Min · Chang Woo Lee · Man Bock Gu (2003). Gamma-radiation dose-rate effects on DNA damage and toxicity in bacterial cells.*Radiat Environ Biophys*; 42:189–192

23- Kubota, Yoshihisa .Radiation-Induce Apoptosis in Peritoneal Resident macrophages of C3H Mice (2004). *J. radiat. Res.-*. vol.45: 205-211

24 -Labejof LP (1998). Estudo Estrutural das Lesões Precoces Induzidas em Células de Ratos por Amerício 241. Tese de Doutorado, Universidade de Paris XII- Val de Marne.P.18-28.

25- Galle P, Mangabeira PA, de Oliveira AH, Severo M.I (2002). Histological changes in rat duodenum mucosa after whole-body gamma irradiation. *Cell Mol Biol* 48(5):537-45.

26 - Lamprecht M, Greilberger J., Oettl K. (2004) Analytical aspects of oxidatively modified substance in sports and exercise. *Nutrition*; 20: 728-730.

27 - Leandro, Carol *et al.* (2002), Exercício físico e sistema imunológico: mecanismos e integrações. *Revista Portuguesa de Ciências do Desporto*, vol. 2, 80–90

28- Mcknney, Leslie C. (2004) Ionizing Radiation Potentiates the Induction of Nitric Oxide Synthase by Interferon- and/or Lipopolysaccharide in Murine Macrophage Cell Lines. *Radiation Biology Branch, National Cancer Institute, Bethesda, Maryland 20892, USA.*

- 27- Menegello C. Marcela(2004). Efeito do treinamento moderado sobre o metabolismo de macrófagos de ratos envelhecidos.Tese de Doutorado Instituto de ciências Biomédicas da USP. P.16-17; 63- 68.
- 28 - Nathan, C. F. (1992). Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB Journal* 6: 3051 – 3064.
- 29 - Nishizuka, Y. (1992). Intracelular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258: 607-614.
- 30 - Pandey R, Shankar BS, Sharma D, Sainis KB. (2005); Low dose radiation induced immunomodulation: effect on macrophages and CD8+ T cells. *Int J Radiat Biol.* 81(11):801-12
- 31 - Q. Lu, M. A. Ceddia, E. A. PricE, S.-M. YE, and J. A. woods (1999) Chronic exercise increases macrophage-mediated tumor cytolysis in young and old mice. *American Physiological Society* 368:480-489
- 32 - Reury F.P. Bacurau, Francisco Navarro, Reinaldo A.B., Marcela Meneguello, Ronaldo V.Santos, André L.R.Almeida e Luis F.B.P. Costa Rosa (2003). Does exercise Training with the effects of l-Carnitina supplementation. *Nutrition*; 19:337-341.
- 33 - Robinson, J. M & Badwey, J. (1994). Production of active oxygen species by phagocytic leukocytes. *Immunology Series* 60: 159-178.
- 34 - Rosen, G. M., Pou, S., Ramos, C. L., Cohen, M.S. & Britigan, B. E. (1995). Free radicals and phagocytic cells. FAESEB (Federation of American Societies for Experimental Biology) Journal 9: 200-209.
- 35 – Santos, Jane Lima (2002) Determinantes moleculares da sensibilidade diferencial a INF, TNF ou LPS para a produção de óxido nítrico por macrófagos de camundongos

BALB/c e C57BL/6. Tese de Doutorado, Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais. P. 5-8.

36 -Schaberle, Fábio Antonio e Nelson Canzian da Silva (2000). Introdução à Física da Radioterapia, Cap.05. Centro de Ciências Física e Matemática, Depto de Física,UFSC.

37 - Segal, A. W. & Abo, A. (1993). The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. *Trends in Biochemical Sciences* 18:43-47.

38 - Sigiura, H. Sigiura, H. Nishida,R. Inaba, S. Mirbod e H. Iwata. (2000) Immunomodulation by 8-week voluntary exercise in mice. *Acta Physiologica Scandinavia*; 168, 413-420.

