

**Universidade de São Paulo  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**

**EFEITO DA CORTICOSTERONA SOBRE A FAGOCITOSE E  
PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO MEDIADO  
POR MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE CAMUNDONGO:  
PAPEL DO ÁCIDO ARAQUIDÔNICO**

**Mirian Ribeiro Moreira**

**Ribeirão Preto  
2009**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

**Universidade de São Paulo**  
**Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**

**EFEITO DA CORTICOSTERONA SOBRE A FAGOCITOSE E PRODUÇÃO DE  
ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO MEDIADO POR MACRÓFAGOS  
PERITONEAIS DE CAMUNDONGO: PAPEL DO ÁCIDO ARAQUIDÔNICO**

**Mirian Ribeiro Moreira**  
**Orientador: Prof. Dr. Bernardo Mantovani**

Tese apresentada à Faculdade de  
Medicina de Ribeirão Preto como parte  
dos requisitos para a obtenção do  
título de Doutora em Ciências, área de  
concentração Bioquímica.

**Ribeirão Preto**  
**2009**

### Ficha Catalográfica

Moreira, Mirian Ribeiro

Efeito da corticosterona sobre a fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio mediado por macrófagos peritoneais de camundongo: Papel do ácido araquidônico. Ribeirão Preto, 2009.

111p.:il.;30cm

Tese de doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / USP – Área de concentração: Bioquímica.

Orientador: Pro. Dr. Mantovani, Bernardo.

1. Macrófagos, 2. Fagocitose, 3. Espécies reativas de oxigênio, 4. Corticosterona. 5. Fosfolipase A2.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Autora:** Mirian Ribeiro Moreira

**Título:** Efeito da corticosterona sobre a fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio mediado por macrófagos peritoneais de camundongo: papel do ácido araquidônico.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo  
para a obtenção do título de Doutora em  
Ciências, área de concentração Bioquímica.

### Banca Examinadora

Prof (a). Dr (a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Prof (a). Dr (a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Prof (a). Dr (a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Prof (a). Dr (a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Prof (a). Dr (a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Prof (a). Dr (a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura \_\_\_\_\_

Aprovado pela Comissão Julgadora em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

*“Quatros anos se passaram e com eles uma história foi escrita. Confesso que foram quatro anos da minha existência marcada por momentos felizes, tristes, de incertezas, de aprendizado e de solidão! Hoje quando entrego essa tese de doutorado não entrego somente toda a minha dedicação a ciência, mas também todo um aprendizado de vida e de ética, e esse será incorporado por toda a minha existência!”*

*Aprendi que o nosso limite sempre está um pouco mais distante do que imaginamos. Quando não me sentia mais capaz e minhas forças estavam se esgotando; algo me mostrava: Você é capaz! Obrigada DEUS, por me ensinar que confiar em ti é o caminho certo.*

*Dedico esse trabalho a DEUS.*

## *Agradecimentos*

*A DEUS que esteve sempre ao meu lado, nos momentos de desalento Ele pegou na minha mão e me fez andar no caminho da esperança e da Fé, mostrando a minha força e a minha capacidade de enfrentar as dificuldades decorrentes dessa fase em minha vida. Sem Ele eu não seria nada!*

*Nenhum sonho é impossível quando se tem os olhos voltados para o Céu (Buzz Aldrin).*

*Ao meu Orientador Dr. Bernardo Mantovani, agradeço por ter confiado a mim esse trabalho e pela oportunidade de aprender e colaborar com o seu grupo de pesquisa. Essa experiência foi muito rica tanto no aspecto profissional quanto no pessoal, obrigada pelo grande aprendizado que me proporcionou.*

*A minha família: Assim como uma vela acende outra vela e com esta milhares de velas podem ser acesas, da mesma forma um coração acende outro coração e pode acender mil corações (Leão Tolstói).*

*Ao meu querido e amado noivo Cláudio Vinicius Carrijo da Silva, que diante de tantas tribulações esteve sempre ao meu lado, me incentivando e me dando carinho e amor. Obrigada pela sua compreensão e ajuda, que foram sempre constantes. A distância me ensinou o verdadeiro significado do AMOR! Obrigada de coração a minha amiga Maria Veloso Carrijo da Silva pelas orações e incentivo sempre constantes.*

*A minha mãe Maria das Dores Ribeiro e ao meu Pai Mirson Bento Moreira; obrigada por ter me dado a vida e por me ensinar a nobreza de saber "ser humana", e ter a sensibilidade de respeitar o limite de cada pessoa, obrigada pelo apoio e o exemplo de luta. "O exemplo não é a principal coisa que influencia os outros; é a única coisa" (Albert Schweitzer).*

*A minha irmã Mirley R. Moreira, por ter cuidado de mim até os últimos dias da realização desta tese, se abdicando de sua vida para poder viver a minha. Eu te amo muito e obrigada meu DEUS por ter me dado ela como minha irmã gêmea.*

*Ao prof. e amigo Carlos Alberto, pelo incentivo e pelo exemplo de pesquisador, sei que essa caminhada não foi fácil, pois foi através de muitas lágrimas que consegui terminar! Obrigada pelo seu apoio. Você fez a diferença!*

*A Mircia R. Moreira e Fabrício, Marcus R. Moreira, Viviane Borges e Anna Laura Moreira, Rogério e Morgana, Laísa, Lavínia e Laura, apesar de sempre distantes vocês sempre foram para mim exemplo de luta, agradeço a cada um de vocês por cada oração, por cada palavra de incentivo, o amor que nos uni é abençoado por DEUS, e sempre estaremos juntos mesmo estando distantes.*

*Aos meus queridos tios, tias, primos, primas, sobrinhas, obrigada pelo carinho e incentivo constante, e por sempre se lembrarem de mim nas reuniões de família.*

*Aos meus eternos amigos: A verdadeira amizade sorri na alegria, consola na tristeza, alivia na dor e se eterniza em DEUS (H. Didon),*

*Ao meu grupo de pesquisa, Renata S. Costa pelo carinho e palavras de incentivo, Larissa F. Marchi pelo exemplo de força e coragem diante das tribulações, Mariana D. C. Ignacchiti, pelos momentos de agradáveis conversas, Andréa A. Suzukawa pelos ensinamentos. Obrigada pelo convívio de vários anos, pelas palavras de estímulo e ajuda no decorrer deste trabalho. Obrigada!*

*A Silvana C. Silva pela orientação na condução dos experimentos e pelas longas conversas, obrigada pelo companheirismo, pelos diversos momentos de crescimento e aprendizado profissional compartilhados. DEUS te abençoe.*

*Ao Jose Antônio da Silva por me ensinar sobre a vida, e aprender que a cada dia, a vida traz um pouco mais de seus ensinamentos. Obrigada Zé pela ajuda constante na condução dos experimentos.*

*A Dra. Yara M. L. Valin você foi e será um exemplo em minha vida. Obrigada pelas palavras ditas nos momentos que mais precisei, elas me reerguiam e me incentivavam. Obrigada por me deixar participar ainda que distante de sua família, que é o seu laboratório.*

*Aos professores que estiveram comigo desde o início da minha caminhada, Dra. Ana Isabel Assis Pandochi, Dra. Carem Gledes V. Recchia, Dr. Carlos Curti, Dr. Augusto Cesar C. Spadoro, Dr. Sérgio A. Uyemura, obrigada pelos ensinamentos, pela agradável convivência e aprendizado compartilhados.*

*A Dra. Cleni M. M. Machado obrigada por contribuir com o meu trabalho me auxiliando com valiosas sugestões, espero poder um dia retribuir a sua atenção. A Elisa M. S. R. Carbolante pelo exemplo de educadora e pesquisadora.*



*A minha querida amiga Ana Paula L. Librandi, que mesmo distante me ajudou e auxiliou com palavras de incentivo e amor. Obrigada maninha por fazer parte da minha vida!*

*A minha amiga Luciana M. Kabeya, “as vezes o silêncio quer dizer muito mais do que palavras”. Obrigada por ter me apoiado e orientado diversas vezes no início da minha pesquisa em Ribeirão Preto e agora por me ajudar no final desse meu trabalho. Obrigada pelas sugestões e pelo auxílio nos experimentos. Você é muito especial e será um exemplo para mim.*

*A Adriana B. P. Paschoalato, nos momentos mais difíceis você esteve ao meu lado. Quantas vezes você com suas palavras me acalentaram e me ajudaram nos momentos de desespero. Obrigada!*

*A Daiani Cristini O. Andrade, foram muitos sorrisos em sua presença. Ninguém consegue ficar triste ao seu lado, e isso a torna muito especial. Você transmite muita alegria e a certeza que no final de tudo; tudo dará certo. Obrigada pela sua amizade.*

*A Livia Maria Cordeiro Simões Ambrosio e Sergio Ricardo Ambrósio, obrigado pelo exemplo do que é o amor.*

*Foram poucos momentos juntas Carolina N. Fuzissakj, mas você se tornou uma grande amiga, obrigada pelas longas conversas e crescimentos compartilhados.*

*Obrigada a Teia, Lúcia, Ronaldo, Victor pela extrema competência e pela ajuda sempre constante nos momentos em que precisei, obrigada pela amizade.*

*A minha eterna amiga Ivone. Obrigada, por sua dedicação, atenção e preocupação comigo e com o meu trabalho. Você será uma eterna amiga.*

*Aos funcionários da Biblioteca Central de Ribeirão Preto, obrigada pelo apoio.*

*A Ana Elisa C. S. Azzolini tem pessoas que passam pela vida da gente e vão embora e tem pessoas que ficam eternamente, e você com certeza será uma dessas. Você me mostrou que a profissão exercida com amor e dedicação se frutifica e é reconhecida. Obrigada pelos seus ensinamentos.*

*Ieda Maria Razaboni Prado e a Ana Cristina Morseli Polizello, Alcides Silva Pereira, Nadir Mazzucato, obrigada pelas palavras amigas e pelos sorrisos de Bom Dia.*

*Ao Tatiana, Elisângela, Raquel, obrigada pela colaboração com os experimentos da fosfolipase.*

*A Regina, você foi tão importante para mim no início dessa caminhada! Não conhecia ninguém em Ribeirão, me sentia sozinha e você com toda sua compreensão me confortavam nos momentos de tristeza. Obrigada Regina de todo meu coração pelo seu carinho, sua amizade será eterna.*

*Amiga Roberta, jamais irei esquecer o seu apoio nos momentos difíceis, obrigada.*

*Ao Educador e Pesquisador Cláudio Antonio Tedesco, obrigada pelo seu profissionalismo.*

*Andréa S. G. de Figueiredo, Alexandre Kanashiro, Celene Maria O. S. Alves, Cláudia da Silva Bitencourt, Daniel Junqueira Dorta, Fabio E. Mingato, Mateus Freire Leite, Everton O. L. dos Santos, obrigada pelos ensinamentos que jamais serão esquecidos.*

*A todos os docentes do Departamento de bioquímica que participaram da minha formação.*

*Aos funcionários do Biotério Central por garantir sempre a presença dos animais em meus experimentos.*

*Aos camundongos, por cederem suas vidas à ciência.*

*A todos que, mesmo não citados aqui, contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.*

***Obrigada!***

## Resumo

---

Moreira M. R. Efeito da corticosterona sobre a fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio mediado por macrófagos peritoneais de camundongo: papel do ácido araquidônico. 2009. 111f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

Neste estudo investigamos os efeitos da corticosterona em macrófagos peritoneais de camundongo estimuladas por receptores Fc $\gamma$  e de manose/fucose através da capacidade fagocítica e produção de espécies reativas de oxigênio. A fagocitose foi avaliada por microscopia ótica e por citometria de fluxo e a produção das espécies reativas por quimioluminescência dependente de luminol (QLlum) e quimioluminescência dependente de lucigenina (QLluc). Posteriormente, avaliamos o efeito do ácido araquidônico frente à inibição desses processos pela corticosterona. Os resultados obtidos mostraram que a corticosterona ( $10^{-5}$ mol/L) tem uma ação inibitória sobre a fagocitose mediada por imunocomplexos de hemácias de carneiro (EA), no entanto não altera a fagocitose de imunocomplexos de OVA (IgG/OVA) nem de zimosan. Utilizando inibidores específicos da fagocitose e da endocitose como a nistatina, a clorpromazina e a citocalasina B, verificamos que tanto a interiorização de EA como de IgG/OVA são dependentes da polimerização de actina G e de clatrina. Na avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio na presença do hormônio, nossos dados demonstraram que a corticosterona diminuiu a produção de superóxido induzida por ambos os estímulos (IgG/OVA e zimosan), mas não alterou a produção total de espécies reativas. Ao adicionar ácido araquidônico aos macrófagos, verificamos uma reversão da inibição promovida pela corticosterona na fagocitose de EA. Além disso, observamos que a atividade da fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) dos macrófagos é diminuída pela corticosterona. Esses resultados sugerem que a inibição das funções dos macrófagos pela corticosterona ocorre devido a uma diminuição na liberação do ácido araquidônico, através da inibição da atividade da PLA<sub>2</sub>.

Palavras-chave: Macrófagos, fagocitose, *burst* oxidativo, corticosterona.

## Abstract

---

Moreira M. R. Effect of corticosterone on the phagocytosis and production of reactive oxygen species mediated by peritoneal macrophages of mice: role of arachidonic acid. 2009. 111f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

In this study, we investigated the effects of corticosterone on the mice peritoneal macrophage phagocytic activity and reactive oxygen species generation stimulated by Fc $\gamma$  and mannose/fucose receptors. The phagocytosis was evaluated by optic microscopy and flow cytometric system and the generation of reactive oxygen species by luminol- (QLlum) and lucigenina-enhanced chemiluminescence (QLlum and QLLuc, respectively). After that, we evaluated the effect of arachidonic acid against the inhibition achieved by corticosterone in these processes. The results obtained showed that the corticosterone ( $10^{-5}$  mol/L) had an inhibitory activity on the phagocytosis mediated by immunocomplexes of sheep red cells (EA), however no change was observed in the phagocytosis of immunocomplex of OVA (IgG/OVA) and zymosan. Using specific inhibitors of phagocytosis and endocytosis as nystatin, chlorpromazine and cytochalasin B, we assessed that the interiorization of EA and IgG/OVA was dependent of actin G and clathrin polymerization. In the assessment of reactive oxygen species production in the presence of hormone, our data demonstrated that the corticosterone decreased the superoxide production by both stimuli (IgG/OVA and zymosan) but it do not affect the total production of reactive species. When arachidonic acid was added to the macrophages, the corticosterone-mediated inhibition of EA phagocytosis was abolished. In addition, we observed that the activity of macrophage phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) was reduced by corticosterone. These results suggested that the inhibition of macrophage functions by corticosterone was due to a decrease on the release of arachidonic acid via the inhibition of PLA<sub>2</sub> activity.

Keywords: Macrophages, phagocytosis, oxidative *burst*, corticosterone.

## Lista de Figuras

---

<b>Figura 1</b> - Esquema da ação dos receptores de glicocorticóides.....	07
<b>Figura 2</b> - Receptores e vias de sinalização envolvidas na fagocitose de microorganismos.....	09
<b>Figura 3</b> - Representação esquemática dos receptores .....	11
<b>Figura 4</b> - Esquema representando vias de sinalização para receptores FcγR durante a ativação celular .....	16
<b>Figura 5</b> - Esquema das principais vias celulares de interiorização de partículas .....	17
<b>Figura 6</b> - Representação simplificada do mecanismo proposto para descrever a origem e a regulação da quimioluminescência (QL) em células fagocíticas e das reações químicas envolvidas na QL dependente de luminol (QLlum) e na QL dependente de lucigenina (QLluc) .....	22
<b>Figura 7</b> - Esquema representativo da posição de clivagem das fosfolipases nos fosfolípidos de membrana.....	23
<b>Figura 8</b> - Eletroforese em Gel de poliacrilamida com SDS.....	35
<b>Figura 9</b> - Placa de imuno-hemoaglutinação.....	36
<b>Figura 10</b> - Curva de precipitação para IgG/OVA .....	37
<b>Figura 11</b> - Fotos ilustrativas dos estímulos marcados com FITC .....	38
<b>Figura 12</b> - Representação gráfica dos perfis de QLluc, obtido após estimulação de macrófagos com IgG/OVA .....	45
<b>Figura 13</b> - Titulação monitorada por fluorescência do ADIFAB com ácido oléico a 25°C .....	50
<b>Figura 14</b> - Ação da corticosterona sobre a fagocitose de EA (Hemácias opsonizadas com IgG) em macrófagos peritoneais de camundongos .....	54
<b>Figura 15</b> - Ação da corticosterona sobre a fagocitose de IgG/OVA por macrófagos peritoneais de camundongos .....	55
<b>Figura 16</b> - Ação da corticosterona sobre a fagocitose de diferentes concentrações IgG/OVA por macrófagos peritoneais de camundongos.....	56
<b>Figura 17</b> - Ação da corticosterona sobre a fagocitose de zimosan por macrófagos peritoneais de camundongos .....	57
<b>Figura 18</b> - Ação da corticosterona sobre a fagocitose de zimosan em diferentes concentrações por macrófagos peritoneais de camundongos.....	58

<b>Figura 19</b> - Efeito da nistatina (Nyst), clorpromazina (Cloro) e citocalasina B (CB) no processo de aderência e interiorização de IgG/OVA por macrófagos peritoneais de camundongos utilizando microscopia de fluorescência e citometria de fluxo.....	61
<b>Figura 20</b> - Medida da produção de ROS por macrófagos peritoneais de camundongo estimulados com IgG/OVA e zimosan empregando-se ensaio de QLLuc.....	65
<b>Figura 21</b> - Medida da produção de ROS por macrófagos peritoneais de camundongo estimulados com IgG/OVA e zimosan empregando-se ensaio de QLlum.....	66
<b>Figura 22</b> - Efeito da corticosterona na QLLuc e QLlum produzida por macrófagos peritoneais de camundongo estimulados com IgG/OVA .....	67
<b>Figura 23</b> - Efeito da corticosterona na QLLuc e QLlum produzida por macrófagos peritoneais de camundongo estimulados com zimosan .....	68
<b>Figure 24</b> - Efeito do ácido araquidônico na viabilidade celular .....	70
<b>Figura 25</b> - Efeito do ácido araquidônico no processo de fagocitose de EA.....	71
<b>Figura 26</b> - Efeito do ácido araquidônico no processo de inibição pela corticosterona a $10^{-5}$ mol/L do processo de fagocitose de EA (hemácias opsonizadas com IgG) .....	73
<b>Figura 27</b> - Avaliação das diferentes concentrações de ácido araquidônico no processo de ativação do <i>burst</i> oxidativo de macrófagos peritoneais de camundongo por QL-luc .....	74
<b>Figura 28</b> - Efeito de diferentes concentrações de ácido araquidônico no processo de ativação do <i>burst</i> oxidativo de macrófagos peritoneais de camundongo por IgG/OVA e zimosam .....	76
<b>Figura 29</b> - Porcentagem de redução do DPPH frente ao ácido araquidônico .....	77
<b>Figura 30</b> - Efeito do ácido araquidônico no processo de inibição realizado pela corticosterona avaliado por QL-luc em macrófagos estimulados com IgG/OVA; zimosan.....	79
<b>Figura 31</b> - Efeito da corticosterona na atividade da fosfolipase $A_2$ secretada humana do grupo IIA (hsPLA <sub>2</sub> gIIA).....	81

## Lista de Tabelas

---

<b>Tabela 1</b> - Quantificação das células presentes no exsudato peritoneal de camundongos.....	62
--	----

## Lista de abreviaturas e siglas

---

AA	Ácido araquidônico
ACTH	Adrenocorticotrofina
ADIFAB	Proteína de ligação de ácido graxo intestinal marcada com acrilodan
AMP	Adenosina 3,5 - monofosfato
ANOVA	Análise de variância
AVP	Arginina vasopressina
BEL	Bromoeno lactona
CB	Citocalasina B
cpm	Fótons contados por minutos
CR	Receptor para complemento
CRH	Corticotrofina
CORT	Corticosterona
DAG	Diacilglicerol
DEAE	Dietilaminoetil
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOPC	Dioleilfosfatidilcolina
DOPG	Dioleilfosfatidilglicerol
IgG	Imunoglobulina G
E	Hemácias
EA	Hemácias opsonizadas com IgG
EGTA	Ácido tetracético etilenoglicol
ERK	Sinal extracelular regulado por quinases
Fc	Fragmento cristalizável da molécula de anticorpo
Fc $\gamma$ R	Receptor para a porção Fc de IgG
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FMLP	n-formil-metionina-leucina-fenilalanina
GR	Receptor de glicocorticóide
GTP	Trifosfato de guanosina
gp91 <sup>phox</sup>	Glicoproteína de 91 KDa componente do complexo NADPH oxidase
HPA	Hipotálamo-pituitário-adrenal
hsPLA <sub>2</sub> gIIA	Fosfolipase A <sub>2</sub> secretada humana do grupo IIA
IFN $\gamma$	Interferon gama



IC	Imunocomplexo
IC <sub>50</sub>	Concentração que inibe 50% da resposta biológica
IP3	Inositol trifosfato
IgG	Imunoglobulina G
IgG/OVA	Imunoglobulina G (IgG) anti ovoalbumina
ITAM	Motivo ativador baseado em tirosina
ITIM	Motivo inibidor baseado em tirosina
LPS	Lipopolissacarídeo
luc	Lucigenina
lum	Luminol
MR	Receptor de mineralocorticoide
MSH	Hormônio estimulador de melanócitos
NF-κB	Fator nuclear de transcrição - κB
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (forma reduzida)
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PVN	Núcleo paraventricular
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
PLC	Fosfolipase C
PLB	Fosfolipase B
PLA <sub>1</sub>	Fosfolipase A <sub>1</sub>
PKC	Proteína quinase C
PAF	Fator ativador de plaquetas
p22 <sup>phox</sup> , p47 <sup>phox</sup>	Proteínas de 22, 47, 67, 40 KDa componente do complexo NADPH
p67 <sup>phox</sup> , p40 <sup>phox</sup>	oxidase
phox	Oxidase de fagócito (phagocyte oxidase)
QL	Quimioluminescência
POMC	Proopiomelanocortina
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RU 486	Mifepristona
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SI	Sistema imune
SNC	Sistema nervoso central
SNS	Sistema nervoso simpático
MPC	Macrófagos peritoneais de camundongo
OVA	Ovoalbumina

## Sumário

---

<b>Resumo .....</b>	<b>ix</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>x</b>
<b>Lista de Figuras.....</b>	<b>xi</b>
<b>Lista de tabelas .....</b>	<b>xiii</b>
<b>Lista de abreviaturas e siglas .....</b>	<b>xiv</b>
<b>1 - Introdução.....</b>	<b>02</b>
1.1 – Estresse .....	02
1.2 - Macrófagos .....	08
1.3 - Receptores.....	09
1.4 - Ativação Celular .....	15
1.5 - Interiorização e <i>Burst</i> Oxidativo .....	16
1.6 - Quimioluminescência.....	21
1.7 - Fosfolipase A2 (PLA <sub>2</sub> ) e ácido araquidônico.....	23
1.8 - Papel do ácido araquidônico na Fagocitose .....	26
<b>2 - Objetivos.....</b>	<b>29</b>
<b>3 - Materiais e Métodos.....</b>	<b>31</b>
3.1 - Animais de experimentação.....	31
3.2 - Obtenção dos macrófagos peritoneais .....	31
3.3 - Produção de anticorpos da classe das imunoglobulinas G .....	32
3.3.1 - Imunização e obtenção do soro .....	32
3.4 - Purificação e caracterização do anticorpo da classe - G .....	33
3.4.1 - Purificação dos anticorpos da classe - G.....	33
3.4.1.1 - Precipitação .....	33
3.4.1.2 - Cromatografia por troca iônica.....	34
3.5 - Identificação e caracterização dos anticorpos IgG .....	34
3.5.1- Eletroforese SDS-PAGE.....	34
3.5.2 - Determinação do título de hemaglutinação (IgG anti E).....	35
3.5.3 - Curva de precipitação da IgG anti-OVA .....	36
3.6 - Marcação de proteína ovoalbumina e partículas de Zimosan com isotiocianato de fluoresceína (FITC).....	37

3.7 - Preparo dos estímulos utilizados para ativar os macrófagos peritoneais de camundongo.....	39
3.7.1 - Preparação dos imunocomplexos de IgG anti E.....	39
3.7.2 - Preparação dos imunocomplexos de IgG-anti OVA .....	39
3.7.3 - Preparo das partículas de zimosan.....	40
3.8 - Avaliação do estado de ativação de macrófagos.....	40
3.8.1 - Análise quantitativa da fagocitose de macrófagos peritoneais por microscopia óptica e por citometria de fluxo .....	40
3.9 - Ensaio de fagocitose de IgG/OVA na presença das drogas nistatina, clorpromazina e citocalasina B.....	42
3.10 - Avaliação da atividade sequestradora de ROS pelo ácido araquidônico frente ao radical livre DPPH .....	42
3.11 - Medidas de quimioluminescência (QL).....	43
3.11.1 - Expressão dos resultados de quimioluminescência.....	44
3.12 - Avaliação da ação do AA na fagocitose de EA e no <i>burst</i> oxidativo de macrófagos peritoneais.....	45
3.13 - Ensaio de viabilidade das células .....	46
3.14 - Avaliação da atividade da fosfolipase A <sub>2</sub> .....	47
3.14.1 - Preparação dos lipossomos.....	47
3.14.2 - Dosagem de fosfato dos fosfolipídios .....	48
3.14.3 - Teste de atividade enzimática através de indicador de ácido graxo livre .....	49
3.15 - Tratamento dos dados: Análises estatísticas.....	51
<b>4 - Resultados.....</b>	<b>53</b>
4.1 - Efeito da corticosterona sobre o processo de fagocitose pelos macrófagos peritoneais de camundongos .....	53
4.1.1 - Fagocitose de imunocomplexo de hemácias opsonizadas com imunoglobulina G (EA) .....	53
4.1.2 - Fagocitose de imunocomplexo de imunoglobulina G (IgG) anti ovoalbumina (IC-IgG/OVA) .....	54
4.1.3 - Fagocitose de partículas de zimosan.....	56
4.2 - Efeito da nistatina, clorpromazina e citocalasina B no mecanismo de interiorização de imunocomplexo IgG (IgG/OVA) .....	59
4.3 - Efeito da corticosterona sobre o processo de produção de espécies reativas de oxigênio produzido por Macrófagos Peritoneais de camundongos (MPC) .....	62
4.3.1 - Quantificação e análise da população celular do exsudato peritoneal total	

dos camundongos .....	62
4.3.2 - Efeito <i>in vitro</i> da corticosterona no <i>burst</i> oxidativo dos macrófagos utilizando o método de quimioluminescência dependente de luminol e lucigenina .....	63
4.4 - Efeito do ácido araquidônico no processo de fagocitose e <i>burst</i> oxidativo.....	69
4.4.1 - Avaliação da toxicidade do ácido araquidônico sobre macrófagos peritoneais de camundongos .....	69
4.4.2 - Efeito de diferentes concentrações do ácido araquidônico na fagocitose de EA por macrófagos peritoneais de camundongos não tratados com corticosterona.....	70
4.4.3 - Efeito do ácido araquidônico na fagocitose de EA por macrófagos peritoneais de camundongos tratados previamente com corticosterona.....	72
4.5 - Avaliação do AA no <i>burst</i> oxidativo de macrófagos peritoneais .....	74
4.5.1 - Efeito de diferentes concentrações de ácido araquidônico na produção de espécies reativas de oxigênio avaliadas por QLLuc pelos macrófagos peritoneais .....	74
4.5.2 - Efeito de várias concentrações do ácido araquidônico na respostas de QLLuc frente ao estímulo imunocomplexo IgG/OVA e zimosan .....	75
4.6 - Avaliação da atividade sequestradora de radicais livres pelo ácido araquidônico e do efeito deste sobre o <i>burst</i> oxidativo de macrófagos peritoneais de camundongos.....	77
4.7 - Efeito do ácido araquidônico sobre a inibição de QLLuc produzida pela corticosterona.....	78
4.8 - Efeito da corticosterona na atividade da fosfolipase A <sub>2</sub> secretada humana do grupo IIA (hsPLA <sub>2</sub> gIIA) .....	80
<b>5 - Discussão .....</b>	<b>83</b>
<b>6 - Conclusões.....</b>	<b>96</b>
<b>7 - Bibliografia .....</b>	<b>98</b>

# *Introdução*

## 1 - INTRODUÇÃO

---

### 1.1 - ESTRESSE

A relação entre o estresse e o sistema imune há muito tempo é pesquisada e reconhecida. Vários estudos abordam como o estresse atua no sistema imune (SI) do organismo e qual seria a contribuição dos mediadores químicos liberados pelo sistema nervoso central nas respostas imunes celulares. Vários agentes estressores são utilizados como ferramenta para estes estudos, como frio, calor, imobilização, natação forçada, choques nas patas, estresse social devido ao confronto, entre outros.

O trabalho pioneiro de Hans Selye mostrou que o Sistema Nervoso Central (SNC) está diretamente ligado a resposta ao estresse e que estas respostas influenciam diretamente o SI. Selye observou que o estresse causava aumento no tamanho da adrenal, hipotrofia do timo e linfonodos e demonstrou que estes efeitos eram dependentes de um eixo funcional entre a hipófise e a adrenal (SELYE, 1955).

Outro estudo que demonstrou a interação do SNC e o SI foi o de Ursine et al. (1994) onde o estresse psicológico foi capaz de produzir alterações na função imune de linfócitos.

Vários trabalhos demonstram que exposições de animais a agentes estressores promovem a liberação de mediadores químicos que modulam respostas imunes como o processo fagocítico, *burst* oxidativo de fagócitos, liberação de citocinas, mediadores lipídicos, dentre outros (FRANCHIMONT, 2004).

De fato, existe uma relação recíproca entre SNC e SI, frente ao estresse, onde o SNC se comunica com o SI via neuropeptídeos, neurotransmissores e

hormônios, enquanto o SI, através de citocinas, óxido nítrico e prostaglandinas, informa ao cérebro qualquer alteração na homeostasia.

A resposta ao estresse está centrada principalmente na atividade do eixo hipotálamo-pituitário-adrenal (HPA) e no sistema nervoso simpático (SNS), que culmina na liberação de glicocorticóides e catecolaminas, epinefrina e noroepinefrina. Uma vez liberados esses hormônios ativam as células do núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo para liberarem hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e arginina vasopressina (AVP). O controle da atividade do eixo HPA é exercido principalmente no PVN.

Esses peptídeos são transportados através das projeções de axônios até o sistema porta hipofisário para liberarem proopiomelanocortina (POMC), pelas células corticotróficas da pituitária anterior, que é clivada originando o adrenocorticotrofina (ACTH),  $\beta$  - endorfina e hormônio estimulador de melanócitos ( $\alpha$  - MSH). O ACTH, através da corrente sanguínea, chega até as glândulas adrenais onde estimula principalmente a liberação de glicocorticóide, corticosterona nos roedores e cortisol nos primatas (MORANO et al. 1994; STRATAKIS; CHROUSOS, 1995).

A ativação do eixo HPA e a conseqüente produção dos glicocorticóides durante o estresse são um dos principais mecanismos responsáveis pelas alterações da resposta imune. Os glicocorticóides são capazes de inibir a transcrição de inúmeras citocinas, como interleucina 1, 13 e 5, fator de necrose tumoral e fator estimulante de colônias. Assim, um dos mecanismos mais relevantes na modulação da resposta imune pelo estresse via ativação do eixo HPA desenvolve-se por alterações no chamado balanço TH1/TH2 (WICK et al. 1993; ALVES; PALERMO-NETO, 2007).

O grau de ativação do eixo HPA difere de acordo com cada tipo de estresse. As concentrações fisiológicas dos glicocorticóides estão na faixa de 350nmol/L e 950nmol/L, enquanto que as concentrações farmacológicas (concentrações maiores que as fisiológicas) resultam em respostas mais severas como diminuição brusca da fagocitose e da liberação de espécies reativas de oxigênio por fagócitos profissionais, sendo tais resultados observados em vários trabalhos (SESTI-COSTA, 2005).

Os glicocorticóides regulam varias funções no organismo como, crescimento, metabolismo, desenvolvimento e alterações na resposta imune. Desempenham um papel importante na preservação da homeostase e nas respostas ligadas ao estresse. Representam uma das drogas mais extensamente prescritas mundialmente em casos de tratamento de doenças inflamatórias, autoimunes e linfoproliferativas (CHARMANDARI et al. 2004).

Alguns trabalhos demonstraram o aumento destas substâncias no organismo frente a um estresse. Destaca-se o trabalho de Bhatmagar e Dallman (1998) onde observaram que em animais imobilizados durante 30 minutos ocorre um aumento da corticosterona e ACTH, no entanto, quando os animais foram submetidos ao frio (4°C) por 4 horas diárias durante sete dias (estresse crônico), ocorre uma diminuição destes hormônios. Dessa forma, dependendo do grau de ativação do eixo HPA a resposta de liberação de determinados hormônios difere, podendo assim alterar a resposta imune do organismo.

Segundo estudos realizados por Kizaki et al. (1996) o SI de camundongos expostos ao frio agudo altera-se severamente, com aumento de glicocorticóides e interferências com as funções dos fagócitos mononucleares. Estas alterações



hormonais são devido ao estresse que modifica a concentração de neuropeptídeos, que determinam a eficiência ou a ineficiência da resposta imunológica.

Definem-se dois tipos de estresse: o estresse agudo que se relaciona a uma ameaça imediata e após este evento, que dura minutos a horas, há uma resposta de relaxamento. Dhabhar (2002) sugere que a resposta ao estresse agudo prepara os sistemas nervoso, cardiovascular, muscular e neuroendócrino para luta ou fuga, e também o sistema imune para os desafios impostos pelo agente estressor. Por outro lado, o estresse crônico, que dura dias, meses ou anos, podem levar a imunossupressão. Hormônios envolvidos na resposta ao estresse, como os glicocorticóides, podem inibir a síntese de prostaglandinas e de citocinas, bem como a atividade macrófaga e a proliferação de linfócitos.

Várias investigações têm demonstrado uma significativa interação entre o estresse e a saúde. Esta associação parece estar particularmente ligada a doenças no sistema imune, devido ao aumento da susceptibilidade a infecções, doenças atópicas, asma e também doenças como o câncer (MARSHALL et al. 2001).

Baccan et al. (2004) observaram que em macrófagos peritoneais incubados com a corticosterona, ocorre alterações no processo fagocítico de hemácias opsonizadas com IgG. Esta alteração ocorreu com tempo mínimo de 10 minutos, sendo assim um processo não genômico. Sesti-Costa (2005) verificou que a fagocitose de células apoptóticas por macrófagos peritoneais ativados com LPS é diminuída frente ao hormônio corticosterona.

Diversos pesquisadores tentam explicar os mecanismos não genômicos que promovem alterações no sistema imune. É sabido que os glicocorticóides atravessam facilmente a membrana plasmática e ligam-se aos seus receptores específicos, os receptores de glicocorticóides (GR) ou receptores para

mineralocorticóides (MR) presentes no citoplasma. Os receptores MR se ligam com alta afinidade aos glicocorticóides, como a corticosterona, e os receptores GR com baixa afinidade. Quando as concentrações de corticosterona no plasma são baixas os receptores predominantemente ocupados são os MRs ao passo que com aumento dos níveis de corticosterona, devido ao pico do ciclo circadiano, ocorre a interação com os GRs além do MRs (MULLEN, 1995).

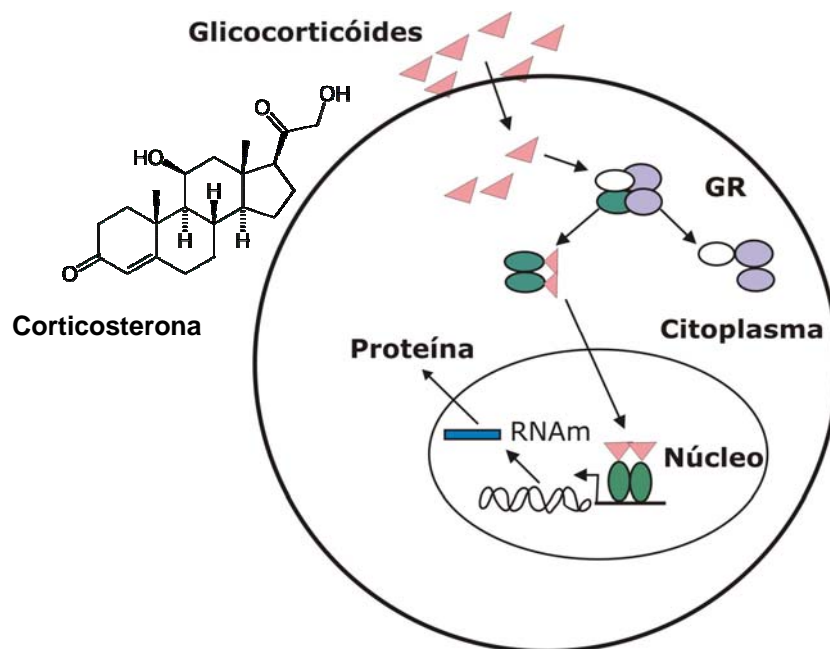
O mecanismo genômico envolve a ligação de glicocorticóides com os receptores intracelulares seguido de uma translocação receptor-esteróides para o núcleo, com modulação subsequente de transcrição e tradução de síntese de proteínas, que modula positivamente ou negativamente a função celular. Todo este processo genômico é lento normalmente requer mais de uma hora, sendo assim considerado um mecanismo clássico de resposta aos esteróides (ROUSSEAU, 1984; ISMAILI; GARABEDIAN, 2004) (Figura 1).

Existem também respostas rápidas aos glicocorticóides, sendo estes efeitos considerados não genômicos. A teoria não genômica tem sido descrita para todas as classes de esteróides sendo que em muitos casos estão associados à membrana plasmática.

Existem algumas explicações para a ação não genômica de esteróides. Uma delas sugere que seja decorrente da inserção destes na membrana fosfolipídica, alterando a fluidez de membrana. Outras evidências sugerem o envolvimento de receptores de esteróides clássicos, mediando respostas rápidas como, por exemplo, receptores de estrógeno, que são bloqueados por antagonistas específicos, sendo indiferentes à ação de drogas que inibem a transcrição gênica, como actinomicina D (FALKENSTEIN et al. 2000).

Falkenstein et al. (2000), utilizando leucócitos mononucleares humanos e células musculares lisas vasculares, observaram a ação não genômica da aldosterona ou fluodrocortisona, e detectaram a geração de inositol trifosfato (IP3) dentro de 30 segundos, com um  $IC_{50}$  de aproximadamente 0,1nM. Em relação à produção de diacilglicerol (DAG), observou-se aumento em células musculares lisas dentro de 30 segundos por adição de concentrações sub-nanomolares de aldosterona, e concentrações supra-micromolares de cortisol.

Neste trabalho utilizamos a corticosterona para mimetizar o estresse *in vivo*, que em altas concentrações afeta o organismo por atuar em diferentes células do sistema imune.



**Figura 1** – Esquema da ação dos receptores de glicocorticóides. Esse é um mecanismo genômico clássico que envolve a ligação de glicocorticóides com os receptores intracelulares seguido de uma translocação receptor-esteróides para o núcleo, com modulação subsequente de transcrição e tradução de síntese de proteínas. Adaptado de Webster et al. (2002). Abreviaturas: GR: Receptor para glicocorticóides.

## 1.2 – MACRÓFAGOS

O termo macrófago foi introduzido na literatura em 1893 por Metchnikoff para descrever células capazes de fagocitar microrganismos e que desempenham um papel fundamental no mecanismo de defesa do organismo. Estas células fazem parte do sistema mononuclear fagocítico que também compreende células progenitoras da medula óssea, promonócitos, monócitos do sangue periférico e macrófagos existentes nos tecidos. Os monócitos permanecem na circulação por cerca de 1-3 dias, período após o qual migram para os diversos tecidos, onde se diferenciam e formam populações de macrófagos residentes, com o tempo variando entre 2 – 4 meses (AUGER; ROSS, 1992).

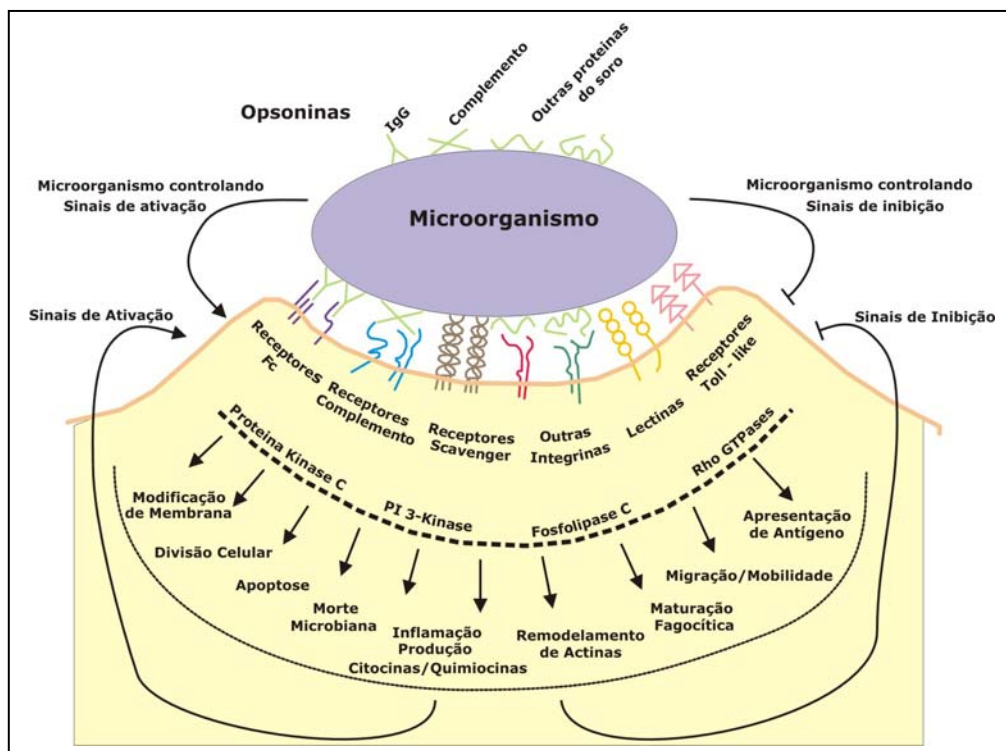
Durante a diferenciação dos monócitos para macrófagos ocorrem várias mudanças, como o aumento do tamanho (25-50  $\mu\text{m}$  de diâmetro). Os macrófagos possuem núcleo irregular, com um ou mais nucléolos, cromatina pouco condensada, citoesqueleto bem desenvolvido, inúmeras projeções citoplasmáticas, grande número de lisossomos, complexo de Golgi e mitocôndrias, e expressão de diversos receptores de superfície, como os de imunoglobulina e complemento (CLINE; GLODE, 1973).

Essas células constituem a primeira linha de defesa do organismo, influenciando vários aspectos da resposta imune e inflamatória. Desempenham um papel fundamental na união entre os sistemas imune inato e adaptativo.

Os glicocorticóides atuam diretamente no SI como descrito anteriormente, assim se torna importante pesquisar sobre a ação desses hormônios nas células ligada à resposta imune.

### 1.3 – RECEPTORES

O reconhecimento primário de patógenos ocorre através de receptores de membrana plasmática. Estas moléculas protéicas compreendem receptores de imunoglobulinas, receptores de complemento, lectina, *scavenger*, dentre vários outros (Figura 2).



**Figura 2** - Receptores e vias de sinalização envolvidas na fagocitose de microorganismos. Vários receptores reconhecem simultaneamente microorganismos através de ligação direta com a superfície dos microorganismos ou por opsoninas ligada a eles. Este reconhecimento através dos receptores ativam vias de sinalização intracelulares. Adaptado de Underhill e Ozinsky, (2002). Abreviaturas: IgG: imunoglobulina G, PI: fosfatidilinositol.

Trataremos em nosso trabalho dos receptores para porção Fc de IgG (FcγR) e de manose/fucose. Estes receptores controlam as atividades dos macrófagos tais como: crescimento, diferenciação, ativação, migração, endocitose e secreção.

Portanto, são importantes em processos fisiológicos e patológicos, incluindo a defesa do hospedeiro, inflamações e reparos (GORDON et al. 1998).

Os receptores Fc $\gamma$ R são subdivididos em três classes principais Fc $\gamma$ RI (CD64), Fc $\gamma$ RII (CD32) e Fc $\gamma$ RIII (CD16) que são codificados por genes distintos, sendo que alguns destes genes têm múltiplos exons e a seleção entre estes, na junção do RNA mensageiro pode gerar proteínas diferentes. A análise da seqüência dos RNAs mensageiros indica a ocorrência de várias isoformas das três principais classes de Fc $\gamma$ R (MARZOCCHI-MACHADO; LUCISANO-VALIM, 2005).