40 - Sousa-Franco J, Araujo-Mendes E, Silva-Jardim I, L-Santos J, Faria DR, Dutra WO, Horta Mde F. (2006). Infection-induced respiratory burst in BALB/c macrophages kills *Leishmania guyanensis* amastigotes through apoptosis: possible involvement in resistance to cutaneous leishmaniasis. *Microbes Infect.* 8(2):390-400.

41- Susu M. Zughaiier,William M. Shafe e David S. Stephens (2005).Antimicrobial peptides and endotoxin inhibit cytokine and nitric oxide release but amplify respiratory burst response in human and murine macrophages. *Cellular Microbiology* ;7(9)1251–1262

42 - Tácio Pessoa de Souza Jr., Paulo Roberto de Oliveira e Benedito Pereira (2005). Exercício físico e estresse oxidativo: Efeitos do exercício físico intenso sobre a quimioluminescência urinária e malondialdeído plasmático. *Rev Brasileira Medicina e Esporte* ,vol. 11, 91-96.

43- Viera, Abel José de Souza.(2003). Radicais oxidantes: da Química à Biologia. Grupo Radicais Livres. *Química Destaque* 100, 66-71.

44 - Xie, X., Cho, H.J., Calayacay, J., Mumford, R.A., Swiderek, K.M., Lee, T.D., Ding, A., Troso, T. & Nathan, C. (1992). Cloning and characterization of inducible nitric oxide synthase from mouse macrophages. *Science* 256: 225-28.

45 - Vancini. Rodrigo L., Lira Claudio, Aboulafia Jeannine e Nouailhetas Viviane.(2005). Radical Livre, estresse oxidativo e exercício. Centro de estudos de Fisiologia do Exercício. USP.

46 - Vitala P. E., Newhouse I. J., LaVoie N.Gottardo C.(2004).The effects of antioxidant Vitamin supplementation on resistanse exercise Induced lipid peroxidation in treined and untrained participantes. *Lipids Helth Dis*; 3: 14.

47 - Zoppi CC, Antunes-neto J, Catanho FO, Goulart LF, Motta e Moura N, Vaz de Macedo D.(2003); Alterações em biomarcadores de estresse oxidativo, defesa antioxidante e lesão muscular em jogadores de futebol durante uma temporada competitiva. *Ver Paul Educ Fis* ,v17: 119-30.

48 - Yoshihisa Kubota, Sentaro Takahashi,Hiroshi Sato, Katsutoshi Suetomi e Shiro Aizawa (2004). Radiation induce apoptose in Peritoneal Residente Macrophages of C3H mice. *J. Radiation Research*; 45, 205-211.

49 - Web site de Imunologia. [Http://medstudents.com.br](http://medstudents.com.br).

50 – Woods, J.A. Q. Lu, M.A. Ceddia e T. Lowder (2000) Exercise-induced modulation of macrophage function. *Immunology and Cell Biology*; 78: 545–553.

ANEXO

Tabela 1- Média e desvio padrão da leitura de intensidade de Luz (mV) referentes ao gráfico 4A

Tempo (minutos)	NI	std	2 Gy	std	4 Gy	std
1	NI	std	0,5	5,875	29,25	44,27
2	25,5	27,598				
3			10,625	11,13	8,375	17,11
4	58,625	12,193				
5			-5,375	-9,75	31,125	27,89
6	33,625	44,11				
7			22,125	29,94	19,375	9,678
8	17,875	40,324				
9			0,25	-9,063	-14,75	28,12
10	15	54,237				
11			28,875	14,38	57,375	47,35
12	45,375	56,865				
13			84,125	46,06	50,625	43,43
14	72,125	50,076				
15			-4,75	-19,06	44,75	25,79
16	54	52,798				
17			19,875	15,75	57,125	48,18
18	101,38	92,987				
19			11	-11,56	25,25	26,5
20	56,25	26,845				
21			42,5	34,94	27	36,81
22	76,5	59,74				
23			0,25	-8,875	47,75	35,22
24	98,75	42,903				
25			66	88,25	39,25	9,43
26	75	43,947				
27			53,625	52,13	25,625	63,19
28	94,125	32,357				
29			-5,625	-0,125	52,625	58,7
30	87,875	48,121				
31			-18,13	-33,06	10,625	67,46
32	75,875	66,775				
33			57,875	44,81	87,625	37,17
34	82,875	32,541				
35			-8	-4,563	78	51,44
36	92,5	106,43				
37			37,125	21,56	61,375	74,1
38	77,875	38,889				
39			39	41,16	40,5	77,13
40	71,125	65,777				
41			-14	-20,69	-1,25	37,66
42	83,25	87,733				
43			-11,25	-28,75	-16	55,52
44	95,5	107,19				
45			31,375	25,81	44,875	53,49
46	84,375	69,202				
47			-8,5	-1,375	28,25	50,7
48	76	31,654				
49			11,375	11,81	38,625	66,31
50	102,13	70,155				
51			-3,875	-8	13,125	66,87
52	134,88	70,656				
53			27,625	29,38	39,625	40,75
54	60,375	62,329				
55			-15,38	-11,56	-54,625	26,41
56	102,88	126,58				
57			-26,88	-42,13	33,625	75,92
58	71,125	52,675	0,5	5,875		
59	NI	std			-0,25	16,86
60	25,5	27,598	10,625	11,13		