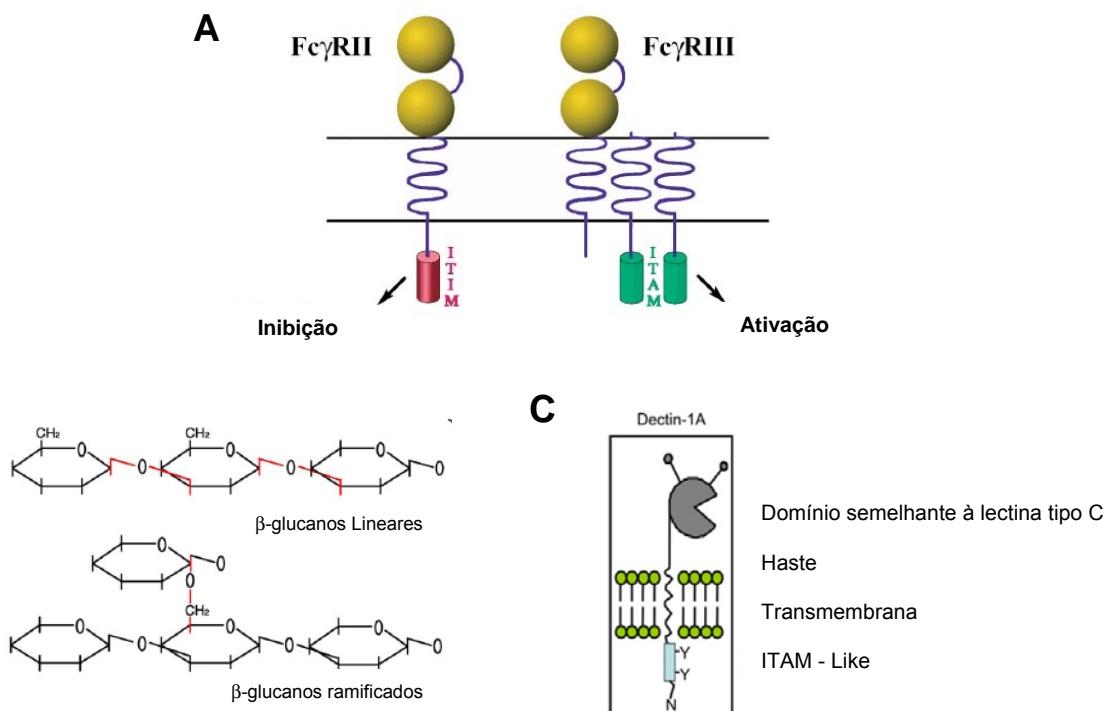
Fc $\gamma$ RI (CD34) é uma glicoproteína de alta afinidade para IgG, podendo ligar a IgG monomérica. Está presente constitutivamente em monócitos e macrófagos podendo ser induzido em neutrófilos. Os Fc $\gamma$ RII (CD32) são mais amplamente distribuídos entre as células humanas e os Fc $\gamma$ RIII (CD16) são receptores considerados de média afinidade.

Estas classes de receptores são caracterizadas pela presença de motivos ITAM (motivo ativador baseado em tirosina) e ITIM (motivo inibidor baseado em tirosina) presentes no receptor Fc $\gamma$ RII o qual inibe a ativação celular (Figura 3A). Todas as classes de receptores possuem ITAM e na classe Fc $\gamma$ RII observa-se a presença de ITIM sendo que a isoforma Fc $\gamma$ RIIIa é ausente em camundongos (RAVETCH ; BOLLAND, 2001)

Macrófagos ativados por estes receptores geram uma sinalização intracelular caracterizada pela fosforilação da tirosina dentro dos motivos ITAM após o agrupamento dos mesmos, resultando em diversas alterações funcionais, bioquímicas e morfológicas. Esta fosforilação se deve a famílias de quinases src. Cada classe de Fc $\gamma$ R ativa proteínas quinases específicas pertencentes a este grupo, por exemplo, as quinases lck, lyn e fgr. O segundo grupo de quinases que se

tornam ativadas é a família syk (RAVETCH; BOLLAND, 2001; MARZOCCHI-MACHADO; LUCISANO-VALIM, 2005).

O processo de reconhecimento de patógenos pelos fagócitos pode envolver múltiplas interações ligante-receptor com opsoninas, como imunoglobulinas, componentes do complemento, os quais amplificam as atividades celulares para internalização dos agentes patogênicos (ADEREM; UNDERHILL, 1999; UNDERHILL; OZINSKY, 2002).



**Figura 3 - (A):** Representação esquemática dos receptores Fc $\gamma$  (Adaptado de Ravetch; 2002), **(B):** Estrutura de uma  $\beta$ -glucano que compreendem o maior componente de muitas paredes celulares de fungos e ocorrem de forma linear (ligação 1,3) ou ramificada (Adaptado de Herre et al. 2004). **(C):** Receptor de dectina, ITAM: Motivos de ativação (Adaptado de Tsoni et al. 2008).

A geração de fragmentos do sistema complemento, como C3b e C4b, que atuam como opsoninas, ocorre por três vias distintas conhecidas como clássica, alternativa e das lectinas. Em todas estas vias de ativação desencadeiam-se

seqüências de reações enzimáticas e não enzimáticas, gerando fragmentos de ativação bem como macromoléculas resultantes da associação destes vários componentes os quais são mediadores de muitas funções biológicas importantes, como a participação na resposta inflamatória até a lise celular (WALPORT, 2001).

Todas estas vias compartilham um passo comum, o de ativar o componente central C3, mas os passos iniciais bioquímicos são distintos. A via clássica é ativada por imunocomplexos (anticorpo+ antígeno), e é iniciada quando o componente C1 (complexo protéico formado por C1q, C1r e C1s), se liga a sítios específicos presentes nas imunoglobulinas, o que leva a uma modificação na estrutura de C1 e a ativação das pró - enzimas C1s e C1r. A partir deste evento, vários componentes a fragmentos se originam, sendo um destes componentes a C3 convertase (C4b2a), que cliva C3 resultando em dois fragmentos, C3a e C3b (CAMPBELL et al. 1980). O C3b se associa com o complexo C4b2a formando a C5 convertase da via clássica (C4b2a3b) que cliva o componente C5 em dois fragmentos, C5a e C5b. O componente menor C5a se difunde para o meio e o componente maior C5b dá início a ativação da via terminal do complemento.

A via das lectinas é ativada quando ocorre uma ligação dos polissacarídeos presentes na superfície de uma variedade de microorganismos com as lectinas circulantes como MBLs (lectina ligadora de manose) e lectina tipo C, (NETH et al. 2000) o que culmina na ativação das MBL - MASP (Complexos de serina proteases). A enzima MASP-2 cliva então os componente C4 e C2, gerando C3 convertase, C4b2a. Os passos seguintes de ativação são similares aos da via clássica.

Por último temos a via alternativa do sistema complemento, proposta desde 1954, cuja ativação pode ser mediada por várias moléculas presente na superfície de microorganismos tais como lipopolissacarídeo, independentemente da formação



de complexos antígeno - anticorpo (PILLEMER et al. 1954; FEARON ; AUSTEN, 1975).

O componente C3 presente na fase fluida pode ser clivado através de proteases ou pela ação nucleofílica da água dando origem aos fragmentos C3a e C3b. O fragmento C3b possui uma meia vida curta, sendo inativado quando não associado a uma superfície ativadora; ao contrário, quando se associa a uma superfície o C3b combina com o fator B na presença de íons  $Mg^{2+}$ , que quebra o fator D, o qual cliva B dando origem a Ba e Bb. Bb se agrupa ao C3b dando origem a convertase C3bBb ligada a membrana (MORGAN, 1995).

C3b pode interagir com C3 convertase da via alternativa formando C3bBb3b, a C5 convertase, que cliva o componente C5. O fragmento C5b dá início a formação do complexo de ataque à membrana.

Existem 4 receptores para complemento CR1 (CD35) e CR2(CD21), e os membros da família das  $\beta 2$  integrina CR3(CD11b/CD18) e CR4(CD11c/ CD18), e atualmente um novo receptor CR1g, um membro da superfamília das imunoglobulinas (ROSS, 1992; HELMY et al. 2006)

CR1 (CD35) é uma glicoproteína de 200 kDa, que atua como um receptor de aderência, e se liga com alta afinidade a C3b e C4b. O CR2 (CD21) se liga a C3bi e C3dg. Já os receptores CR3 e CR4 estão envolvidos no reconhecimento do C3bi. Eles pertencem à família das integrinas e participam da fagocitose e migração celular (ROSS, 1992).

CR1g é um receptor de complemento recentemente identificado pertencendo à superfamília das imunoglobulinas. A expressão de CR1g é restrita para um subconjunto de macrófagos teciduais residentes. Estes incluem células de Kupffer

do fígado, macrófagos presentes nas sinóvia das articulações, células espumosas presentes em placas de arteriosclerose (HELMY et al. 2006).

Dentre os receptores que reconhecem moléculas potencialmente perigosas sem necessidade de opsonização, estão os receptores de lectinas. Estes receptores reconhecem moléculas amplamente presentes em microorganismos, como as lectinas.

Os receptores de lectina compreendem os receptores de manose e  $\beta$ -glucano. Os receptores de manose reconhecem oligo manose  $\alpha$  ligadas, estão expressos em macrófagos e células dendríticas e a estimulação com  $\text{IFN}\gamma$  ou LPS diminui sua expressão (JONES et al. 1999).

O receptor de  $\beta$ -glucano reconhece oligossacarídeos ligados através de ligações  $\beta$  em conjunto com o receptor de manose que participa do reconhecimento de microorganismos. A dectina – 1 é o receptor de  $\beta$ -glucano e apresenta um domínio lectina-like constituída por uma cauda citoplasmática contendo motivos ITAM, sendo expressa em células dendríticas, monócitos, macrófagos e neutrófilos (Figura 3 B e C).

Dessa maneira os macrófagos possuem uma diversa expressão de receptores em sua membrana plasmática que permitem uma comunicação com o meio em que está localizado, recebendo informações para exercer sua função ou para cessá-las. Assim estes receptores controlam as atividades dos macrófagos tais como ativação, migração, endocitose, fagocitose, explosão respiratória e secreção, sendo de grande importância nos processos fisiológicos e patológicos (GORDON et al. 1998).

## 1.4 - ATIVAÇÃO CELULAR

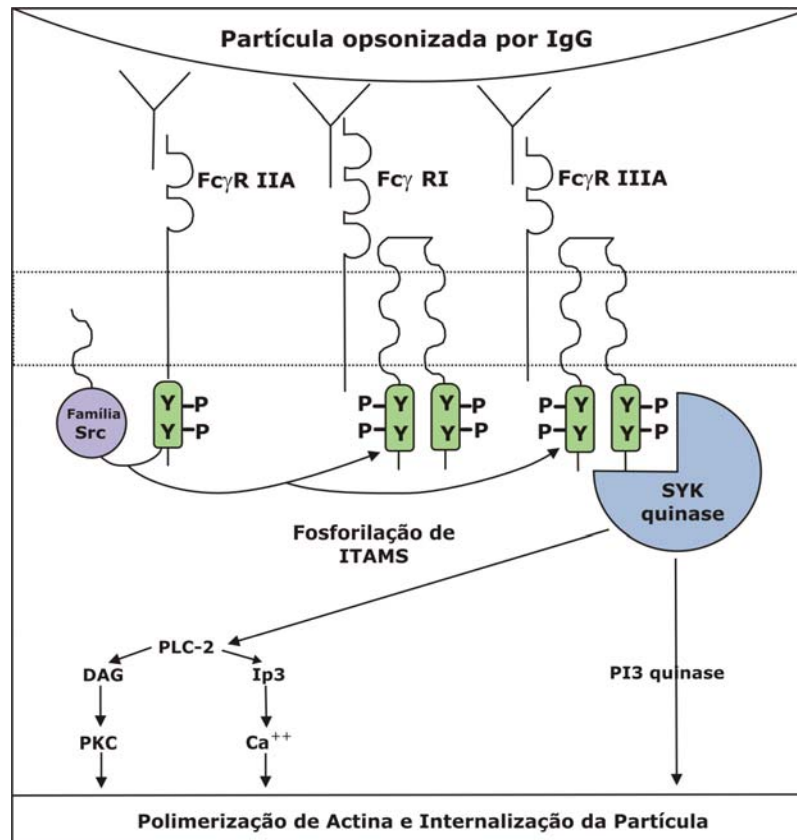
Os macrófagos são conhecidos por influenciar a atividade celular e homeostase de vários tecidos, por defender contra antígenos invasores, células tumorais recém formadas, por servirem como células apresentadoras de antígeno e remoção de células senescentes.

Estas células podem sofrer estimulação por agentes inflamatórios, e quando isso ocorre adquirem características próprias, tanto morfológicas quanto funcionais, como por exemplo, maior capacidade para realizar o processo de fagocitose, aumento da atividade microbicida devido à produção de espécies reativas de oxigênio (DAVIES, 1994).

Todo este processo gera uma ativação dos macrófagos por meio de receptores presentes na membrana celular, que os capacitam a desenvolver com eficiência o processo de fagocitose e atividade microbicida. Esta atividade libera grande quantidade de enzimas hidrolíticas, agentes oxidantes e diversos mediadores inflamatórios importantes tais como citocinas e óxido nítrico, associada a uma elevada produção de metabólitos do ácido araquidônico como leucotrienos e prostaglandinas.

A cascata de transdução de sinal realizada pela fagocitose pode ser geralmente dividida em três estágios. Primeiramente ocorre a ligação da partícula na superfície dos fagócitos, com subsequente união dos receptores e ativação de tirosinas quinases associadas aos domínios citoplasmáticos ou cadeias acessórias. Posteriormente, ocorrem fosforilações em resíduos de tirosinas (Y) dentro dos motivos ITAM presentes nos receptores por membros da família Src (Lyn e Hck). Por último ocorre uma auto-fosforilação e ativação da proteína quinase Syk que aciona

vias de sinalização intracelular através de fosfolipases (PLC). Essa fosfolipase gera mediadores e segundos mensageiros para o processo de fagocitose e do *burst* oxidativo (MARZOCCHI-MACHADO; LUCISANO-VALIM, 2005) (Figura 4).



**Figura 4** - Esquema representando vias de sinalização para receptores Fc $\gamma$ R durante a ativação celular. Esta figura demonstra um exemplo clássico de ativação celular pela fosforilação de motivos ITAM (motivos de ativação baseados em tirosina). Adaptado de Aderem; Underhill (1999). Abreviaturas: src e syk: proteínas tirosinas quinase; PI 3: fosfatidilinositol 3 quinase, IP 3: inositol-1, 4,5-trifosfato, DAG: diacilglicerol, PKC: proteína quinase C, PLC: fosfolipase C, Ca<sup>++</sup>: íons cálcio.

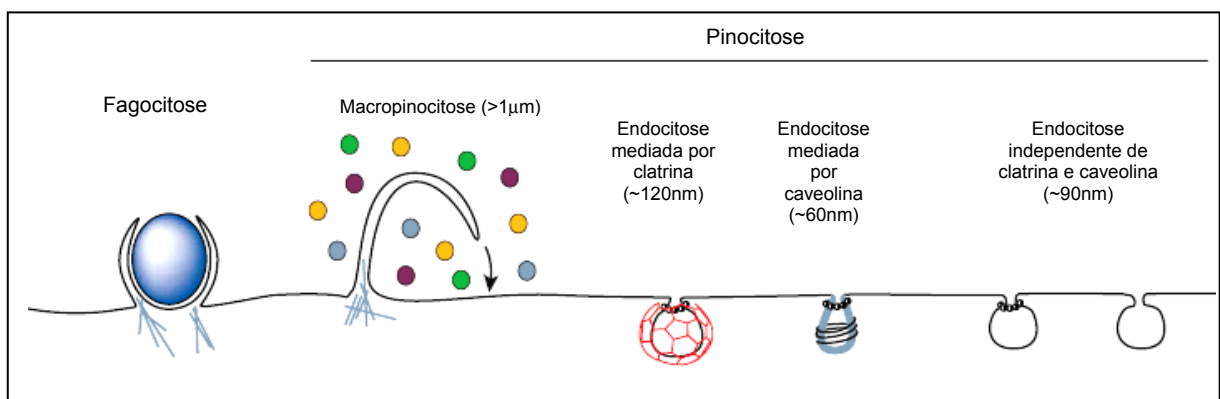
## 1.5 – INTERIORIZAÇÃO E *BURST* OXIDATIVO

Existem várias maneiras das células internalizarem partículas. A fagocitose é uma destas estratégias e envolve a interiorização de partículas grandes. Já a

pinocitose de maneira genérica, refere-se à interiorização de partículas menores, podendo ser dividida em quatro processos distintos: macropinocitose, endocitose clatrina-dependente, endocitose caveolina-dependente e endocitose independente de clatrina e caveolina (Figura 5) (CONNER; SCHMID, 2003).

Nos macrófagos, após a ativação dos receptores presentes na membrana celular ocorre uma série de eventos, como sinalização intracelular, rearranjo do citoesqueleto, alteração na conformação da membrana, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a fagocitose.

O citoesqueleto está envolvido diretamente neste processo, através de uma complexa e dinâmica rede de filamentos que atuam no processo de fagocitose sendo os filamentos de actina elementos importantes neste evento.



**Figura 5** - Esquema das principais vias celulares de interiorização de partículas (Adaptado de Conner; Schmid, 2003).

A utilização de ferramentas químicas como drogas que inibem processos de interiorização contribuem para o esclarecimento das bases bioquímicas destes processos.

As citocalasinas constituem uma família de metabólitos excretados por várias espécies de fungos, sendo denominadas como drogas actino-específicas, por

atuarem especificamente nos filamentos de actina modificando a maquinaria celular e conseqüentemente a morfologia. Elas atuam inibindo a polimerização dos filamentos de actina por ligar-se a extremidade do filamento de rápida polimerização (SAMPATH ; POLLARD, 1991).

A clorpromazina é responsável pela inibição da endocitose clatrina-dependente que atua inibindo a formação de clatrina através de uma desorganização na membrana celular aumentando a sua fluidez e a nistatina que interfere com a endocitose caveolina-dependente por ter a capacidade de interagir com o colesterol presente na membrana (SANTOS et al. 2008).

A fagocitose é um processo de internalização de partículas com tamanho de aproximadamente maior ou igual a 0,5  $\mu\text{m}$  sendo dependente do evento de aderência. A aderência da partícula a célula se dá através de receptores juntamente com a reorganização das estruturas especializadas do citoesqueleto, os filamentos de actina, para a formação do pseudópode, todo este processo é independente de clatrina (ADEREM; UNDERHILL, 1999).

Segundo Griffin et al. (1975) existem dois mecanismos para que ocorra este englobamento, denominados de mecanismo de zíper e mecanismo de gatilho (*Trigger*).

O modelo zíper originou-se a partir de estudos de fagocitose de eritrócitos e bactérias, mediada por receptores Fc e para complemento em macrófagos. Observou-se que o contato entre o fagócito e a partícula promove projeções na membrana da célula (pseudópode), para formar um fagossoma justaposto a partícula; o avanço deste pseudópode ao redor da partícula requer a polimerização de receptores na membrana que ocorre semelhante ao fechamento de um zíper.

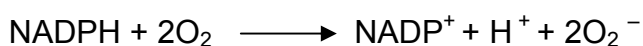
Neste processo existem interações receptor-opsoninas presente na superfície da partícula.

O modelo de gatilho é na verdade um mecanismo alternativo para a fagocitose, uma vez que o modelo anterior não se aplica a alguns tipos de fagocitose. De acordo com este modelo, a ligação inicial de uma partícula a superfície celular é suficiente para a ingestão completa da partícula.

Quando a fagocitose é mediada por receptores Fcγ inicia-se o processo pelo mecanismo de Zíper (SWANSON; BAER, 1995), ao contrário da fagocitose mediada por receptores para complemento (CR1 e CR3), onde o processo é uma variação do modelo clássico de *zíper* (ADEREN; UNDERHILL, 1999).

O processo de fagocitose pode ocorrer concomitantemente com a explosão respiratória que é um aumento da taxa de captação de oxigênio dando origem às espécies reativas de oxigênio (ROS). Estas espécies estão envolvidas na atividade microbicida e sinalização intracelular e compreendem ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, radical hidroxil, óxido nítrico, peroxinitrito, oxigênio singlet. Vários estudos evidenciam que o peróxido de hidrogênio está diretamente envolvido na sinalização intracelular por ativar proteínas de transcrição NF-κB (Nuclear factor-κB) e ERK (extracellular-regulated Kinase) (ILES; FORMAN, 2002; FORMAN; TORRES, 2002).

A produção de ROS inicia-se com a ativação de um complexo protéico denominado de nicotinamina adenina dinucleotideo fosfato reduzida (NADPH oxidase) que cataliza a seguinte reação:



A estrutura da NADPH oxidase é um complexo enzimático presente na membrana plasmática é composto por duas proteínas de membrana (gp91<sup>phox</sup> e

p22<sup>phox</sup>) que coexistem em um heterodímero denominado de flavocitocromo *b558* e pelas as demais proteínas citosólicas p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup>, na forma de um complexo além de uma proteína GTP relacionada à rac (BABIOR, 1999; BERGENDI et al. 1999).

Este complexo está em repouso nas células não estimuladas, podendo ser ativado quando os macrófagos são expostos a estímulos específicos que culminam em vias de ativação intracelular liberando diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3) através da fosfolipase C. Ocorre subsequentemente a liberação de cálcio do retículo endoplasmático devido à ligação do IP3 aos canais de cálcio dependente de IP3, causando a ativação da proteína quinase C (PKC). A ativação da PKC pela ligação de DAG na presença de cálcio, e esta ativação promove a fosforilação dos componentes citosólicos da NADPH oxidase, particularmente a p47<sup>phox</sup>.

Quando o componente p47<sup>phox</sup> torna-se fosforilado ocorre uma modificação conformacional resultando na translocação do complexo p47<sup>phox</sup>/ p67<sup>phox</sup> para a membrana citoplasmática, onde a via de interação dos múltiplos sítios de ligações com proteínas de membrana, citocromo b, forma o complexo enzimático ativo. A atividade da enzima requer também a translocação da Rac GTP para a membrana citoplasmática (BOKOCH; DIEBOLD, 2002).

Os fagossomas por si só possuem pequena atividade microbicida, adquirida através de um processo de maturação que envolve uma série de eventos complexos de fusão de endossomas e lisossomas para a formação de fagolisossomas. A maturação do fagossoma resulta numa forte acidificação intravesicular, atividade proteolítica lisossomal e geração de ROS (UNDERHILL; OZINSKY, 2002).

Nos sistemas biológicos, existe uma grande atenção para produção do radical superóxido, pois em pH fisiológico sofre rapidamente dismutação produzindo



peróxido de hidrogênio. O peróxido de hidrogênio, na presença de íons metálicos, pode originar radicais hidroxil. O radical hidroxil tem um caráter altamente tóxico para as células, sendo assim necessário mecanismos para evitar a sua formação. A eliminação do íon superóxido ocorre através de reações enzimáticas utilizando superóxido dismutase, e para peróxido de hidrogênio a catalase e peroxidases (ROSEN et al. 1995).

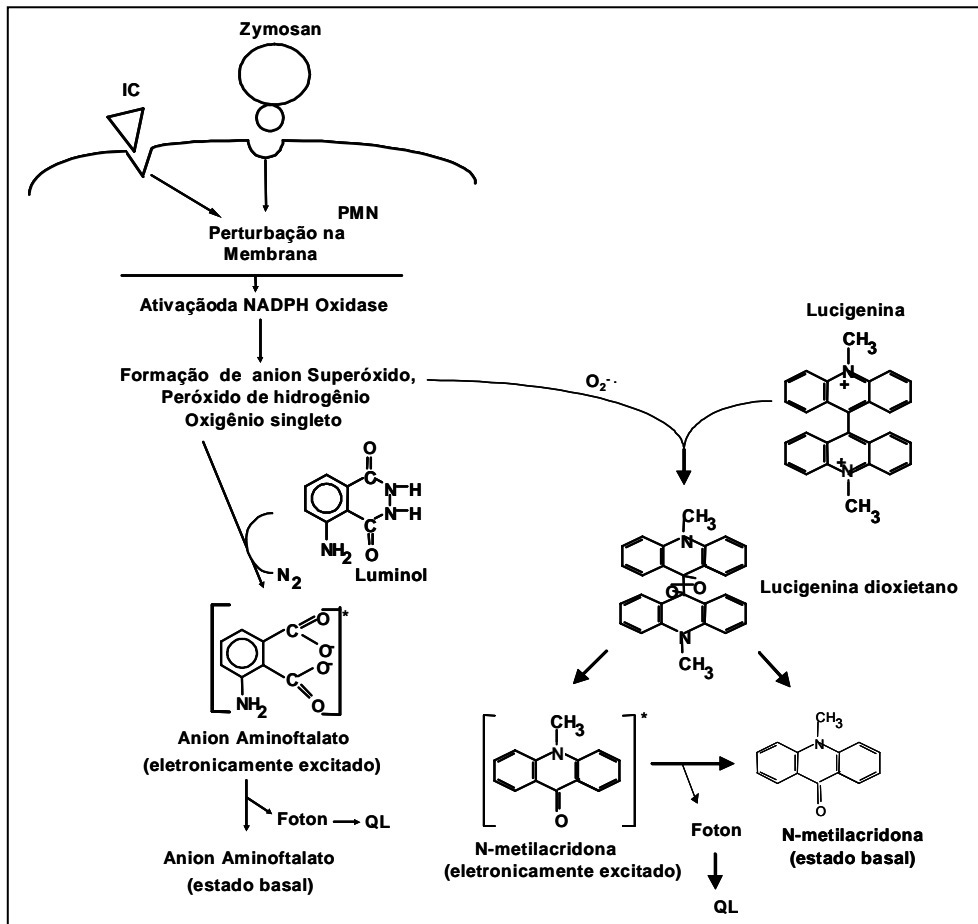
## 1.6 – QUIMIOLUMINESCÊNCIA

Diferentes métodos têm sido desenvolvidos para avaliar a produção *in vitro* de espécies reativas de oxigênio por células fagocíticas, e um dos mais empregados é o método de quimioluminescência. Vários marcadores luminescentes atuam como sondas amplificadoras que são oxidadas ao interagir com as espécies reativas de oxigênio se tornando intermediários eletronicamente excitados. Quando retornam ao seu estado basal emitem fótons que são quantificados pelo aparelho (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1986).

A sonda luminol é um composto usado para medir a produção de diversas espécies reativas de oxigênio produzidas pelos fagócitos. Assim a quimioluminescência dependente de luminol (QL-lum) representa a somatória das QL decorrentes da oxidação do luminol pelas diferentes ROS produzidas pelos fagócitos, num determinado intervalo de tempo.

A sonda lucigenina (luc) mede a produção do primeiro radical formado, o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), através da redução do oxigênio molecular pelo sistema da NADPH-oxidase. Na Figura 6, está representado o mecanismo proposto para

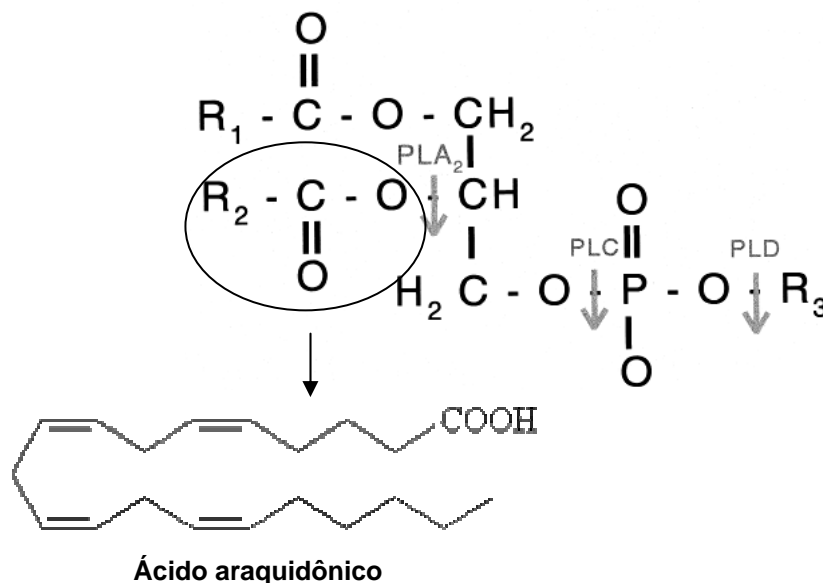
descrever a origem e a regulação da quimioluminescência (QL) em células e as reações químicas envolvidas na QL-lum e na QL-luc.



**Figura 6** - Representação simplificada do mecanismo proposto para descrever a origem e a regulação da quimioluminescência (QL) em células fagocíticas e das reações químicas envolvidas na QL dependente de luminol e na QL dependente de lucigenina. Em procedimentos experimentais, estas sondas são utilizadas separadamente. A ligação de estímulos aos receptores de membrana celular leva a ativação do complexo NADPH oxidase que produz ( $O_2^{\cdot-}$ ), esse é convertido em  $H_2O_2$ , que participa de outras reações dando origem a diferentes produtos ( $OH^{\cdot}$ ;  $^1O_2$ ). A ROS derivada do  $H_2O_2$  podem ser detectada pelo luminol (QL dependente de luminol = QLlum), enquanto que o  $O_2^{\cdot-}$  pode ser detectado pela sonda lucigenina (QL dependente de lucigenina = QLluc). Esquema elaborado e modificado por Cheung et al. (1983).

## 1.7 - FOSFOLIPASE A2 (PLA<sub>2</sub>) e ÁCIDO ARAQUIDÔNICO

As fosfolipases são enzimas hidrolíticas que estão agrupadas nas famílias A<sub>1</sub> (PLA<sub>1</sub>), A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), B (PLB), C (PLC) e D (PLD) de acordo com a ligação hidrolisada no fosfolipídio. A fosfolipase A2 (PLA<sub>2</sub>) compreende uma superfamília de enzimas que catalisam a hidrólise da posição sn-2 dos fosfolipídios de membranas celulares levando a produção de ácido graxo livre e lisofosfolipídeos. O primeiro sistema enzimático que regula a liberação do ácido araquidônico é a fosfolipase A2 (Figura 7).



**Figura 7** - Esquema representativo da posição de clivagem das fosfolipases nos fosfolipídeos de membrana. Produção do ácido araquidônico pela PLA<sub>2</sub> (Adaptado de Lennartz, 1999).

Os macrófagos expressam três classes de fosfolipase A2 (PLA<sub>2</sub>): as secretadas dependentes de Ca<sup>2+</sup> (sPLA<sub>2</sub>), as citosólicas dependentes de Ca<sup>2+</sup> (cPLA<sub>2</sub>) e as independentes de Ca<sup>2+</sup> (iPLA<sub>2</sub>). Os produtos de ativação destas fosfolipases são de particular interesse, pois são mensageiros secundários e

mediadores lipídicos, com potencial de modular a resposta imune (LENNARTZ, 1999; CHAKRABORTI, 2003).

Dentre as fosfolipases A<sub>2</sub>, as fosfolipases A<sub>2</sub> secretadas (PLA<sub>2</sub>s) compreendem o grupo de enzimas mais amplamente estudadas. O envolvimento de (PLA<sub>2</sub>s) do grupo IIA de mamíferos no desenvolvimento de diversas patologias de origem inflamatória tem sido descrito.

A fosfolipase A<sub>2</sub> secretada humana do grupo IIA (hsPLA<sub>2</sub>gIIA) foi inicialmente caracterizada como uma enzima secretada encontrada no fluido sinovial e é considerada uma proteína de fase aguda da resposta imunológica, pois sua expressão é induzida por endotoxinas e citocinas via processos autócrinos e/ou parácrinos durante processos inflamatórios (KRAMER et al. 1989; SEILHAMER et al. 1989; CROWL et al. 1991).

Sabe-se que a ativação da resposta imune inata pode ser induzida através de diferentes estímulos, como agentes infecciosos e seus produtos, materiais tóxicos, traumas, partículas ou células estranhas, que resultam na síntese de diferentes mediadores.

Alguns estudos têm mostrado que PLA<sub>2</sub>s secretadas (sPLA<sub>2</sub>s) contribuem para a biossíntese de mediadores lipídicos em células inflamatórias, tais como mastócitos, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos (TRIGGIANI et al. 2003). Entre estes mediadores podemos citar derivados dos fosfolipídeos de membrana, como o fator ativador de plaquetas (PAF), metabólitos do ácido araquidônico (AA) como leucotrienos, prostaglandinas e tromboxanas.

O ácido araquidônico (AA) é um ácido graxo poliinsaturado armazenado nos lipídeos de membrana das células sendo precursor das prostaglandinas, leucotrienos, tromboxanas e endocanabinóides os quais são considerados

mediadores e reguladores da inflamação. A produção e a liberação de ácido araquidônico da membrana são realizadas por três vias distintas:

- É liberada pela ativação da fosfolipase D (PLD), que catalisa a formação do ácido fosfatídico a partir de fosfatidil etanolamina ou fosfatidilcolina, dando origem as diglicerídeos, monoglicerídeos e ácido araquidônico.

- Através da fosfolipase C (PLC) que medeia a conversão de fosfatidilinositol (PI) em diacilglicerol (DAG), seguida da ação da DAGlipase e monoglicerídeo lipase produzindo ácido araquidônico e glicerol.

- Ação da PLA<sub>2</sub> em fosfolipídeos de membrana.

Uma vez liberado, o ácido araquidônico livre tem uma vida curta sendo esterificado em fosfolipídeos de membrana, metabolizado em eicosanóides ou liberado pelas células, onde pode modular a atividade de canais de íons e proteínas quinase.

O ácido araquidônico livre pode ser metabolizado por ação de três classes distintas de enzima: ciclooxigenase, lipooxigenase e citocromo P450.

A fosfolipase envolvida no processo fagocítico é a iPLA2 a qual se localiza no citosol da célula e uma vez ativada libera ácido araquidônico. No entanto esta fosfolipase citosólica, dependente de Ca<sup>2+</sup> é ativada quando ocorre uma ligação de partículas com receptores Fcγ e é crítica na geração do *burst* oxidativo mediado pela NADPH oxidase.

NADPH oxidase é ativada por ácido araquidônico livre sendo esta produção realizada pela cPLA2, existindo assim uma direta relação entre cPLA2 e NADPH oxidase (SAKATA et al. 1987; POMPÉIA et al. 2003).

Em monócitos, inibidores da sPLA2 diminuíram a liberação de AA e a fagocitose mediada por IgG. O efeito desta inibição pode ser superado quando se

adiciona AA sugerindo o envolvimento direto dessa fosfolipase na fagocitose (LENARTZ et al. 1993).

Portanto as sPLA2 ativam eventos de sinalização intracelular, em células que participam de processos inflamatórios, a partir da geração de segundos mensageiros e fosforilação de quinases diretamente ligadas nessas sinalizações (BAEK et al. 2001; BECK et al. 2003). Dessa forma as PLA2 representam um importante alvo para a investigação, no que se refere aos mecanismos de ativação e inibição na presença de determinados hormônios.

### **1.8 - PAPEL DO ÁCIDO ARAQUIDÔNICO NA FAGOCITOSE**

Durante o processo de interiorização ocorrem modificações na membrana celular e no rearranjo do citoesqueleto. Segundo Lenartz (1999), para a formação dos pseudópodes e posteriormente os fagossomas são necessários a união de vesículas na membrana plasmática e este processo requer a participação do AA sendo assim um elemento importante para a fagocitose.

Estudos de microscopia eletrônica demonstraram que drogas como bromoenol lactona (BEL), um potente inibidor da iPLA2, promovem um acúmulo de vesículas abaixo da partícula a ser fagocitada, formando pseudópodes pequenos ou até mesmo ausentes, mas após a adição do ácido araquidônico a fagocitose foi restaurada devido à incorporação das vesículas na membrana favorecendo a formação dos fagossomas (BOOTH, 2001).

Segundo Karime e Lennartz (1995), essas vesículas são detectadas durante as fases iniciais da fagocitose em monócitos/macrófagos, envolvendo a sinalização

de ativação intracelular de proteínas quinase C, bem como a liberação do ácido araquidônico devido à ativação de fosfolipases.

Durante a fagocitose mediada por IgG, como descrita anteriormente, ocorre a ativação de fosfolipases pertinentes à fagocitose, enriquecendo a fração citosólica com vesículas, contribuindo para uma maior eficiência no processo fagocítico.

A regulação da ativação da PLA<sub>2</sub> dependente de cálcio é complexa e vários fatores modulam esta atividade. O cálcio é um primeiro candidato indicado como regulador da ativação da PLA<sub>2</sub>. O cálcio citossólico possui um papel central nas vias de transdução de sinal, é um mensageiro intracelular fundamental que regula muitos processos celulares incluindo motilidade, excitose e até morte celular. É um importante segundo mensageiro para a ativação dos fagócitos, e em parte, atua na ativação do *burst* oxidativo e na fagocitose (BERRIDGE, 2004).

Dessa maneira o Ca<sup>2+</sup> se liga a PLA<sub>2</sub> ativando o sítio desta enzima pela coordenação com quatro resíduos de aminoácidos. Esta ativação, via de liberação do AA favorece o *burst* oxidativo em macrófagos através da ativação da NADPH oxidase que é um complexo enzimático presente na membrana plasmática dos macrófagos. Estudos com monócitos humanos ativados demonstram a necessidade da cPLA<sub>2</sub> para a translocação dos componentes da NADPH oxidase (p67phox e p47phox) na membrana plasmática (ZHAO et al. 2002).

Portanto tanto os eventos de fagocitose quanto o *burst* oxidativo estão diretamente ligados à liberação de ácido araquidônico através da ativação das fosfolipases.

*Objetivos*



## 2 - OBJETIVOS

---

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo desse trabalho foi investigar os efeitos da corticosterona em macrófagos peritoneais de camundongo estimulados por receptores Fc $\gamma$  e de manose/fucose.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar por microscopia ótica e por citometria de fluxo a capacidade dos macrófagos tratados com corticosterona ou não de interiorizarem hemácias opsonizadas com imunoglobulina G (EA); imunocomplexo de imunoglobulina G anti-ovoalbumina (IgG/OVA) e zimosan.

- Avaliar o mecanismo de interiorização do estímulo IgG/OVA e da toxicidade da clorpromazina, nistatina e citocalasina B sobre os macrófagos peritoneais de camundongos pelo ensaio de exclusão ao corante azul de tripan.

- Avaliar por quimioluminescência dependente de luminol (QLlum) e quimioluminescência dependente de lucigenina (QLluc) a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por macrófagos estimulados por IgG/OVA e zimosan, frente a corticosterona.

- Avaliar a toxicidade do AA sobre os macrófagos peritoneais de camundongos pelo ensaio de exclusão ao corante azul de tripan.

- Avaliar o efeito de diferentes concentrações de AA sobre as funções efetoras dos macrófagos peritoneais de camundongo (fagocitose e *burst* oxidativo).

- Investigar o efeito potencial do AA como sequestrador de ROS.

- Avaliar se o AA reverte os efeitos da corticosterona sobre a capacidade fagocítica e produção de espécies reativas dos macrófagos.

- Avaliar o efeito da corticosterona na atividade hidrolítica da fosfolipase A<sub>2</sub>.

## *Materiais e Métodos*

## 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

---

Este projeto está de acordo com os princípios éticos na experimentação animal (COBEA) e foi aprovado pela Comissão de ética em experimentação animal (CETEA), FMRP, USP, Ribeirão Preto (022/2007).

### 3.1 - Animais de experimentação

Foram utilizados camundongos machos da espécie BALB/c e Swiss pesando 20-25 g, como fonte de obtenção de macrófagos peritoneais e anticorpos contra hemácias de carneiro respectivamente. Coelhos da espécie Nova Zelândia pesando aproximadamente 2,5 kg foram utilizados para produção dos anticorpos anti ovoalbumina (OVA) e carneiros do tipo *merino* foram usados como fonte de hemácias. Estes animais foram fornecidos pelo Biotério Central do Campus da USP de Ribeirão Preto. Camundongos e coelhos foram mantidos no biotério do Departamento de Bioquímica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP.

### 3.2 - Obtenção dos macrófagos peritoneais

Para a obtenção dos macrófagos peritoneais, realizou-se a coleta através do lavado intraperitoneal dos camundongos. Estes foram eutanasiados por meio de deslocamento cervical. Posteriormente foi realizada a secção da pele abdominal para a exposição do peritônio. Foram injetados na cavidade peritoneal 3 a 5 mL de solução de Hank's gelado pH 7,4 a 4°C. Em seguida o abdômen foi massageado para que ocorresse o desprendimento das células. O lavado peritoneal foi coletado e

centrifugado a 582g a 4°C por 10 min. Após esta centrifugação, 1 mL de Hank's foi adicionado e uma alíquota foi diluída (1:20 v/v) em solução de turk para contagem total de macrófagos em câmara de Neubauer. Para a contagem diferencial utilizou-se o exsudato total analisado por microscopia ótica. A predominância de macrófagos (93%) foi confirmada por características morfológicas e através da coloração das lâminas com o corante panótico.

Realizado esta avaliação, as células foram ressuspendidas em Hank's e/ou Hank's com gelatina (0,1 %) (Solução tamponada pH 7,2) e a suspensão celular ajustada para experimentos específicos de quimioluminescência ( $1,3 \times 10^6$  células/mL) e para microscopia ótica utilizou-se o lavado peritoneal total (volume de 100  $\mu$ L/lamínula).

### **3.3 – Produção de anticorpos da classe das imunoglobulinas G**

#### **3.3.1 - Imunização e obtenção do soro**

Para a obtenção de IgG anti-OVA (imunoglobulina G anti-ovoalbumina) os coelhos foram imunizados com uma dose única de solução de OVA – 5 mg/mL emulsionada em adjuvante completo de Freund (1:1) subcutaneamente no dorso do animal. Depois de 30 dias foram eutanasiados com uma mistura de xilazina (5mg/Kg) e Ketamina (35mg/Kg), administrada por via intramuscular. O sangue foi colhido por punção cardíaca e logo após o procedimento os animais foram eutanasiados com injeção intra-cardíaca de cloreto de potássio (50mg/mL). O sangue colhido foi deixado em repouso à temperatura ambiente por 1 hora, e então centrifugado a 755g por 15 min.

Para a obtenção do anticorpo IgG anti-hemácias de carneiro (EA), camundongos swiss receberam 4 doses durante 4 semanas, sendo a primeira dose (0,4mL) endovenosa e as seguintes intraperitoneais (0,1mL) de suspensão de hemácias a 2,5 %, seguindo metodologia descrita por Lay; Nussenzweig (1969). Após a imunização, os animais foram eutanasiados por decapitação e a coleta do sangue (sem anticoagulante) foi efetuada. Centrifugou-se por 15 min a 755g (4°C) obtendo o soro imune total contendo IgG anti-E (imunoglobulina G anti hemácia de carneiro).

### **3.4 – Purificação e caracterização do anticorpo da classe-G**

A IgG foi separada dos outros componentes do soro imune seguindo-se a metodologia descrita por Lucisano; Mantovani (1984).

#### **3.4.1 - Purificação dos anticorpos da classe – G**

**3.4.1.1 – Precipitação:** o soro foi previamente inativado por 30 min a 37°C, e em seguida foi precipitado com uma solução saturada de sulfato de amônio (que foi adicionada ao soro imune total) a fim de se obter uma concentração final de 40 % (p/v). Neste processo de precipitação obtivemos uma fração protéica rica em imunoglobulina G (IgG), a qual foi mantida a 4°C por 12 horas e posteriormente centrifugada a 3000 g por 15 min a 4°C. O precipitado foi ressuscitado em uma solução de sulfato de amônio 40 % (p/v) para eliminar proteínas restantes solúveis, e novamente submetido à centrifugação a 6300 g por 15 min a 4°C. A fração precipitada foi solubilizada em salina e dialisada três vezes em tampão PBS durante

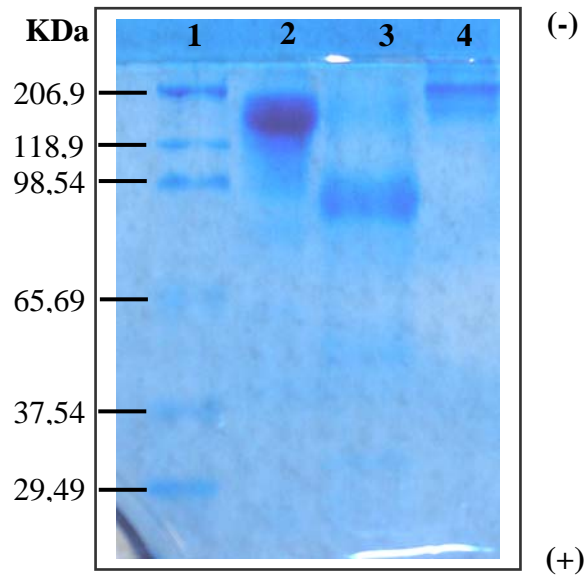
24 horas a 4°C. Na última diálise (a ser realizada) utilizou-se tampão fosfato 0,02 mol/L, pH 7,5.

**3.4.1.2 - Cromatografia por troca iônica:** As amostras de IgG anti-OVA e IgG anti E obtidas foram purificadas por cromatografia de troca iônica em coluna de DEAE – celulose, previamente equilibrada com o tampão fosfato 0,02 mol/L pH 7,5 (FAHEY et al. 1964). As frações cromatográficas foram avaliadas por espectrometria óptica em 280 nm.

### **3.5 - Identificação e caracterização dos anticorpos IgG**

**3.5.1- Eletroforese SDS-PAGE:** A técnica de eletroforese foi utilizada para a caracterização e avaliação da pureza das imunoglobulinas isoladas do soro de coelho (IgG anti-OVA) e de IgG anti-hemácias de carneiro seguindo metodologia descrita por Laemmli (1970) (Figura 8).

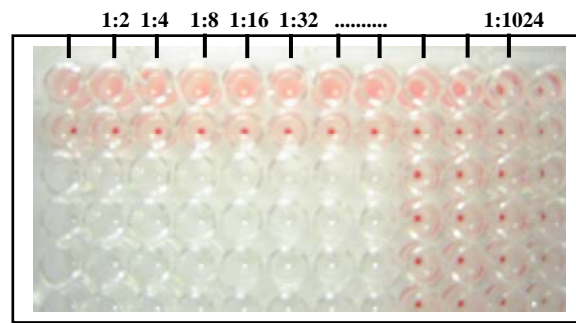
Amostras da preparação de IgG e dos padrões de proteínas foram diluídos em solução tampão tris-HCl (0,06 mol/L; pH 6,8) contendo glicerol (20 %), dodecil sulfato de sódio e azul de bromofenol. Posteriormente, essas amostras aplicadas no suporte para eletroforese, constituído de um gel de empilhamento (4%) e um gel de corrida (10%), ambos contendo SDS (10%). O processo de separação foi realizado sob corrente elétrica contínua de 40 mA, empregando-se solução tampão tris-glicina, pH 8,3 como fase móvel. O gel foi submetido a processo de coloração com coomassie brilliant blue R (preparado a 0,25% (p/v) em uma mistura de metanol, ácido acético e água) por 1 hora, seguido de descoloração com mistura de metanol, ácido acético e água.