Tabela 2 – Média e desvio padrão da leitura de intensidade de Luz (mV) referentes ao gráfico 4B.

Tempo (minutos)	NI	std	2 Gy	std	4 Gy	std
1	39	20,785	32,75	28,12	9	32,2
2	38,625	37,63	-4,625	29,55	-10,875	18,14
3	17,125	54,815	-10,13	31,54	-8,375	45,54
4	4,625	26,651	12,875	25,86	-2,125	31,82
5	35	32,088	30,25	59,12	35,25	47,72
6	36,625	41,023	-8,375	44,36	40,125	46,2
7	80,375	45,519	86,875	48,89	91,875	34,11
8	132,75	31,542	78,5	62,83	180,25	26,95
9	170,88	27,767	117,88	32,96	304,88	18,01
10	254	47,12	100,5	18,03	359,75	19,05
11	363,25	137,2	154,75	42,43	326,75	39,49
12	420,75	88,167	143,75	74,05	442	114,8
13	390,5	110,12	133,5	25,3	456	78,93
14	511,38	82,209	143,38	71,17	460,88	47,97
15	528,38	169,76	148,38	69,18	470,88	69,52
16	497,88	98,959	137,63	100,5	451,63	52,52
17	381,13	32,752	132,38	56,72	527,13	46,38
18	427,75	63,606	206,75	72,98	425,25	64,06
19	454,13	80,641	181,13	29,76	442,63	65,47
20	366,13	68,435	283	165,6	337,5	50,26
21	449,25	82,112	129,5	89,6	401,5	45,6
22	517	120,19	190,25	98,65	384,25	31,84
23	428,13	79,425	158,88	66,07	400,88	95,73
24	418	38,583	156,75	29,03	420	90,71
25	396,13	103,56	170,13	97,26	372,38	78,37
26	439,13	79,693	189,13	47,36	325,88	37,32
27	399,88	61,581	188,88	73,32	332,63	55,41
28	336,63	91,361	88,625	63,07	425,38	64,87
29	332,88	63,683	107,63	53,98	355,38	47,96
30	392,25	98,652	124,25	48,6	311	22,55
31	299	68,563	136,5	45,07	372,5	104,4
32	318,38	103,65	110,88	36,3	330,63	65,19
33	332,63	98,268	95,375	62,02	329,13	107,1
34	400,75	31,209	88,5	64,06	288,25	48,64
35	255,25	49,648	93	52,53	320	79,43
36	274,88	42,366	91,625	58,69	272,38	96,01
37	220,88	88,149	99,375	101,8	289,63	34,38
38	362,38	61,43	132,63	48,96	319,63	78,29
39	284,13	83,66	106,88	43	265,63	77
40	298,88	80,071	92,375	34,47	242,88	73,72
41	303,38	60,083	82,625	51,72	227,88	37,97
42	337,63	82,867	140,13	73,78	293,38	64,33
43	290	47,854	160,75	75,51	302,25	49,97
44	350,38	124,66	121,88	41,28	246,88	75,75
45	300,13	111,19	112,13	50,74	249,38	38,6
46	240,13	34,142	174,88	34,79	213,13	84,1
47	233,13	43,962	123,63	58,8	227,88	27,91
48	248,88	32,868	136,38	15,38	220,13	51,42
49	200,38	28,93	93,625	51,78	212,38	96,31
50	180,75	72,039	69,25	44,71	183,75	80,23
51	204	57,02	124	46,09	246,75	60,81
52	209,75	78,371	144,5	25,57	276,5	68,74
53	217,38	84,627	76,625	29,17	212,63	92,75
54	230,38	132,49	55,625	35,64	201,13	13,33
55	197,25	77,989	99	39,79	209	98,91
56	150,88	60,536	57,125	37,64	139,63	93,09
57	184,5	107,09	40,5	67,76	185,5	59,37
58	256,75	69,749	75	37,11	221,25	36,92
59	145	77,047	58,5	41,16	129,75	27,59
60	168,63	33,297	117,63	71,23	221,38	50,65