**Figura 8** - Eletroforese em Gel de poliacrilamida com SDS. **1** - padrão de massa molecular Bio-Rad. **2** - IgG anti - Ovoalbumina; **3** - F(ab')<sub>2</sub> de IgG anti - Ovoalbumina; **4** - IgG anti-hemácias de carneiro. Abreviaturas: IgG: imunoglobulina da classe G; OVA: ovoalbumina; F(ab')<sub>2</sub>: Fragmento de IgG anti ovoalbumina.

### 3.5.2 - Determinação do título de hemaglutinação (IgG/E)

O soro anti-hemácias foi submetido à determinação do título de hemaglutinação. Inicialmente realizaram-se diluições sucessivas do soro imune com PBS a ser testado (100 µL), e posteriormente incubou-se cada diluição com 100 µL de hemácias de carneiro a 0,4% em PBS. Deixou-se em câmara úmida por 24 horas a 4°C. Assim definiu-se o título do anti-soro considerado como a maior diluição do mesmo que fornece um padrão de hemácias aglutinadas (título 1:1024) (Figura 9).



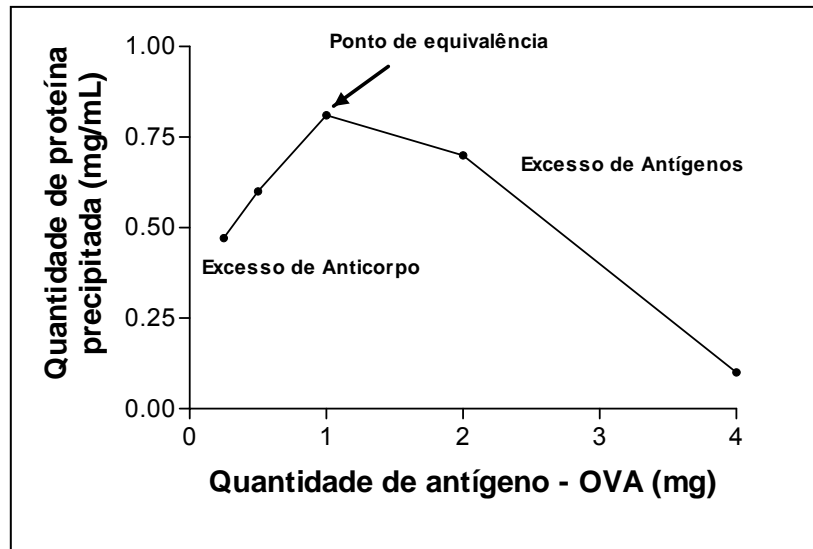
**Figura 9** – Placa de Imunohemoaglutinação. Diluições sucessivas do anticorpo juntamente com suspensão de hemácias 0,4% em PBS.

**3.5.3 - Curva de precipitação da IgG anti-OVA:** As curvas de precipitação dos imunocomplexos preparados com IgG foram construídas baseadas nas condições experimentais definidas nas imunodifusões, segundo Ouchterlony, (1958).

As curvas de precipitação, para os anticorpos IgG anti-OVA foram preparadas pela adição de 100  $\mu$ L da preparação de anticorpo sem diluir (s/d) a quatro tubos contendo 100  $\mu$ L do antígeno (s/d) e em diluições sucessivas (1:2, 1:4, 1:8, 1:16) em solução de PBS pH 7,2 a partir de uma solução de ovoalbumina 4 mg/mL.

As misturas foram incubadas a 37°C por 1 hora e, em seguida, foram mantidas a 4°C durante 24 horas. A dosagem foi realizada através do método de microbiureto (Figura 10) (ITZHAKI; GILL; 1964).





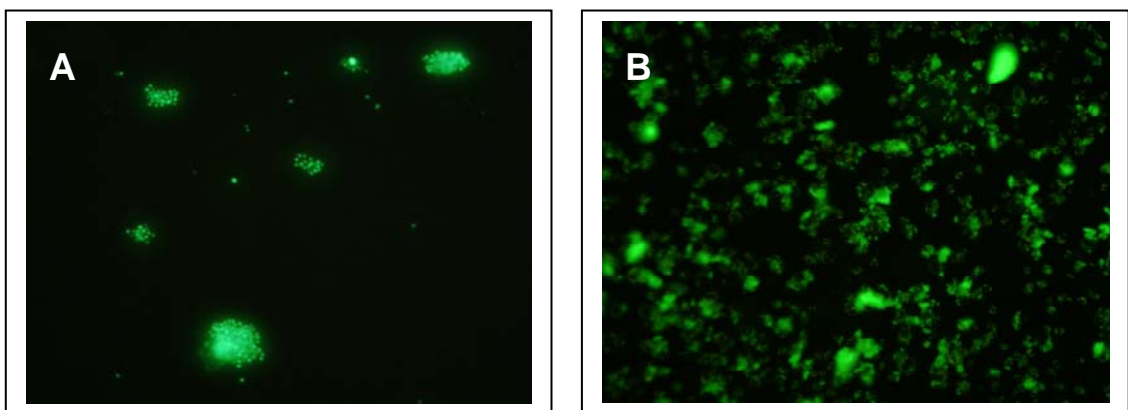
**Figura 10** - Curva de precipitação para IC-IgG anti OVA. A concentração do anticorpo (Ac) foi fixada, variando-se a concentração do antígeno (Ag) a partir de uma solução de OVA a 2 mg/mL. A seta indica o ponto de equivalência, onde a proporção de OVA e de IgG anti-OVA leva a formação da quantidade máxima de imunocomplexos precipitados. A proporção Ac/Ag neste ponto foi: anticorpo sem diluir e Ag 1 mg/mL. IgG: imunoglobulina da classe G; OVA: ovalbumina.

### 3.6 – Marcação de proteína ovoalbumina e partículas de Zimosan com isotiocianato de fluoresceína (FITC)

A proteína ovoalbumina foi marcada com FITC segundo a técnica de Clarck e Shepard (1963), que consiste basicamente numa diálise da proteína (aproximadamente 15 mg de proteína/ml de salina) contra uma solução de FITC em tampão carbonato-bicarbonato 0,5 M pH 9,5 por 18 horas a 4°C, a proteína marcada foi dialisada por 3 horas contra PBS e submetida a uma filtração em gel Sephadex G-25, eluindo-se com PBS para a retirada do FITC livre (GORDON et al. 1962). Nesta filtração obtêm-se um primeiro pico na cor amarela – esverdeada intensa, correspondendo à proteína marcada, sucedido de diversos tubos contendo uma

solução incolor e um segundo pico colorido correspondente ao excesso de FITC e seus produtos de hidrólise. A proteína de interesse foi aliquotada e armazenada em freezer a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Zimosan proveniente da parede celular da levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi marcado com FITC segundo a técnica de Nuutila e Lilius (2005). Consiste basicamente na preparação de uma suspensão de zimosan, 20 mg em 15 mL de solução de NaCl 0,15 mol/L, que foi fervida por um período de 30 min. Depois da fervura a suspensão de zimosan foi centrifugada 270 g por 10 min e o sobrenadante desprezado. O precipitado foi ressuspenso em uma solução de FITC (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) em tampão carbonato a  $37^{\circ}\text{C}$  deixando sob agitação por 30 min. Depois deste processo a mistura foi centrifugada e lavada por três vezes contra PBS, e o pellet final ressuspenso neste mesmo tampão. Alíquotas foram acondicionadas em freezer  $-70^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 11** - Fotos ilustrativas dos estímulos marcados com FITC. **A:** Zimosan; **B:** IC-IgG anti ovoalbumina (x100).

### **3.7 - Preparo dos estímulos utilizados para ativar os macrófagos peritoneais de camundongo**

#### **3.7.1 - Preparação dos imunocomplexos de IgG anti E**

Hemácias (E) de carneiro coletadas com anticoagulante Alsever foram centrifugadas e lavadas com Hank's por três vezes, e posteriormente foi realizada uma suspensão de hemácias a 0,4 %. Para a preparação de imunocomplexos (EA) seguiu-se a metodologia descrita por Mantovani (1987). Esta metodologia consiste em realizar uma opsonização de hemácias com IgG (anti hemácias de carneiro) durante 30 min a 37°C. Após esta incubação a amostra foi lavada várias vezes em solução de Hank's e ressuspensa no volume adequado para o experimento.

#### **3.7.2 - Preparação dos imunocomplexos de IgG-anti OVA**

Os imunocomplexos (IC) foram preparados misturando-se o antígeno ovoalbumina (OVA) sobre o anticorpo IgG, nas proporções estabelecidas pela zona de equivalência conforme descrito no item 3.5.3. A mistura antígeno-anticorpo foi incubada por 1h a 37°C e deixados por 24h a 4°C.

Antes dos ensaios, foram realizadas lavagens sucessivas do IC, seguidas de centrifugação a 12.000 g por 15 min à temperatura de 4°C. Os IC foram dissolvidos em 50 µL de NaOH a 0,1 mol/L, para a dosagem através do método do microbiureto (ITZHAKI; GILL, 1964). Este procedimento foi realizado tanto para IgG/OVA não marcada como marcada com FITC.

### **3.7.3 – Preparo das partículas de zimosan**

O preparo do zimosan foi realizado de acordo com método descrito por Cheung et al, (1983). Uma suspensão de zimosan em solução de NaCl 0,15 mol/L foi mantida em fervura por um período de 30 min e em seguida centrifugado 270 g por 10 min a 4°C. O precipitado foi ressuspenso em solução tamponada (Hank's), e ajustada no volume adequado para os experimentos.

Com o zimosan já marcado com FITC foi realizada diluições específicas para obter as concentrações utilizadas nos experimentos.

## **3.8 - Avaliação das funções efectoras dos macrófagos**

### **3.8.1 – Análise do processo de fagocitose por macrófagos peritoneais de camundongos utilizando microscopia óptica e citometria de fluxo**

-Fagocitose de EA (análise por microscopia óptica): Inicialmente os macrófagos foram aderidos em lamínulas de vidro por 15 min e posteriormente lavados para a retirada de células não aderidas. Estas foram incubadas na presença ou ausência da corticosterona por 10 min e depois lavadas, e em seguida foi adicionado o estímulo EA por 30 min a 37°C.

Ensaio preliminares foram realizados para avaliar qual o melhor tempo de incubação das células com ácido araquidônico sem causar modificações em suas funções efectoras. Tempos distintos de 15 min e 45 min foram utilizados para incubar as células com EA na presença de AA. Observou-se que o melhor tempo foi de 45 minutos.

Posteriormente, as células sofreram um choque hipotônico (PBS 1:5) com a finalidade de lisar as hemácias aderidas na superfície dos macrófagos.

Para avaliação da fagocitose por microscopia ótica, as lamínulas feitas em duplicatas foram fixadas com glutaraldeído a 2% em PBS e coradas com giensa. Para quantificação foram selecionados vários campos em cada lamínula até obter 200 células. Os dados foram expressos como porcentagem de fagocitose e número de imunocomplexos fagocitados por macrófagos totais.

- Fagocitose de IgG/OVA e Zimosan marcados com FITC (análise por citometria de fluxo): Os mesmos procedimentos foram realizados para a fagocitose dos ICs feitos de IgG anti OVA e Zimosan, sendo o processo de aderência realizado em placas de 24 poços da BD por um período de 25 min. Posteriormente as células foram incubadas na presença ou ausência da corticosterona (10 min), lavadas e desafiadas com os estímulos (IgG/OVA e zimosan) por 30 min. Para a avaliação no citômetro, adicionamos paraformaldeído a 0,1% e no momento da leitura utilizamos o tripan blue (2,0 mg/mL) para a realização do quenching. Esta técnica de quenching baseia-se na transferência da energia emitida por um composto fluorescente para outros compostos presentes no meio (tripan blue).

As amostras foram analisadas no citômetro BD FACS Canto, software BD FACS Diva. Estabeleceu-se a coleta de 10.000 eventos, sendo considerado cada evento uma célula. A população de macrófagos foi selecionada através de parâmetros de tamanho (FSC) e de granularidade (SSC) (gate). A partir da população selecionada, foi calculada a intensidade de fluorescência (quantidade de partículas fagocitadas), que é expressa pela mediana da intensidade de fluorescência. A porcentagem de fagocitose é expressa pela razão entre o número de células fluorescentes dividido pelo número total de macrófagos multiplicado por 100.

### **3.9 - Ensaio de fagocitose de IgG/OVA na presença das drogas nistatina, clorpromazina e citocalasina B**

Avaliação por citometria de fluxo: Inicialmente os macrófagos foram aderidos em placas de 24 poços por 25 min e posteriormente lavados para a retirada de células não aderidas. Estas foram inicialmente incubadas por 20 min na presença ou ausência (controle) das drogas, clorpromazina (4 µg/mL), nistatina (15 µg/mL) e citocalasina B (10 µmol/L). Posteriormente as células foram desafiadas com IgG/OVA (200 µg/mL) (na presença das drogas) por 30 min. Os procedimentos seguintes foram realizados como descrito anteriormente.

Avaliação por microscopia de fluorescência: Inicialmente os macrófagos foram aderidos em lamínulas de vidro por 20 min e posteriormente lavados para a retirada de células não aderidas. Estas foram inicialmente incubadas por 30 min na presença ou ausência das drogas clorpromazina (4µg/mL), nistatina (15µg/mL) e citocalasina B (10µmol/L) em seguida foi adicionado o estímulo IgG/OVA na presença das drogas (30min). A análise foi realizada por microscopia de fluorescência para verificar a aderência da molécula de IgG/OVA.

### **3.10 - Avaliação da atividade seqüestradora de ROS pelo ácido araquidônico frente ao radical livre DPPH**

A atividade antioxidante do ácido araquidônico frente ao radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) foi avaliada seguindo-se o método descrito por BLOIS (1958) e modificado por RODRIGUES et al. (2002).

A solução de DPPH (100 $\mu$ mol/L), preparada em etanol, foi misturada com solução tampão acetato de sódio (40 mmol/L, pH 5,5). A absorbância inicial em 510 nm foi medida (espectrofotômetro DU-70, Beckman,USA) e posteriormente a substância teste (AA) em diferentes concentrações foi adicionada. Após 5 min de reação em temperatura ambiente (25°C) foi medida a absorbância final. Utilizamos como controle o flavonóide quercetina (10  $\mu$ mol/L) que é um composto padrão seqüestrador de ROS amplamente descrito na literatura. A atividade da substância foi avaliada em dois dias distintos, com medidas em duplicata. Os valores entre parênteses são referentes a concentrações finais (volume de reação 1mL).

A porcentagem de DPPH reduzido foi calculada seguindo a equação:

$$\text{DPPH reduzido (\%)} = \frac{\text{Absorbância}_{\text{INICIAL}} - \text{Absorbância}_{\text{FINAL}}}{\text{Absorbância}_{\text{INICIAL}}} \times 100$$

### 3.11 - Medidas de Quimioluminescência (QL)

É sabido que macrófagos aumentam o seu metabolismo oxidativo durante a fagocitose, e com a finalidade de avaliar esta função, utilizamos a metodologia de quimioluminescência dependente de luminol QLlum e dependente de lucigenina QLluc.

Um indicador sensível desta ativação metabólica é a emissão de luz ou QL (ALLEN, 1986). Para uma amplificação da resposta da medida de QL utilizamos o luminol (5-amino-2,3-hidro-1,4-ftalazinediona) e a lucigenina (nitrato de N-dimetilacridina). O primeiro detecta a produção de diversas espécies reativas de

oxigênio (ROS), e a segunda detecta especificamente a produção de radicais superóxido.

Alíquotas contendo 250  $\mu\text{L}$  de células ( $1,3 \times 10^6$  células/mL) foram pré-incubadas inicialmente por 10 min a  $37^\circ\text{C}$  com corticosterona ( $10^{-5}$  mol/L) em DMSO. Posteriormente adicionaram-se as sondas que amplificam a resposta como lucigenina ( $1,5 \times 10^{-4}$  mol/L) ou luminol ( $2,8 \times 10^{-4}$  mol/L), sendo incubadas em banho a  $37^\circ\text{C}$  por 2-3 min. Para a leitura no aparelho adicionou-se a cada tubo os estímulos IgG/OVA (100  $\mu\text{g/mL}$ ) ou zimosan (1 mg/mL) tendo como volume final de reação 500  $\mu\text{L}$ . Testes foram realizados utilizando os solventes DMSO e etanol na mesma concentração utilizada no preparo das soluções de AA e corticosterona.

Após homogeneização, a QL foi lida no luminômetro (Luminômetro BioOrbit 1251) por 40 min a  $37^\circ\text{C}$ . Para cada tubo de reação a QL foi lida em intervalos regulares ao longo de 40 min e obteve-se uma curva de QL, em cpm (quantidade de fótons produzidos por minuto), contra tempo, em min.

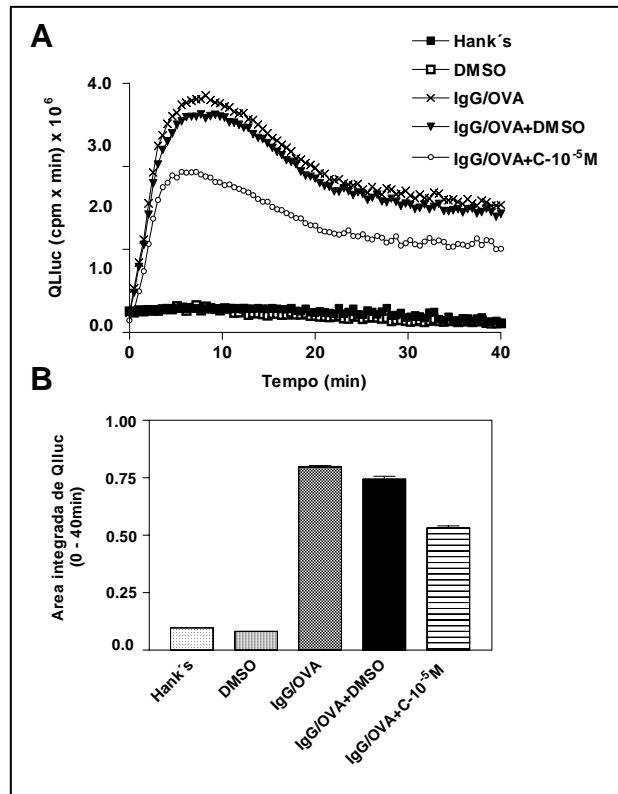
### **3.11.1 – Expressão dos resultados de quimioluminescência**

Para cada tubo de reação realizou-se a leitura de QL, obtendo curvas de QL (cpm) contra tempo (min) semelhante às representadas pela Figura 12 A. As medidas de QLluc e QLlum ao longo do tempo permitem o acompanhamento da cinética da produção de ROS por macrófagos.

Para cada curva de QL determinou-se o valor da área integrada (área sob a curva) de 0 a 40 min (Figura 12 B). No caso do ensaio de QLluc, este valor de área integrada representa a quantidade total de  $\text{O}_2^{\cdot-}$  produzido em 40 min, e, no caso do



ensaio de QLLuc, a quantidade total de ROS produzidas em 40 min (VAN DYKE; CASTRANOVA, 1987).



**Figura 12** - Representação gráfica dos perfis de QLLuc, obtido após estimulação de macrófagos com IgG/OVA. A: Os valores de QLLuc indicam a quantidade de  $O_2^{\cdot-}$  produzido pelos macrófagos estimulados ao longo do tempo, permitindo acompanhar a cinética da reação. B: Valores de área integrada de QLLuc de 0 a 40 min (área sob a curva) dos perfis apresentados em A. Esses valores representam a quantidade total de  $O_2^{\cdot-}$  produzido em 40 min.

### 3.12 - Avaliação da ação do AA na fagocitose de EA e no *burst* oxidativo de macrófagos peritoneais

Nesses ensaios avaliamos se o AA exerce efeitos sobre as funções efetora dos macrófagos estudadas e a capacidade desse mediador em reverter os efeitos inibitórios da corticosterona sobre a fagocitose de EA e QLLuc.

Fagocitose de EA + AA: Ensaio utilizando ácido araquidônico (AA) foram realizados seguindo uma incubação prévia de 15 min em células tratadas ou não com a corticosterona, posteriormente foram lavadas e adicionou-se o estímulo EA juntamente com o AA a 1 $\mu$ mol/L e 7,5nmol/L, por 30 min a 37°C para a realização do processo de fagocitose.

Posteriormente as células sofreram um choque hipotônico (PBS 1:5) com a finalidade de lisar as hemácias aderidas na superfície dos macrófagos.

Para avaliação da fagocitose por microscopia óptica, as lamínulas foram fixadas com glutaraldeído a 2 % em PBS e coradas com GIEMSA. Para quantificação foram selecionados vários campos nas lamínulas ate obter 200 células.

Burst oxidativo de IgG/OVA e zimosan: Nos ensaios de QLuc as células (1,3 x 10<sup>6</sup> células/mL) foram tratadas com corticosterona por 10 min a 37°C e posteriormente adicionou-se ácido araquidônico (1 $\mu$ mol/L e 7,5nmol/L de AA) por 5 min. Em seguida os tubos foram colocados no aparelho e adicionados estímulos específicos (IgG/OVA e Zimosan) na presença do AA. A leitura da QL produzida pelas células estimuladas foi realizada no Luminômetro BioOrbit 1251, durante 40 min a 37°C, e registrada em cpm (contagem de fótons por minuto) como descrito anteriormente.

Os dados obtidos tanto na fagocitose como no *burst* oxidativo foram avaliados como descrito anteriormente.

### **3.13 - Ensaio de viabilidade das células**

Para avaliação da viabilidade celular utilizou-se o ensaio de exclusão ao corante tripan blue. Este método baseia-se no fato das células serem impermeáveis

ao corante sendo tempo dependente, e quando ocorre alguma alteração na membrana plasmática elas incorporam este corante se tornando azuis enquanto que as células viáveis permanecem incolores.

As células foram aderidas em lamínulas (300ul) por 15 min e posteriormente incubadas com tempos específicos com as substâncias (AA, nistatina, clorpromazina, CB, DMSO, CORT) a serem avaliadas pela sua toxicidade. Posteriormente na presença do corante tripan blue (0,1%) estas lamínulas foram analisadas e a proporção de células viáveis foi estimada pela contagem de 200 células em microscópio ótico.

### **3.14 – Avaliação da atividade da fosfolipase A<sub>2</sub>**

A fosfolipase A<sub>2</sub> secretada humana do grupo IIA (hsPLA<sub>2</sub> gIIA) heteróloga foi gentilmente cedida pela Dra. Elisângela Aparecida Aragão do laboratório do Prof. Dr. Richard John Ward da Faculdade de Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Departamento de Química.

#### **3.14.1 - Preparação dos lipossomos**

Os lipossomos foram obtidos por evaporação de fase reversa, seguindo metodologia de Szoka; Papahadjopoulos (1978). Essa técnica consiste em produzir uma membrana (bicamada fosfolipídica) artificial com composição lipídica distinta podendo assim variar o tipo dos fosfolipídios utilizados e a proporção das cargas dos mesmos. Utilizaram-se frações molares de lipídios DOPC – dioleilfosfatidilcolina (DOPC – PM: 786,1 Sigma) /DOPG – dioleilfosfatidilglicerol (DOPG – PM: 797

Sigma) (90% de DOPC / 10% DOPG) dissolvidas em éter (2ml) e submetidas à secagem por evaporação. Em seguida foram adicionados ao filme lipídico 1mL de éter e 1mL de tampão Hepes (Hepes 20mmol/L + NaCl 150mmol/L; pH 7,0). Posteriormente sonicou-se (Sonicator XL-Misonix) no gelo por 2 min (com potência mínima) para formar uma emulsão de fase reversa. Após este procedimento as micelas foram induzidas a uma evaporação lenta do éter (evaporador rotativo Tecnal), resultando no “reverso” de fase.

A mistura foi então incubada em banho a 45°C por 1h produzindo lipossomos unilamelares. Para obter uma amostra homogênea de lipossomos com diâmetros definidos realizou-se a filtração dos lipossomos em membrana de policarbonato (400nm) obtendo lipossomos unilamelares de diâmetro 400 nm.

### **3.14.2 - Dosagem de fosfato dos fosfolipídios**

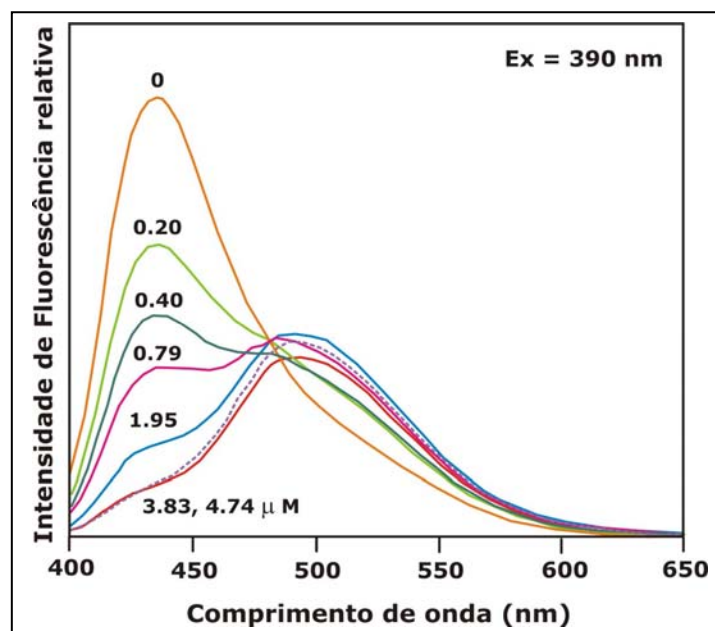
A dosagem de fosfato seguiu a metodologia de Barlett (1959), que permite a avaliação na faixa de 0,1 a 10  $\mu\text{g. mL}^{-1}$  de  $\text{PO}_4^{2-}$ . Amostras de lipossomos (10, 20, 30  $\mu\text{L}$ ) foram fervidas a 100°C em Ácido Perclórico 70% por 5 min. Após o resfriamento, foram adicionados 4,2mL de água deionizada, 200  $\mu\text{L}$  de molibdato de amônio (Sigma) 1% em Bissulfito de sódio 20 % (Sigma). A solução foi agitada e deixada em banho de água fervente por 7 min. Leu-se a absorbância em 830nm em cubeta de quartzo de 1 cm de caminho óptico em espectrofotômetro Hitach U-2000. A curva padrão de fosfato foi feita com amostra contendo 0, 2, 4, 6, 8 e 10  $\mu\text{g}$  de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Solução estoque de 10 mg/mL).

### 3.14.3 - Teste de atividade enzimática através de indicador de ácido graxo livre (ADIFAB)

ADIFAB (proteína de ligação de ácido graxo intestinal marcada com acrilodan) é um indicador fluorescente para a medida da concentração de ácidos graxos livres. Como já sugerido pelo nome, o indicador é um conjugado composto por uma sonda fluorescente sensível a polaridade (acrilodan) e pela proteína de ligação de ácido graxo intestinal (I-FABP), uma proteína de baixo peso molecular (15 kDa) com alta afinidade para ácidos graxos (RICHIERI et al. 1992 e 1999). A detecção de ácido graxo pelo ADIFAB é baseada na mudança de posição do fluoróforo acrilodan em relação à bolsa de ligação apolar da proteína I-FABP quando ela torna-se ocupada pelo ácido graxo. A figura 13 ilustra um exemplo da mudança para a região do vermelho do espectro de ADIFAB causada pela titulação com ácido oléico. Quanto maior a concentração de ácido graxo livres, menor a intensidade de fluorescência em 425 nm e maior em 505 nm, devido a um deslocamento do espectro para maiores comprimentos de onda. A mudança espectral do ADIFAB permite a determinação da concentração de ácidos graxos através da razão da intensidade de fluorescência do indicador ligado e desligado medido em 505 e 425 nm, respectivamente.

A solução estoque de ADIFAB foi preparada pela dissolução de uma unidade de 200 ug de ADIFAB (Sigma) em 1 mL de tampão 50 mmol/L de Tris, 1mmol/L de EGTA, 0,05 % de azida sódica, pH 8,0 (solução estoque de 13umol/L). Para o ensaio de volume final de 1 mL foram utilizados 15uL de ADIFAB (estoque 200ug. mL<sup>-1</sup>), 6 uL de vesículas unilamelares grandes de DOPG – dioleilfosfatidilglicerol e DOPC – dioleilfosfatidilcolina na proporção de 1:200 de fosfolípidios, 1 uL de CaCl<sub>2</sub>

(apenas nos ensaios com  $\text{Ca}^{2+}$ ), proteína (hsPLA<sub>2</sub> gIIA) e tampão Hepes 20 mmol/L, NaCl 20 mmol/L, pH 7,0 para completar o volume. Os resultados foram obtidos em espectrofluorímetro Spectronic SLM 8100C a 25°C, utilizando a cubeta de quartzo de caminho óptico de 1 cm sob agitação. O aparelho foi programado para medir a razão entre intensidade de fluorescência em 505 e 425 nm com excitação de ADIFAB em 385nm. A amostra contendo tampão, ADIFAB, vesículas lipídicas e  $\text{Ca}^{2+}$  foram pré – incubadas por 15 min e em seguida, a razão entre as intensidades de fluorescência em 505 e 425 nm foi monitorada por 2400 segundos. Após 800 segundos de ensaio, foram adicionados 100 ng. mL<sup>-1</sup> da hsPLA<sub>2</sub>gIIA na presença de 1 mmol/L de  $\text{CaCl}_2$ , 1 mmol/L de EGTA e/ou  $0,86 \times 10^{-6}$  mol/L de corticosterona.



**Figura 13** - Titulação monitorada por fluorescência do ADIFAB com ácido oléico a 25°C. A concentração de indicador é 0,2 μmol/L em 10 mmol/L Tris-Cl, 0,15 M NaCl, 1 mmol/L de EGTA, pH 8,0. O espectro representante da maior concentração de ácido oléico titulada está representado por uma linha pontilhada.

### **3.15 - Tratamento dos dados: Análises estatísticas**

Os dados obtidos experimentalmente foram analisados empregando-se o software GraphPad Prism versão 3.0 para Windows. Os resultados foram expressos como média +/- erro padrão da média e comparados pela análise de variância empregando ANOVA seguida do teste de Dunnet, para mais de duas amostras.

Para duas amostras utilizamos o teste t pareado. Foram considerados estatisticamente significantes os resultados que forneceram valores com  $p < 0,05$ .

*Resultados*



## 4 – RESULTADOS

---

### 4.1 – Efeito da corticosterona sobre o processo de fagocitose pelos macrófagos peritoneais de camundongos

Avaliamos o efeito deste hormônio num breve período de tempo (10 min) sobre a fagocitose mediada por: - receptores  $Fc\gamma$ , utilizando hemácias opsonizadas com anticorpo IgG e imunocomplexos precipitados de IgG/OVA; - Os receptores de manose e fucose foram avaliados utilizando-se partículas de zimosan.

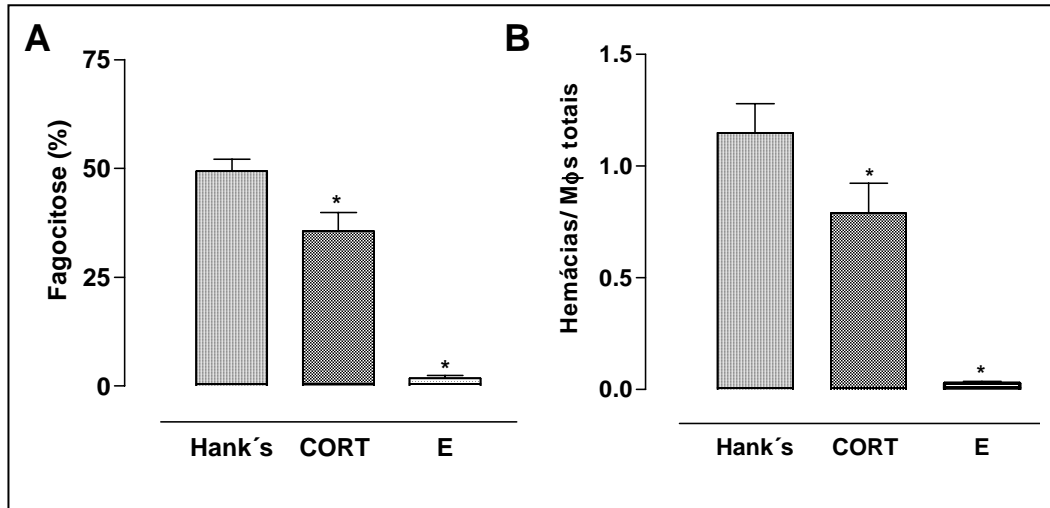
A escolha desses estímulos deve-se aos seguintes fatores: EA – modelo de fagocitose imunológica; imunocomplexo de IgG/OVA - com relação às doenças que tem a participação principal de imunocomplexos; e as partículas de zimosan – modelo extensivamente usado para estudar resposta imune causada por infecções de fungos.

#### 4.1.1 – Fagocitose de Imunocomplexo de hemácias opsonizadas com imunoglobulina G (EA)

Macrófagos peritoneais residentes (100  $\mu$ l) aderidos em lamínulas de vidro foram incubados por 10 minutos na presença ou ausência da corticosterona ( $1.10^{-5}$  mol/L) com imunocomplexo EA, e a fagocitose foi quantificada por microscopia ótica. Os dados obtidos foram expressos como porcentagem de fagocitose e número de imunocomplexos (EA) fagocitados por macrófagos totais.

Observou-se que ocorreu inibição da fagocitose de EA na presença da corticosterona (Figura 14 A e B) tanto na porcentagem de fagocitose quanto no número de hemácias por macrófagos totais. Controles utilizando DMSO (0,01%)

foram realizados e verificou-se que não interferiu com o processo de fagocitose quando comparados com o controle (Hank's). A viabilidade das células tratadas ou não com CORT permaneceu na faixa de 95%.



**Figura 14** - Ação da corticosterona (CORT) sobre a fagocitose de EA (Hemácias opsonizadas com IgG) por macrófagos peritoneais de camundongos. **A**: Porcentagem de fagocitose; **B**: número de hemácias opsonizadas ou não com IgG por macrófagos totais. Macrófagos aderidos em lamínulas foram pré-incubados por 10 min a 37°C com corticosterona (CORT) ( $10^{-5}$  mol/L), e em seguida realizou-se o ensaio de fagocitose de EA. Os dados foram analisados pelo One-Way ANOVA seguido do teste de Dunnett e estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média  $n = 9$ , \* diferença significativa em relação ao controle (Hank's). E: Hemácias. ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.2 – Fagocitose de Imunocomplexo de imunoglobulina G (IgG) anti ovoalbumina (IC-IgG/OVA)

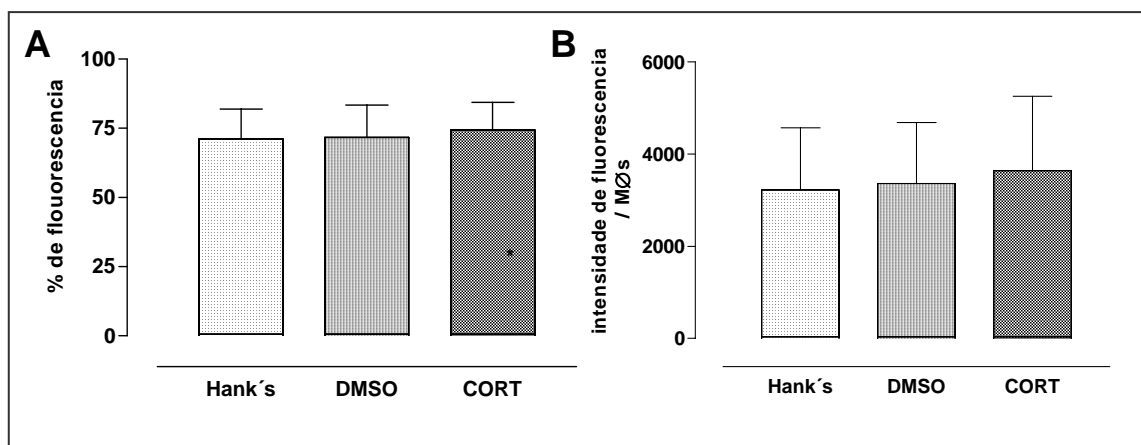
Um outro estímulo utilizado que avalia a ativação dos receptores Fc $\gamma$  foi imunocomplexo de IgG/OVA sendo esses resultados quantificados por citometria de fluxo. Nesses experimentos células tratadas ou não com CORT foram incubadas com imunocomplexos marcados com FITC durante 30 minutos a 37°C, e a porcentagem e a intensidade de fagocitose foram analisadas por citometria de fluxo.

Verificou-se que a inibição da fagocitose de EA pela corticosterona não seguiu o mesmo padrão com o estímulo IgG/OVA (200 µg/mL). O solvente DMSO (0,01%) não interferiu no processo de fagocitose.

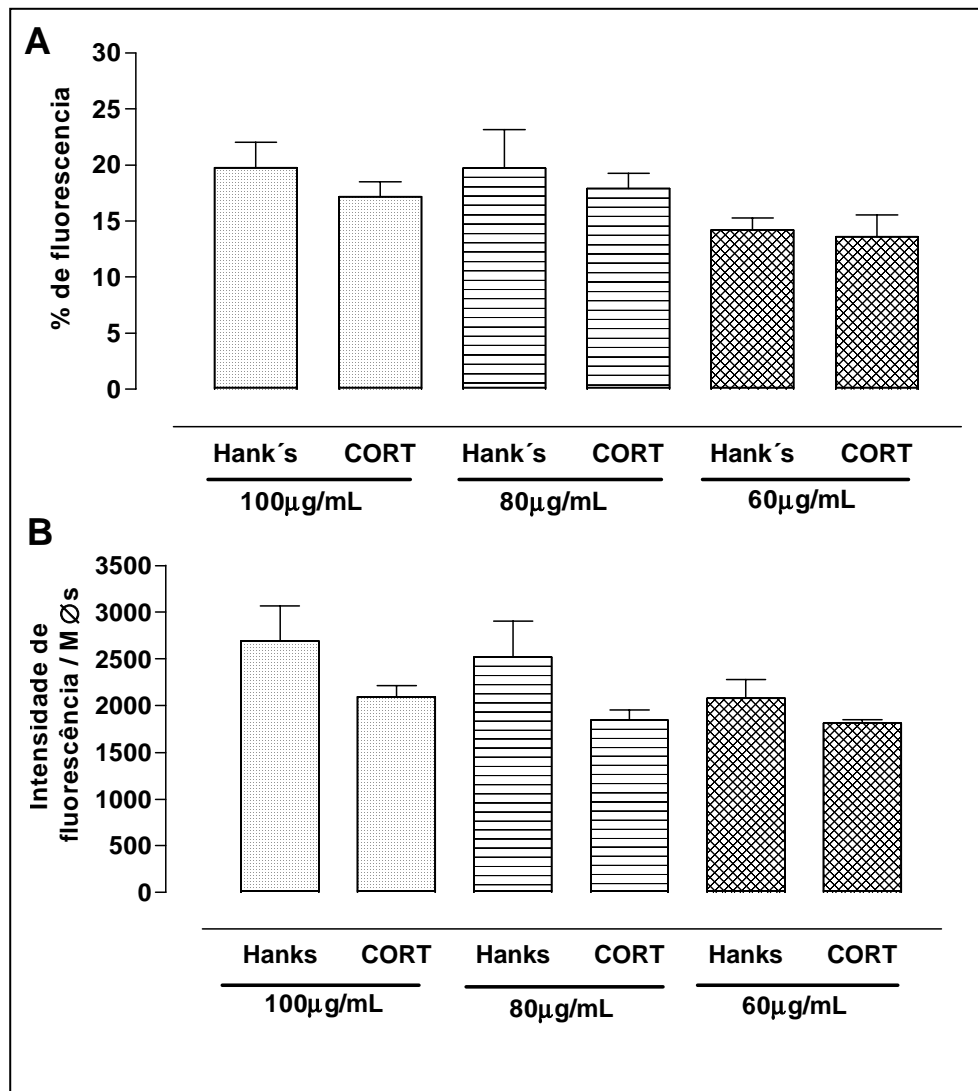
Sugere-se que o processo de interiorização de IgG/OVA é distinto do processo de interiorização de EA, mostrando que a inibição da interiorização pela corticosterona é dependente do tipo de partícula que interage com a célula (Figura 15 A e B).

Com a finalidade de verificar se a concentração de imunocomplexo (IgG/OVA) poderia estar interferindo no processo de inibição, avaliou-se diferentes concentrações do estímulo (100 µg/mL; 80 µg/mL; 60 µg/mL) frente à corticosterona, dentro das mesmas condições de trabalho.

Observou-se que entre o controle de cada concentração analisada (100 µg/mL; 80 µg/mL; 60 µg/mL) com seu respectivo teste (células tratadas com a corticosterona) não houve diferenças significativas na porcentagem de fluorescência. Em relação a intensidade de fluorescência houve uma aparente inibição mas que na análise estatística não foi significativa (Figura 16 A e B).



**Figura 15** - Ação da corticosterona (CORT) sobre a fagocitose de IC-IgG anti OVA (200µg/mL) (imunocomplexo de IgG anti OVA) por macrófagos peritoneais de camundongos. **A:** Porcentagem de fagocitose, **B:** intensidade de fluorescência (quantidade de partículas fagocitadas). Macrófagos aderidos em placas foram tratados inicialmente por 10 min a 37°C com corticosterona ( $10^{-5}$  mol/L), e em seguida realizado o ensaio de fagocitose por 30 min a 37°C. Os dados foram analisados pelo One-Way ANOVA seguido do teste de Dunnett e estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média n = 4.



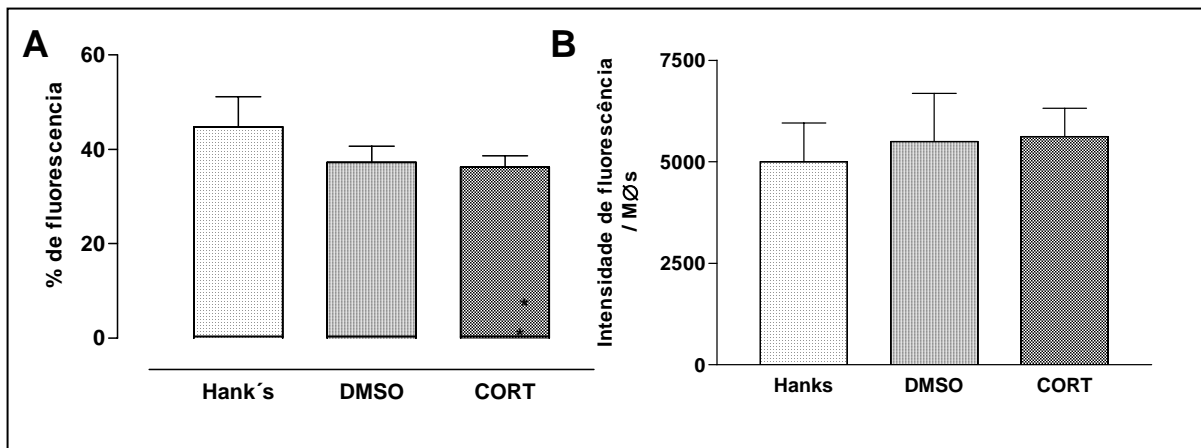
**Figura 16** - Ação da corticosterona (CORT) sobre a fagocitose de diferentes concentrações de IgG/OVA (imunocomplexo de IgG anti-OVA) por macrófagos peritoneais de camundongos. **A:** Porcentagem de fagocitose, **B:** intensidade de fluorescência (quantidade de partículas fagocitadas). Macrófagos aderidos em placas foram tratados inicialmente por 10 min a 37°C com corticosterona ( $10^{-5}$  mol/L), e em seguida realizado o ensaio de fagocitose por 30 min a 37°C. Os dados foram analisados pelo teste t e estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média,  $n = 4$ , ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.3 – Fagocitose de partículas de Zimosan

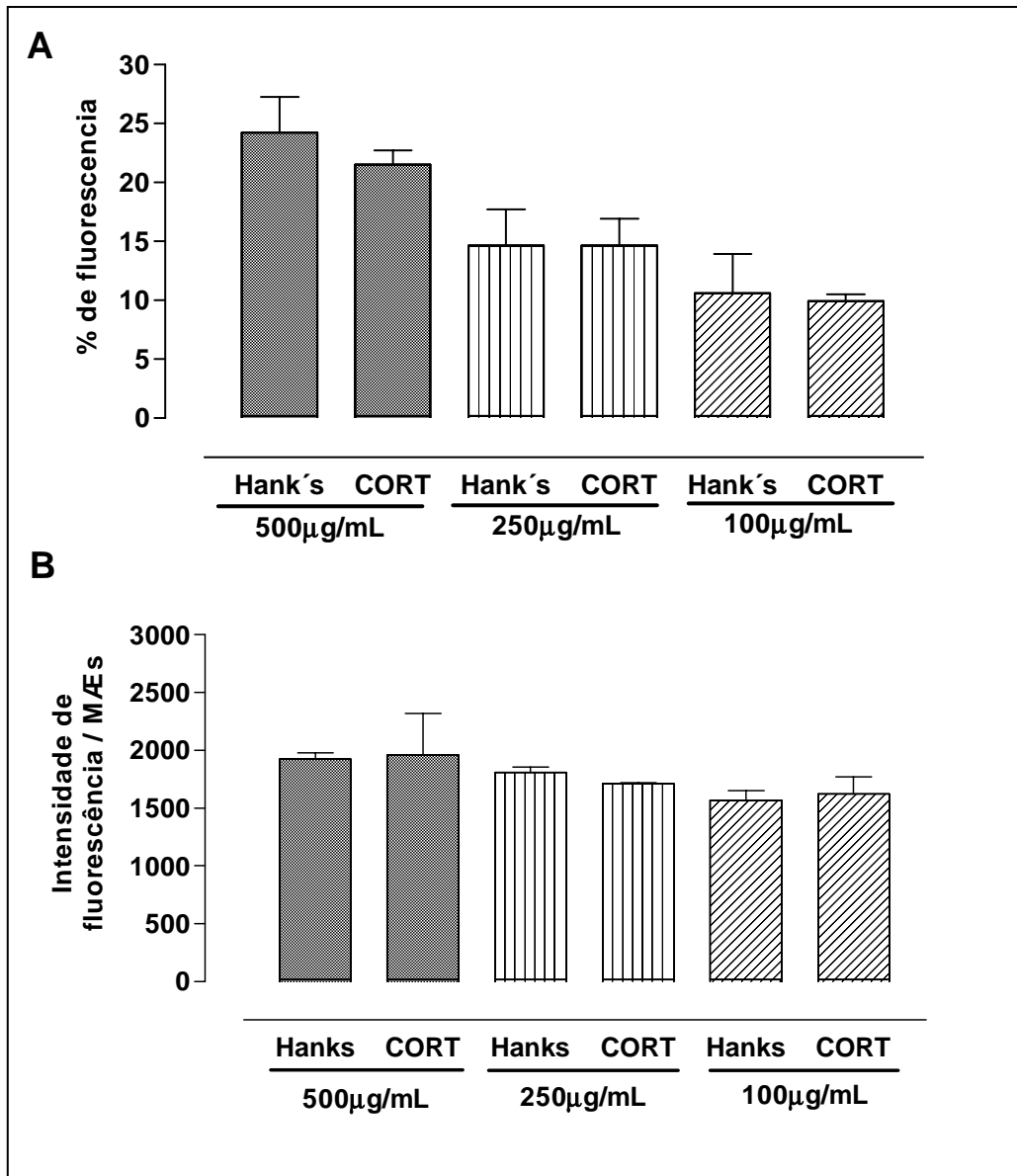
Outro estímulo utilizado para a avaliação da fagocitose por citometria de fluxo foram partículas de zimosan. Neste processo de fagocitose os receptores envolvidos são os de manose/fucose. Verificou-se que não ocorreu o processo de inibição da

fagocitose de zimosan (1 mg/mL) na presença da corticosterona por 10 min (figura 17 A e B), tanto na porcentagem quanto na intensidade de fagocitose. O controle com DMSO não interferiu com o processo de fagocitose como pode ser verificado.