Tabela 3– Média e desvio padrão da leitura de intensidade de Luz (mV) referentes ao gráfico 5A.

Tempo (minutos)	NI	std	2 Gy EF	std	2 Gy SD	std
1	39	20,785	17	10,8	1,5	26,3
2	38,625	37,63	-6,125	38,3	-12,13	17,5
3	17,125	54,815	-1,375	29,9	-28,13	68,8
4	4,625	26,651	-16,13	12,6	-32,88	51,9
5	35	32,088	-2	40,8	4,75	40,9
6	36,625	41,023	63,88	30,8	10,875	32,5
7	80,375	45,519	83,38	25,4	95,875	67,6
8	132,75	31,542	105,3	48	54,75	50,3
9	170,88	27,767	201,9	46,4	115,13	47,9
10	254	47,12	361	79,1	101	17,1
11	363,25	137,2	318	54,6	236,75	53,2
12	420,75	88,167	377	101	203,75	38,1
13	390,5	110,12	463,3	149	264,25	50,5
14	511,38	82,209	493,1	110	299,88	35,5
15	528,38	169,76	457,9	136	281,63	60,9
16	497,88	98,959	468,6	116	276,38	68,5
17	381,13	32,752	433,6	56,5	363,63	15,5
18	427,75	63,606	449,3	61,1	349,5	84,5
19	454,13	80,641	384,9	75,5	348,13	69,8
20	366,13	68,435	372,6	57,7	352,13	58,8
21	449,25	82,112	376	94,9	265	38,2
22	517	120,19	341,8	51,8	334,5	58,5
23	428,13	79,425	376,1	59,8	315,38	85
24	418	38,583	340,5	67,4	284,75	86,3
25	396,13	103,56	310,6	94,4	218,88	24,1
26	439,13	79,693	308,1	128	292,38	133
27	399,88	61,581	341,4	112	295,38	98,2
28	336,63	91,361	318,9	18,1	254,38	56,3
29	332,88	63,683	262,6	65,9	235,13	65,9
30	392,25	98,652	251,8	79,4	228,5	45,1
31	299	68,563	295,5	23,4	219,25	27,2
32	318,38	103,65	255,4	85,4	215,13	92,4
33	332,63	98,268	172,4	61,3	183,88	48,4
34	400,75	31,209	198,5	43,2	197,5	14,1
35	255,25	49,648	224	65,2	229,5	95,3
36	274,88	42,366	235,9	58,2	224,38	78,6
37	220,88	88,149	178,6	59,8	179,38	53,3
38	362,38	61,43	285,1	53,2	259,38	74,3
39	284,13	83,66	197,4	91,2	211,63	115
40	298,88	80,071	185,1	38,1	249,88	66,1
41	303,38	60,083	198,6	104	175,13	94,8
42	337,63	82,867	255,4	78,9	201,13	101
43	290	47,854	189	22,8	178	98,5
44	350,38	124,66	195,6	65,3	245,88	96,5
45	300,13	111,19	188,4	36,5	152,63	74,4
46	240,13	34,142	261,1	53	198,38	48,8
47	233,13	43,962	219,9	93,2	134,38	82,9
48	248,88	32,868	181,6	10,9	192,88	70,2
49	200,38	28,93	155,1	33,4	211,13	79,4
50	180,75	72,039	134,3	22,7	98	38,5
51	204	57,02	235	82,2	139,5	34,8
52	209,75	78,371	210	33,8	196,25	45,9
53	217,38	84,627	172,9	114	175,63	28,5
54	230,38	132,49	106,1	48	153,38	31,2
55	197,25	77,989	187,8	48,4	169,75	71,9
56	150,88	60,536	68,38	65,5	127,13	90,8
57	184,5	107,09	146	67,8	84	53,6
58	256,75	69,749	175,8	56,2	196,5	102
59	145	77,047	124,3	88,5	118,5	56,7
60	168,63	33,297	183,1	44,5	131,13	46,9