Para verificar se a corticosterona exerce um efeito inibitório dependente da concentração do estímulo, avaliou-se dentro das mesmas condições de trabalho, diferentes concentrações de zimosan (500 µg/mL; 250 µg/mL; 100 µg/mL). Observamos que entre o controle de cada concentração analisada com seu respectivo teste (células tratadas com a corticosterona) a fagocitose de zimosan não se alterou (Figura 18 A e B).



**Figura 17** - Ação da corticosterona (CORT) sobre a fagocitose de Zimosan (1mg/mL) por macrófagos peritoneais de camundongos. **A**: Porcentagem de fagocitose, **B**: intensidade de fluorescência (quantidade de partículas fagocitadas). Os macrófagos foram tratados inicialmente por 10 min com corticosterona ( $10^{-5}$  mol/L), e em seguida realizado o processo de fagocitose de por 37°C por 30 min. Os dados foram analisados pelo One-Way ANOVA seguido do teste de Dunnett e estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média  $n = 4$ .



**Figura 18** - Ação da corticosterona (CORT) sobre a fagocitose de zimosan em diferentes concentrações por macrófagos peritoneais de camundongos. **A:** Porcentagem de fagocitose, **B:** intensidade de fluorescência (quantidade de partículas fagocitadas). Os macrófagos foram tratados inicialmente por 10 min com corticosterona ( $10^{-5}$  mol/L), e em seguida exposto ao estímulo fagocítico por 30 min a  $37^{\circ}\text{C}$ . Os dados foram analisados pelo teste t e estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média,  $n = 4$ .

#### **4.2 – Efeito da nistatina, clorpromazina e citocalasina B no mecanismo de interiorização de imunocomplexo IgG (IgG/OVA)**

Como verificamos que a corticosterona não inibe a interiorização de IgG/OVA, como acontece na fagocitose de partícula revestida de IgG (EA), julgamos de interesse verificar possíveis diferenças nos mecanismos de interiorização desses diferentes tipos de imunocomplexos.

Nestes experimentos avaliamos se o processo de interiorização era mediado por cavéolas, como ocorre com a interiorização de pequenas vesículas (50-60 nm de diâmetro) como vírus, proteínas como albumina (CONNER; SCHMID, 2003), ou dependente de clatrina como se verifica com partículas de zimosan (ELFERINK, 1978), ou se requeria a participação dos microfilamentos de actina como ocorre na fagocitose de EA.

Para isso utilizou-se como inibidor de cavéolas a nistatina, a clorpromazina como inibidor de clatrininas e citocalasina B inibidor de filamentos de actina.

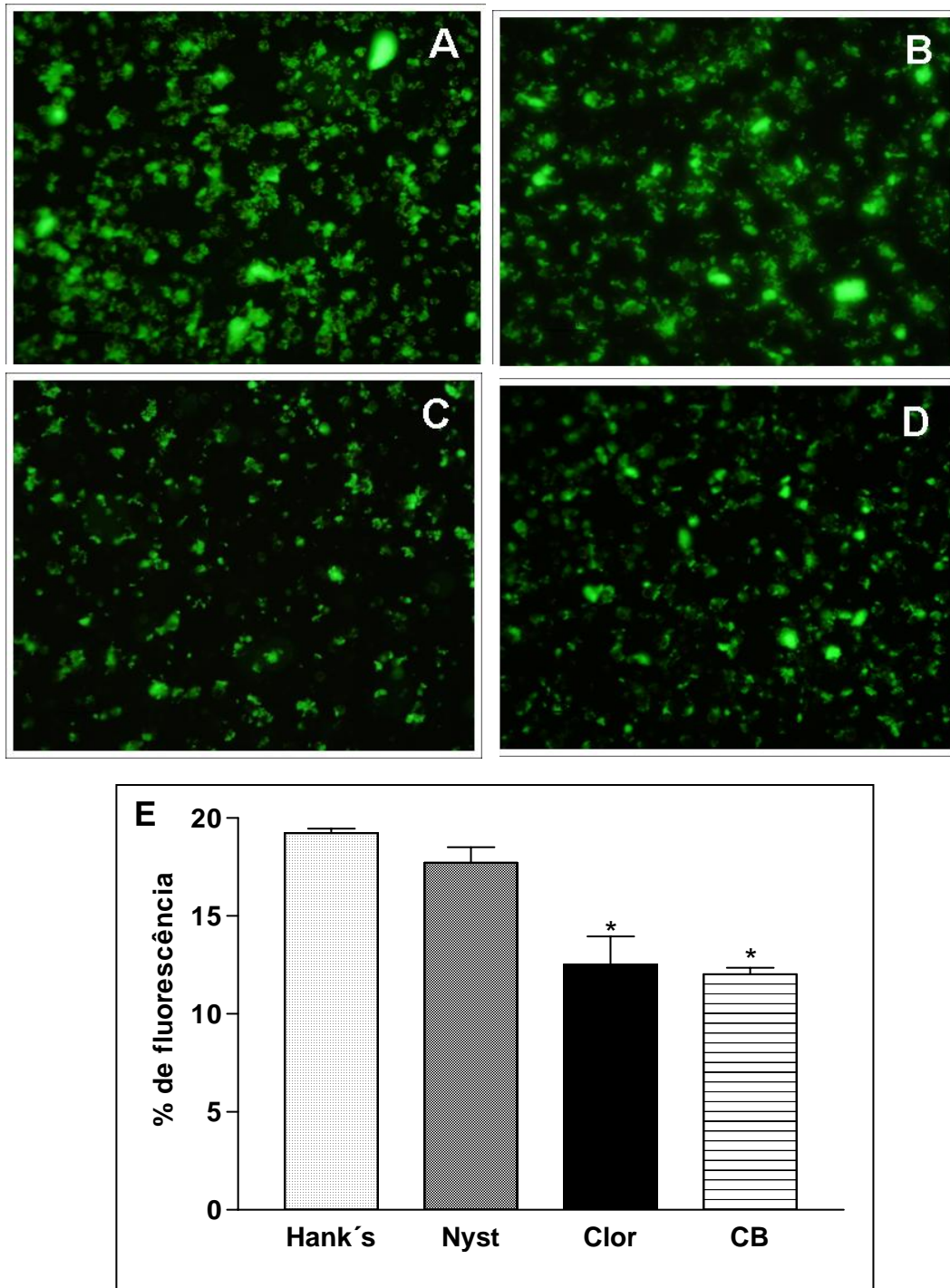
Na figura 19A avaliamos o processo de aderência do imunocomplexo (IgG/OVA) em macrófagos aderidos em lamínulas de vidro por microscopia de fluorescência. Na figura 19B observa-se que o processo de aderência do imunocomplexo (IgG/OVA) nos macrófagos tratados com nistatina não foi alterado em relação ao controle (Figura 19A). Em contraste, os macrófagos tratados com a clorpromazina e citocalasina B sofreram diminuição significativa na aderência de IgG/OVA (Figura 19 C e D respectivamente).

Na figura 19 E avaliou-se por citometria de fluxo a capacidade fagocítica dos macrófagos tratados com as respectivas drogas. Observa-se que houve uma inibição no processo de fagocitose pela citocalasina B e clorpromazina, quando

comparado com o controle, sugerindo que possivelmente o processo de interiorização mediado por filamentos de actina e clatrina esteja envolvido neste processo de interiorização de imunocomplexo de IgG/OVA.

A viabilidade celular foi avaliada com o ensaio de exclusão ao corante tripan blue, verificando-se porcentagem de células viáveis na faixa de 85 a 90%.





**Figura 19** - Efeito da nistatina (Nyst), clorpromazina (Clor) e citocalasina B (CB) no processo de aderência e interiorização de IgG/OVA (200ug/mL) por macrófagos peritoneais de camundongos utilizando microscopia de fluorescência (A, B, C, D) e citometria de fluxo (E). **A:** Macrófagos incubados com IC-IgG/OVA indicando a aderência deste imunocomplexo; **B:** Macrófagos na presença de IC-IgG/OVA e Nistatina (15µg/mL); **C:** Macrófagos na presença de IgG/OVA e clorpromazina (4µg/mL)  $p < 0.01$ ; **D:** Macrófagos na presença de IC-IgG/OVA e CB (10µmol/L)  $p < 0.001$ . **E:** Porcentagem de fagocitose. Os dados foram analisados pelo One-Way ANOVA seguido do teste de Dunnett e estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média  $n = 4$ . \* diferença significativa em relação ao controle (Hank's) ( $p < 0,05$ ).

### 4.3 – Efeito da corticosterona sobre o processo da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) por macrófagos peritoneais de camundongos (MPC)

Outra função efetora dos macrófagos associada à ocupação receptores Fcγ e a produção do *burst* oxidativo pela ativação da NADPH oxidase. Assim sendo, avaliamos os efeitos da corticosterona sobre o *burst* oxidativo dos macrófagos. Destaca-se que a produção das espécies reativas de oxigênio (ROS) é essencial para a morte intracelular de agentes patogênicos em um processo inflamatório.

#### 4.3.1 – Quantificação e análise da população celular do exsudato peritoneal total dos camundongos

Sabe-se que na cavidade peritoneal de camundongos normais sem receber estímulos inflamatórios existem vários tipos de células e devido a isso avaliamos a porcentagem de macrófagos presentes nesse exsudato. Nessa cavidade injetou-se 3 a 5 mL de solução de Hank's gelado pH 7,4 para a coleta do lavado peritoneal.

Nos ensaios de quimioluminescência realizou-se para cada experimento uma mistura de células de 8 animais, onde quantificou-se posteriormente a população celular através de lâminas coradas com corante panótico. Verificou-se uma predominância de macrófagos/monócitos no exsudato peritoneal (Tabela 1).

Tabela 1: Quantificação das células presentes no exsudato peritoneal de camundongos normais (experimentos independentes = 10).

Tipos celulares	Porcentagem
Macrófagos / Monócitos	93
Linfócitos	4
Neutrófilos	2
Eosinófilos	1

#### **4.3.2 – Efeito *in vitro* da corticosterona no *burst* oxidativo dos macrófagos avaliado pelo método de quimioluminescência dependente de luminol e lucigenina**

Nesta etapa utilizamos o método de quimioluminescência dependente de luminol (QLlum) e lucigenina (QLluc) por um período de 40 min de leitura.

A quimioluminescência dependente de lucigenina (QLluc) detecta principalmente o ânion superóxido ( $O_2^-$ ) liberado no meio extracelular, e empregando o luminol (QLlum) detecta-se a somatória das espécies reativas de oxigênio produzidas pelos fagócitos em um determinado intervalo de tempo (VAN DYKE & CASTRANOVA, 1987).

As concentrações das sondas luminol e lucigenina foram determinadas por uma curva dose resposta ( $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  mol/L), e verificou-se que a melhor concentração no ensaio foi  $1,5 \times 10^{-4}$  mol/L para lucigenina e  $2,8 \times 10^{-4}$  mol/L para luminol (BREHM et al. 1996; CHADFIED; OLSEN, 2001).

Para uma avaliação preliminar, foram realizados controles utilizando células na presença de hank's, dimetilsulfóxido (DMSO = 0,01%) e corticosterona  $10^{-5}$  mol/L, na ausência de estímulos. Esses ensaios prévios tiveram o propósito de verificar se essas substâncias poderiam interferir na produção das espécies reativas de oxigênios por QLluc e QLlum.

Pode-se observar que as células, na presença de DMSO e corticosterona, não apresentaram diferenças significativas na produção de espécies reativas quando comparado ao controle (Hank's) para QLlum e QLluc. Da mesma forma, imunocomplexo e zimosan, contendo ou não DMSO, não induziram diferença significativa na QL (Figura 20 A e B; Figura 21 A e B).

Numa segunda etapa avaliamos se a corticosterona ( $10^{-5}$  mol/L) é capaz de interferir com a produção de ROS decorrente da interação dos macrófagos peritoneais de camundongo com os vários estímulos estudado neste trabalho.

As células foram incubadas inicialmente com corticosterona por 10 min e posteriormente foi realizado o ensaio para quantificar a produção de espécies reativas de oxigênio por um período de 40 min. Os estímulos utilizados foram específicos: IgG/OVA – 100  $\mu$ g/mL e zimosan – 1 mg/mL.

Nos ensaios utilizando lucigenina observou-se uma inibição significativa na produção de ânion superóxido para IgG/OVA ( $p < 0.05$ ) e zimosan ( $p < 0.001$ ) pela CORT (período de leitura 40 min) (Figura 22A e 23A); porém nos ensaios com luminol, que avalia a formação de todas as espécies reativas, a CORT não inibiu essa produção (Figura 22B e 23B).

Para uma avaliação das células tratadas com a corticosterona ( $10^{-5}$  mol/L) por 10 min e depois lavadas realizou-se a QLLuc na ausência da corticosterona. Verificou-se que não ocorreu essa inibição da produção de ânion superóxido. Dados estão expressos como área sob a curva, células estimuladas com IgG/OVA: Controle =  $1,5 \pm 0,13 \times 10^8$ , tratadas com a CORT =  $1,4 \pm 0,11 \times 10^8$ ; células estimuladas com zimosan: Controle =  $2,1 \pm 0,26 \times 10^8$ ; tratadas com a CORT =  $2,1 \pm 0,17 \times 10^8$ .

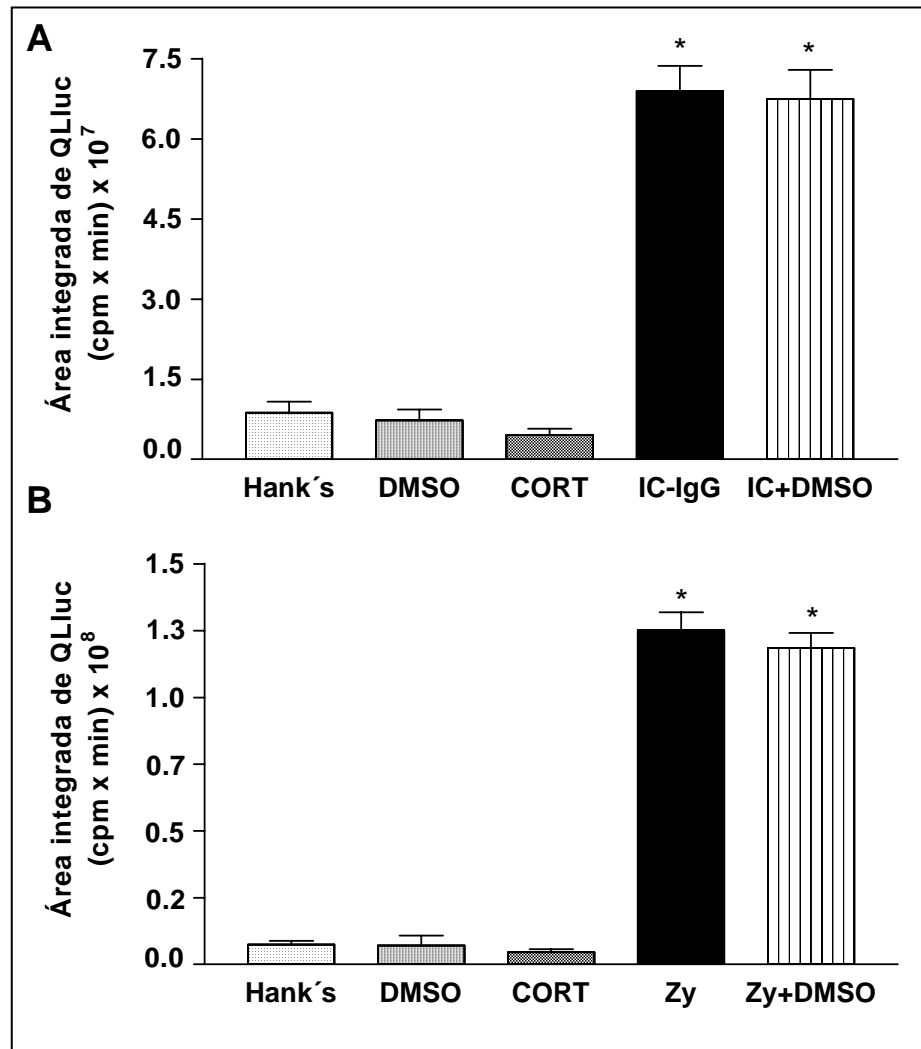
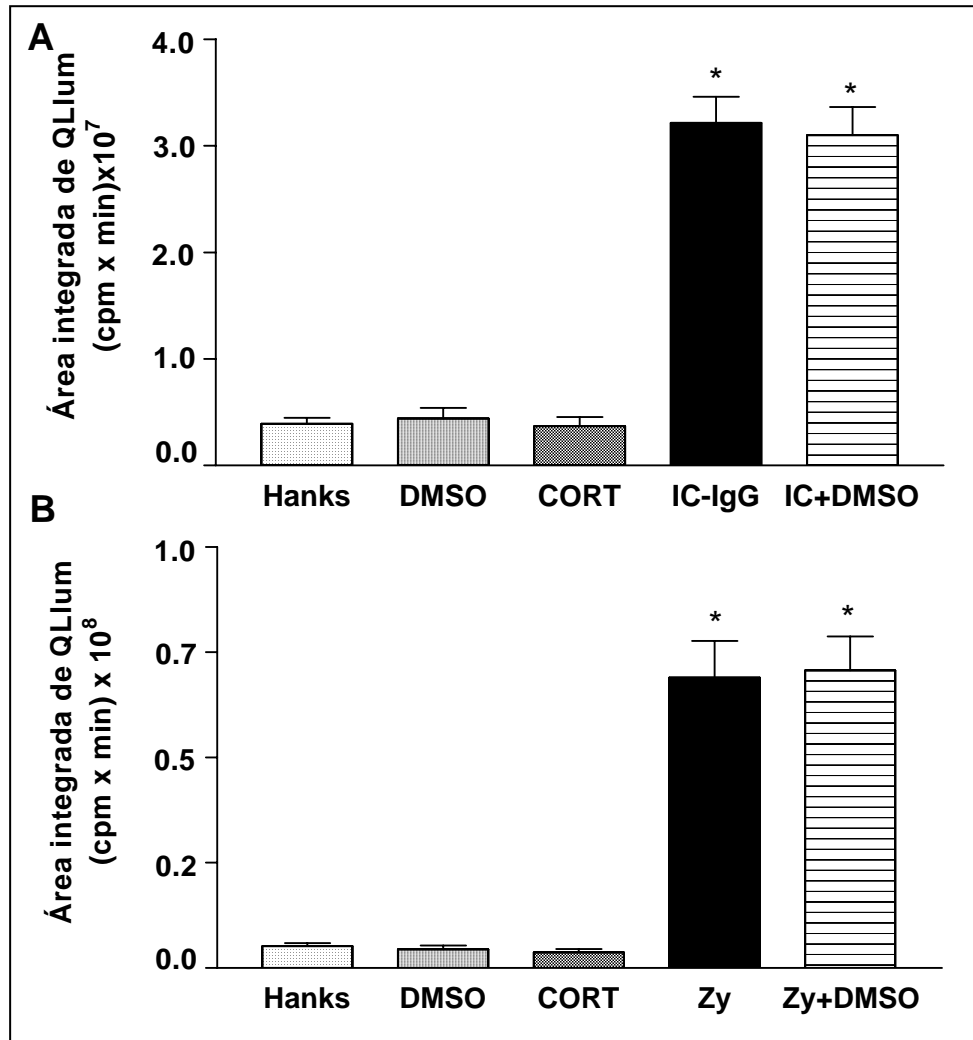
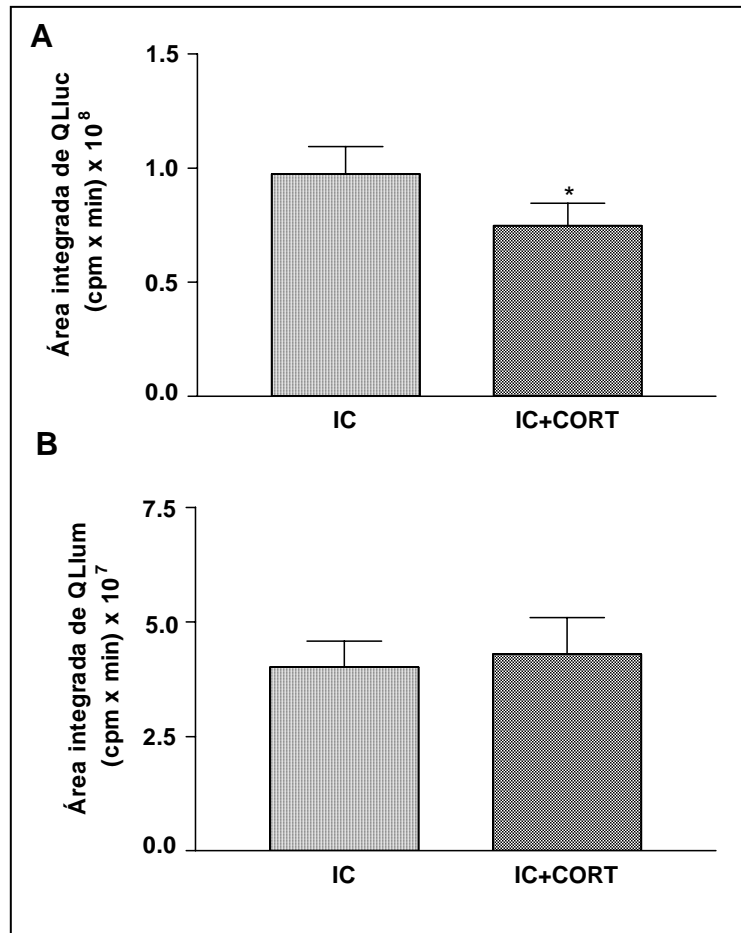