Tabela 4– Média e desvio padrão da leitura de intensidade de Luz (mV) referentes ao gráfico 5B.

Tempo (minutos)	NI	std	2 Gy EF	std	2 Gy SD	std
1	90,875	31,405	26,13	8,83	46,625	22,65
2	-5,375	29,348	-55,88	35,4	-24,88	50,16
3	-56,125	43,147	-57,63	42,7	-49,63	18,65
4	25,625	58,392	-3,375	50,6	-2,125	31,94
5	46,125	81,291	4,875	11,9	41,375	23,9
6	48	91,864	52,75	119	8,25	38,77
7	-26,625	15,327	130,4	73,1	30,125	55,89
8	70,5	51,61	192,5	62,3	146,5	85,15
9	83,625	35,5	327,1	86,9	242,38	77,96
10	225,63	53,876	456,9	58	269,63	64,87
11	264,25	46,371	571,5	83,8	393,5	70,37
12	313,5	136,3	606	166	364,25	115,2
13	275,38	49,645	648,4	104	486,38	98,7
14	278,88	54,219	614,1	45,8	541,38	47,69
15	343,63	107,27	736,6	137	700,38	84,94
16	344,38	87,971	610,9	59,3	623,63	131,7
17	250,63	155,91	543,9	90,8	511,88	84,96
18	275,25	113,81	539	68,2	543,25	87,24
19	319,5	146,43	537	144	446,5	26,92
20	248,13	117,65	532,9	122	552,94	131,4
21	324,25	35,92	463	89	529	66,34
22	282	23,977	526,5	69	594	83,74
23	243,75	45,273	498	52	511,25	90,92
24	315,38	145,9	461,1	103	545,13	82,65
25	428,13	67,377	543,9	147	499,13	67,72
26	267,75	89,693	476	87,4	468,5	46,93
27	324,25	119,17	494,8	76,7	573,5	42,09
28	213,63	112,71	553,9	77,6	459,63	82,15
29	242,88	66,056	334,6	43,7	444,13	81,39
30	329,5	93,76	452,3	97,1	422,75	101,1
31	255,13	65,825	408,9	78,5	435,88	23,47
32	210,88	106,14	353,9	31,4	347,38	102,5
33	251,88	53,15	402,4	136	394,13	45,83
34	363,25	140,72	310	36,1	364	87,46
35	281,13	96,045	358,1	134	465,88	84,02
36	176,75	47,954	330,3	49,2	487	301
37	115,25	87,704	387,5	133	400,75	76,12
38	217,5	57,799	286,8	25,4	425,5	210,6
39	169,5	55,03	329,5	106	385	169
40	204,88	57,602	250,9	55	353,13	39,46
41	102,5	55,12	319,3	30,2	345,5	69,98
42	359,38	165,48	304,9	119	328,63	47,76
43	281,38	123,88	341,6	98,4	339,63	115
44	248,75	77,595	199	66,4	340,75	158,6
45	220,38	25,474	253,6	37,4	330,13	56,99
46	237,5	69,207	259	69	457,25	92,01
47	162,75	105,85	266	118	294,5	122,4
48	106	91,383	229,5	61,1	361,5	78,7
49	280	93,361	256	62,1	355	41,92
50	249	117,93	279	51,6	334,5	76,41
51	188,63	46,936	163,9	136	393,63	119,7
52	161,13	91,799	163,6	46,3	332,88	50,29
53	293,75	71,881	221,3	36,4	285,75	83,32
54	198	97,77	245	63	307,5	81,33
55	147	80,093	187,3	72,3	236,5	66,86
56	236,75	38,664	307,8	103	304,25	27,08
57	168,25	57,506	145	61,4	324,25	21,36
58	200,13	61,223	144,9	113	261,63	86,41
59	122,75	75,958	136	57,3	237	122,9
60	137	38,323	253	144	377	97,33

Tabela 5– Média e desvio padrão da leitura de intensidade de Luz (mV) referentes ao gráfico 6A.

Tempo (minutos)	NI	std	2 Gy EF	std	2 Gy SD	std
1	39	20,785	6,75	15,86	-9,25	20,61
2	38,625	37,63	6,125	33,19	-14,13	39,1
3	17,125	54,815	-41,1	30,08	-43,88	16,31
4	4,625	26,651	-24,4	20,16	-39,88	34,33
5	35	32,088	13,5	43,39	-10,5	46,5
6	36,625	41,023	74,88	18,24	20,88	35,33
7	80,375	45,519	77,88	32,15	40,38	47,96
8	132,75	31,542	179,8	50,61	51,5	24,67
9	170,88	27,767	204,9	68,48	113,1	24,96
10	254	47,12	296,5	52,13	66	29,97
11	363,25	137,2	348,8	75,64	141	31,29
12	420,75	88,167	402,5	104,3	219,3	83,59
13	390,5	110,12	466,8	40,47	280	59,18
14	511,38	82,209	434,6	102,8	300,9	40,87
15	528,38	169,76	392,9	53,98	317,9	88,3
16	497,88	98,959	428,9	79,41	365,9	70,41
17	381,13	32,752	438,9	44,55	351,4	75,31
18	427,75	63,606	434,3	82,17	243,5	52,92
19	454,13	80,641	416,1	42,08	252,6	56,16
20	366,13	68,435	475,1	159,6	293,1	27,39
21	449,25	82,112	337,5	68,89	318,3	72,67
22	517	120,19	361,5	89,91	219	104,9
23	428,13	79,425	365,4	19,4	367,9	14,86
24	418	38,583	360,8	46,74	292	30,51
25	396,13	103,56	270,1	13,63	277,6	74,86
26	439,13	79,693	328,6	44,27	279,9	70,87
27	399,88	61,581	307,9	34,87	322,9	98,78
28	336,63	91,361	236,6	93,13	192,1	93,25
29	332,88	63,683	270,1	33,95	257,9	44,5
30	392,25	98,652	234	42,98	287,5	24,43
31	299	68,563	324	44,33	246,5	47,58
32	318,38	103,65	237,9	67,03	235,6	58,81
33	332,63	98,268	271,6	80,56	223,1	42,7
34	400,75	31,209	207,8	46,74	195	98,98
35	255,25	49,648	238,5	30,03	229,5	27,06
36	274,88	42,366	232,6	73,03	163,6	82,17
37	220,88	88,149	140,1	74,85	148,6	45,92
38	362,38	61,43	239,6	93,73	174,1	32,17
39	284,13	83,66	147,6	33,2	237,4	111,3
40	298,88	80,071	217,9	44,14	226,6	88,68
41	303,38	60,083	197,4	47,7	193,1	60,35
42	337,63	82,867	179,6	64,36	203,4	68,5
43	290	47,854	198,8	65,06	222,8	36,16
44	350,38	124,66	216,6	36,97	192,4	52,6
45	300,13	111,19	176,6	54,37	112,6	16,96
46	240,13	34,142	136,4	33,04	177,1	74,28
47	233,13	43,962	137,1	44,98	127,9	46,89
48	248,88	32,868	127,1	60,74	87,38	38,69
49	200,38	28,93	218,4	84,67	129,4	86,11
50	180,75	72,039	142	103,7	96,75	41,8
51	204	57,02	191,8	18,89	190	29,33
52	209,75	78,371	195	85,95	160,3	55,97
53	217,38	84,627	132,4	64,46	167,4	85,74
54	230,38	132,49	98,13	37,87	145,4	94,53
55	197,25	77,989	173,8	104	123	35,12
56	150,88	60,536	113,1	23,17	94,13	92,98
57	184,5	107,09	97,25	35,42	150,8	103,6
58	256,75	69,749	138,5	56,61	181	29,68
59	145	77,047	118,8	110,3	139,8	78,75
60	168,63	33,297	104,4	51,6	157,6	99,03

Tabela 6– Média e desvio padrão da leitura de intensidade de Luz (mV) referentes ao gráfico 5B.

Tempo (minutos)	NI	std	4Gy EF	std	4Gy SD	std
1	90,875	31,405	10,88	26,02	12,375	19,81
2	-5,375	29,348	-18,4	14,17	-14,125	16,88
3	-56,125	43,147	-64,6	32,49	-23,125	35,89
4	25,625	58,392	23,63	25,23	0,875	73,15
5	46,125	81,291	50,88	42,95	18,375	42,25
6	48	91,864	75,5	9,535	11,25	43,5
7	-26,625	15,327	108,9	69,75	85,875	60,99
8	70,5	51,61	156	114,5	91	50,82
9	83,625	35,5	239,1	72,56	255,63	126,2
10	225,63	53,876	382,4	125,3	280,38	62,25
11	264,25	46,371	469,5	87,8	326,25	72,23
12	313,5	136,3	494,5	80,92	449	38,67
13	275,38	49,645	552,9	92,07	362,88	65,11
14	278,88	54,219	510,9	164,9	332,88	44,41
15	343,63	107,27	562,6	108,9	392,63	62,68
16	344,38	87,971	575,9	179,7	468,13	84,99
17	250,63	155,91	600,4	63,71	455,13	70,98
18	275,25	113,81	456,3	178,2	358	45,89
19	319,5	146,43	534	92,05	347,5	74,09
20	248,13	117,65	489,9	43,67	385,19	101,1
21	324,25	35,92	563	126,7	385,75	107,3
22	282	23,977	599,8	140,6	435,5	83,59
23	243,75	45,273	571,3	76,58	309	56,99
24	315,38	145,9	442,9	90,66	257,38	89,65
25	428,13	67,377	523,1	133,5	396,63	96,37
26	267,75	89,693	563	75,85	400,5	78,92
27	324,25	119,17	477,8	21,46	248	72,69
28	213,63	112,71	492,6	103	377,88	73,65
29	242,88	66,056	335,4	87,99	278,88	120,8
30	329,5	93,76	513	84,79	375,5	100,9
31	255,13	65,825	428,4	59,57	244,88	74,48
32	210,88	106,14	479,4	58,34	247,38	24,26
33	251,88	53,15	446,1	142,2	234,38	113,1
34	363,25	140,72	333,8	123,8	170,5	64,08
35	281,13	96,045	429,9	90,01	252,38	34,41
36	176,75	47,954	299,5	57	254,25	69,81
37	115,25	87,704	364	78,97	116,5	65,65
38	217,5	57,799	368,5	110,4	185,75	75,61
39	169,5	55,03	362,3	80,58	200	93,17
40	204,88	57,602	295,4	30,45	188,88	70,94
41	102,5	55,12	361,3	51,64	200,75	85,58
42	359,38	165,48	411,6	160,1	222,88	76,24
43	281,38	123,88	404,4	49,66	307,13	63,81
44	248,75	77,595	375,5	52,14	234,25	95,49
45	220,38	25,474	330,6	75,17	169,38	99,43
46	237,5	69,207	305,3	106,4	149	62,41
47	162,75	105,85	335,3	76,83	236	183
48	106	91,383	285,3	79,99	253,75	114,1
49	280	93,361	379,8	159,2	258,5	99,98
50	249	117,93	333,8	83,36	207,5	36,01
51	188,63	46,936	301,1	99,25	190,38	17,54
52	161,13	91,799	290,4	149,6	145,88	79,68
53	293,75	71,881	294	78,8	167,25	91,61
54	198	97,77	225	46,34	124,75	117,1
55	147	80,093	238,3	66,15	113,25	109,8
56	236,75	38,664	351	134,8	109,25	76,84
57	168,25	57,506	233	61,75	131,5	65,41
58	200,13	61,223	231,6	125,9	207,13	65,78
59	122,75	75,958	218	137,3	97,25	107,2
60	137	38,323	262,3	100,3	233,5	20,01

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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