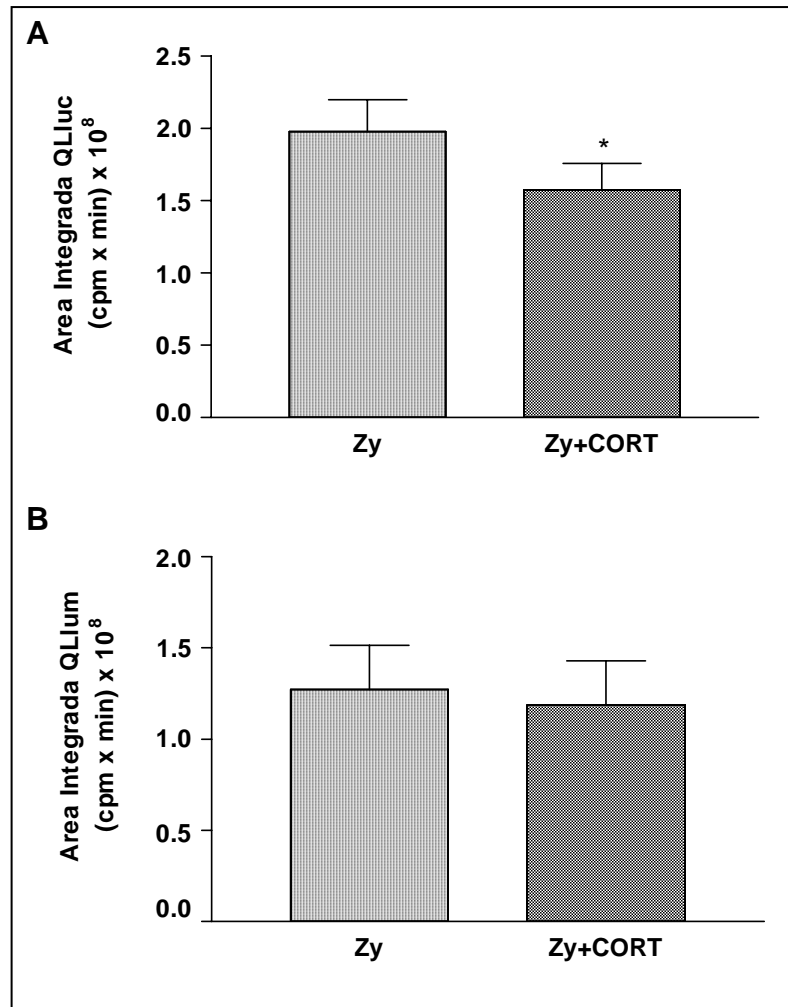
Figura 20 – Medida da produção de ROS por macrófagos peritoneais de camundongo estimulados com IgG/OVA (100ug/mL) e Zimosan (1mg/mL) empregando-se ensaio de QLluc. **A:** Macrófagos estimulados com IC-IgG/OVA (imunocomplexo de IgG anti ovoalbumina), controles realizados na presença de Hank's, DMSO, CORT  $10^{-5}$ mol/L; **B:** Macrófagos estimulados com Zimosan, controles realizados na presença de Hank's, DMSO, CORT a  $10^{-5}$  mol/L. Hank's: Solução tamponada: controle das células não estimuladas. CORT: Corticosterona a  $10^{-5}$  mol/L. QLluc: quimiluminescência dependente de lucigenina. Os dados foram analisados pelo One-Way ANOVA seguido do teste de Dunnett e estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, n= 6-8. (\*) diferença significativa em relação aos controles (Hank's) ( $p < 0,05$ ).



**Figura 21** - Medida da produção de ROS por macrófagos peritoneais de camundongo estimulados com IgG/OVA (100ug/mL) e Zimosan (1mg/mL) empregando-se ensaio de QLLum. **A:** Macrófagos estimulados com IC-IgG/OVA imunocomplexo de IgG anti ovoalbumina, controles realizados na presença de Hank's, DMSO, CORT  $10^{-5}$  mol/L; **B:** Macrófagos estimulados com Zimosan, controles realizados na presença de Hank's, DMSO, CORT a  $10^{-5}$  mol/L. Hank's: Solução tamponada: controle das células não estimuladas. CORT: Corticosterona a  $10^{-5}$  mol/L. QLLum: quimiluminescência dependente de luminol. Os dados foram analisados pelo One-Way ANOVA seguido do teste de Dunnett e estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, n= 6-8. (\*) diferença significativa em relação aos controles (Hank's) ( $p < 0,05$ ).



**Figura 22** - Efeito da corticosterona na QLluc e QLlum produzida por macrófagos peritoneais de camundongo estimulados com IgG/OVA (100ug/mL). **A:** Medidas de QL-luc; **B:** Medidas de QL-lum. Macrófagos pré-tratados com corticosterona  $10^{-5}$  mol/L por 10 min e posteriormente estimulados com IC-IgG/OVA imunocomplexo de IgG anti ovoalbumina na presença e ausência da corticosterona por um período de 40 min que foi o tempo de leitura no aparelho. Os dados foram analisados pelo teste t e estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, n= 6-8. (\*) diferença significativa ( $p < 0,05$ ).



**Figura 23** - Efeito da corticosterona na QLluc e QLlum produzida por macrófagos peritoneais de camundongo estimulados com Zimosan (1 mg/mL). **A**: Medidas de QL-luc; **B**: Medidas de QL-lum. Macrófagos pré-tratados com corticosterona  $10^{-5}$  mol/L por 10 min e posteriormente estimulados com zimosan na presença e ausência da corticosterona por um período de 40 min que foi o tempo de leitura no aparelho. Os dados foram analisados pelo teste t e estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, n= 6-8. (\*) diferença significativa ( $p < 0,05$ ).



#### **4.4 - Efeito do ácido araquidônico no processo de fagocitose de EA e no *burst* oxidativo**

Estudos demonstram que o ácido araquidônico é necessário para a fagocitose e *burst* oxidativo. Ele é considerado um segundo mensageiro importante nas vias de sinalização intracelulares, sendo precursor dos eicosanóides. Essas substâncias têm a capacidade de atravessar a membrana celular, e interagir com receptores localizados em células vizinhas, dando origem a respostas inflamatórias.

Como em trabalho anterior do nosso laboratório já se havia verificado a inibição da fagocitose de EA pela corticosterona (0,3 µg/mL) (BACCAN et al. 2004), e confirmado em nossos estudos com novas observações, avaliou-se se essa inibição poderia estar relacionada ao efeito desse mediador (AA) na fagocitose e *burst* oxidativo.

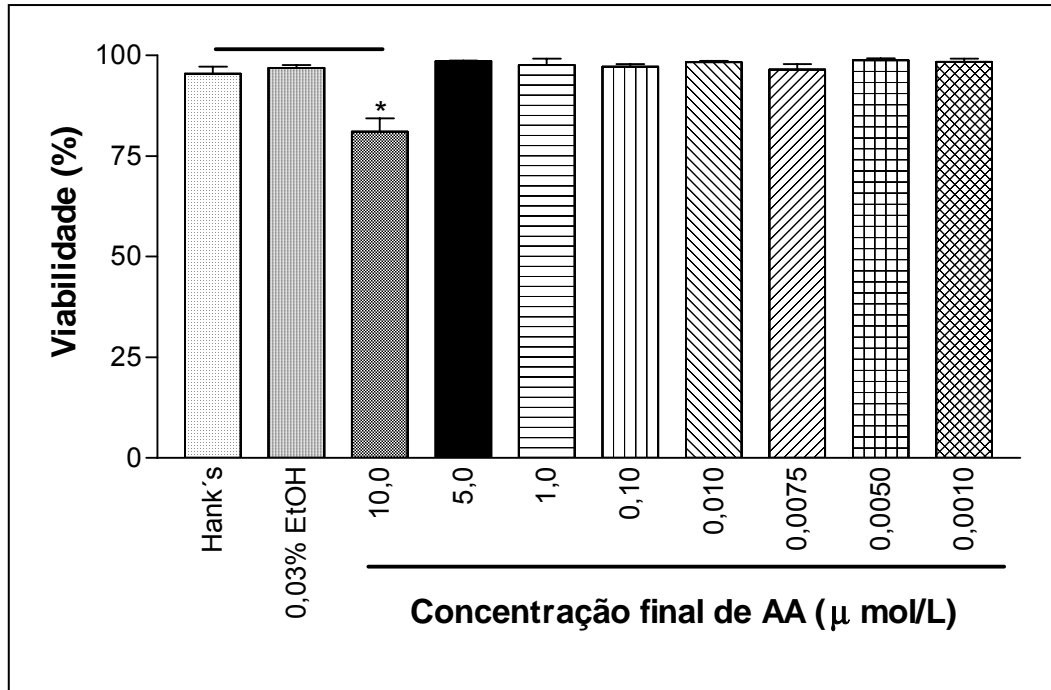
##### **4.4.1 - Avaliação da toxicidade do ácido araquidônico (AA) sobre macrófagos peritoneais de camundongos**

Primeiramente avaliou-se a possível toxicidade do ácido araquidônico sobre os macrófagos peritoneais de camundongos, pois sabe-se que essa substância tem uma toxicidade tempo-dependente (POMPÉIA et al. 2003).

Macrófagos residentes foram incubados com diferentes concentrações de AA e etanol por 45 min e avaliados através do ensaio de exclusão ao corante tripan blue.

Observou-se que as células incubadas por 45 min com o AA na concentração de 10µM tiveram morte celular significativa; o etanol, no entanto (como foi o solvente

utilizado para dissolver o ácido araquidônico) não interferiu com a viabilidade celular (Figura 24).



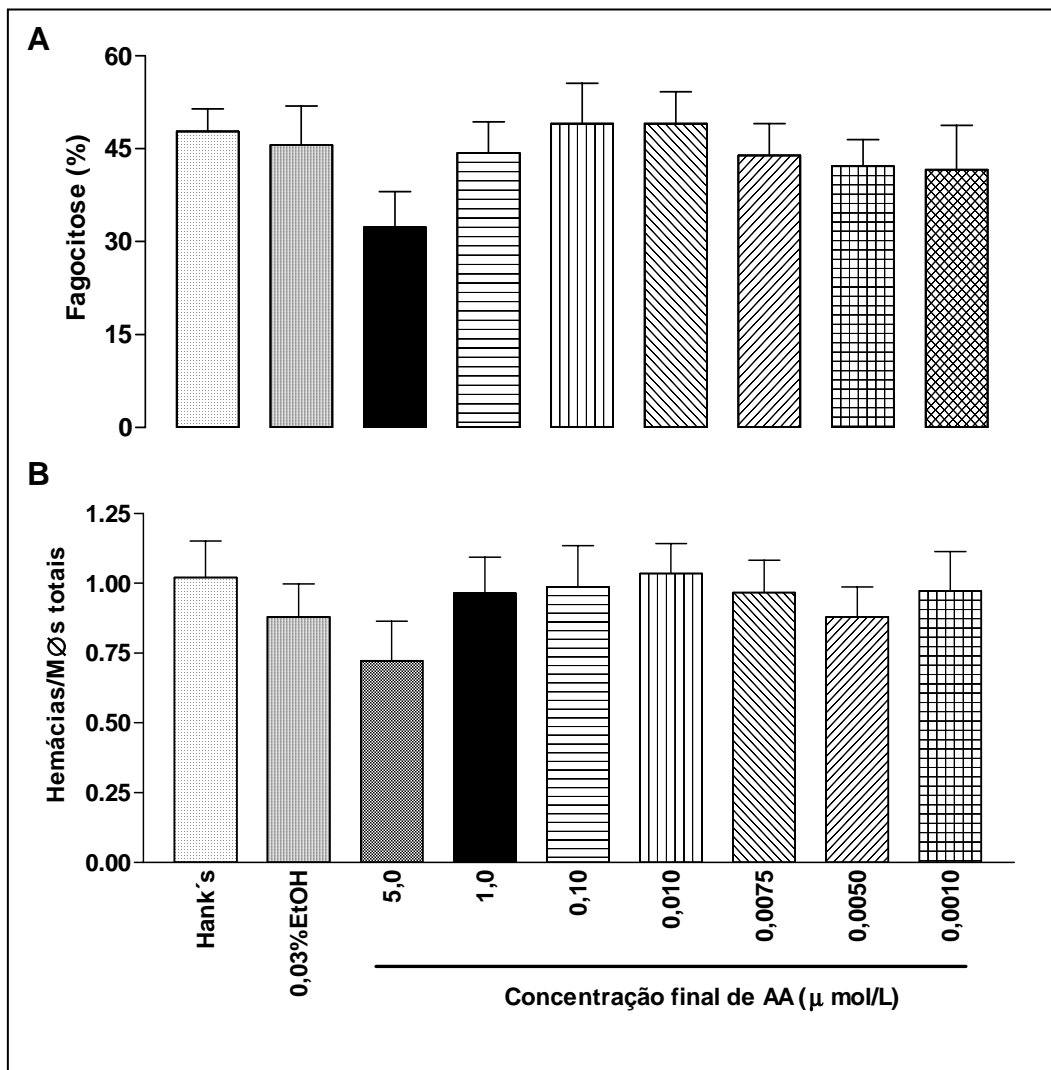
**Figura 24** - Efeito do ácido araquidônico (AA) na viabilidade celular. Macrófagos peritoneais foram incubados por 45 min com concentrações crescentes de AA. Viabilidade celular foi avaliada por exclusão de azul de tripan. Hank's: solução tamponada. EtOH: Etanol. Os dados foram analisados pelo One-Way ANOVA seguido do teste de Dunnett e estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média; n=5. \* = diferença significativa em relação ao controle (Hank's) ( $p < 0,05$ ).

#### 4.4.2 – Efeito de diferentes concentrações do ácido araquidônico na fagocitose de EA por macrófagos peritoneais de camundongos não tratados com corticosterona

Com o objetivo de investigar qual a melhor concentração do AA que não interferisse com o processo de fagocitose de macrófagos realizou-se uma curva dose-resposta (Figura 25 A e B). Verifica-se que as concentrações de AA não interferiram com a porcentagem de fagocitose e nem com o número de hemácias por

macrófagos totais, há uma pequena diminuição da fagocitose na concentração de 5  $\mu\text{mol/L}$ , não sendo significativa pela análise estatística.

Portanto utilizamos para os próximos ensaios as concentrações de 1  $\mu\text{mol/L}$  e 7,5  $\text{nmol/L}$  para avaliar se o AA poderia possivelmente ter algum efeito em reverter a inibição da fagocitose de EA pela corticosterona.

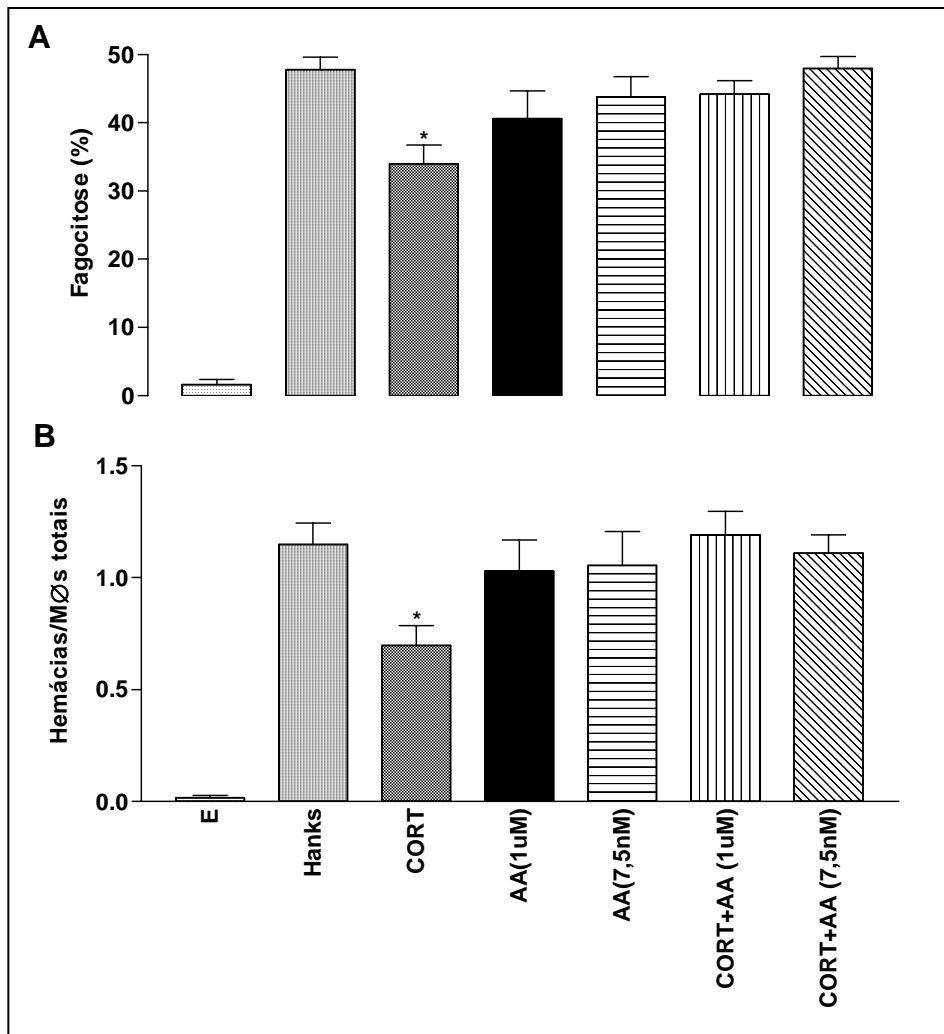


**Figura 25** - Efeito do ácido araquidônico no processo de fagocitose de EA. **A:** Porcentagem de fagocitose; **B:** número médio de hemácias fagocitadas por macrófagos totais. Os macrófagos foram tratados inicialmente por 15 min com AA, e em seguida incubados com EA na presença do ác. araquidônico em diferentes concentrações a 37°C por 30 min. Os dados foram analisados pelo One-Way ANOVA seguido do teste de Dunnett e estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, n= 3.

#### **4.4.3 - Efeito do ácido araquidônico na fagocitose de EA por macrófagos peritoneais de camundongos tratados previamente com corticosterona**

Neste ensaio incubou-se os macrófagos residentes aderidos em lamínulas com corticosterona ( $1 \cdot 10^{-5}$  mol/L) por 10 minutos; posteriormente as células foram lavadas por imersão em solução de Hank's e adicionou-se o AA 1  $\mu$ mol/L e 7,5 nmol/L incubando-se inicialmente 15 minutos. A seguir, na presença dessas mesmas concentrações de AA, os imunocomplexos (EA) foram adicionados e após 30 min avaliou-se a fagocitose de EA.

Na figura 26 (A e B) observa-se que a fagocitose de EA por macrófagos peritoneais residentes de camundongos foi inibida pela presença da corticosterona a  $10^{-5}$  mol/L, tanto na porcentagem de fagocitose quanto no número de hemácias por macrófagos totais. Já nas células tratadas com a CORT na presença de AA (1  $\mu$ mol/L e 7,5 nmol/L), observou-se uma reversão do processo de inibição realizado pela corticosterona. Não houve diferença entre as duas concentrações de AA.

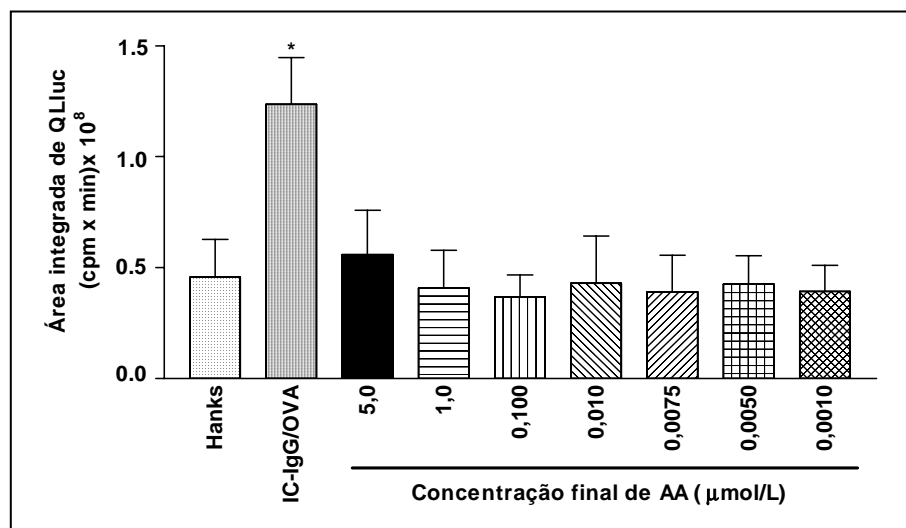


**Figura 26** - Efeito do ácido araquidônico (AA) no processo de inibição pela corticosterona (CORT) a  $10^{-5}$  mol/L do processo de fagocitose de EA (Hemácias opsonizadas com IgG). **A:** Porcentagem de fagocitose; **B:** número médio de hemácias fagocitadas por macrófagos totais. Os macrófagos foram tratados inicialmente por 10 min com corticosterona ( $10^{-5}$  mol/L), e em seguida incubados com EA na presença de Ac. Araquidônico (1 $\mu$ M e 7,5nM) sendo o meio livre de Corticosterona por 37°C por 30 min. Os dados foram analisados pelo One-Way ANOVA seguido do teste de Dunnett e estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média; n =8. \* = diferença significativa em relação ao controle (Hank's) ( $p < 0,05$ ), E = Hemácias.

#### 4.5 - Avaliação do AA no *burst* oxidativo de macrófagos peritoneais

##### 4.5.1 – Efeito de diferentes concentrações de AA na produção de espécies reativas de oxigênio avaliadas por QLuc pelos macrófagos peritoneais

Nesta etapa do trabalho avaliamos se o ácido araquidônico poderia estimular diretamente as células a produzirem espécies reativas de oxigênio (ROBINSON, 1998; POMPEIA, 2003). Através do método de quimiluminescência dependente de lucigenina (QLuc) o qual detecta a produção de ânion superóxido, analisamos a produção de ROS pelos macrófagos peritoneais tratados com AA em diferentes concentrações. Pode-se observar que as concentrações de AA empregadas não estimularam as células em comparação com o respectivo controle (Hank's) (Figura 27). Utilizou-se o estímulo IgG/OVA (100 ug/mL) como controle positivo de estimulação para a produção de ânion superóxido.

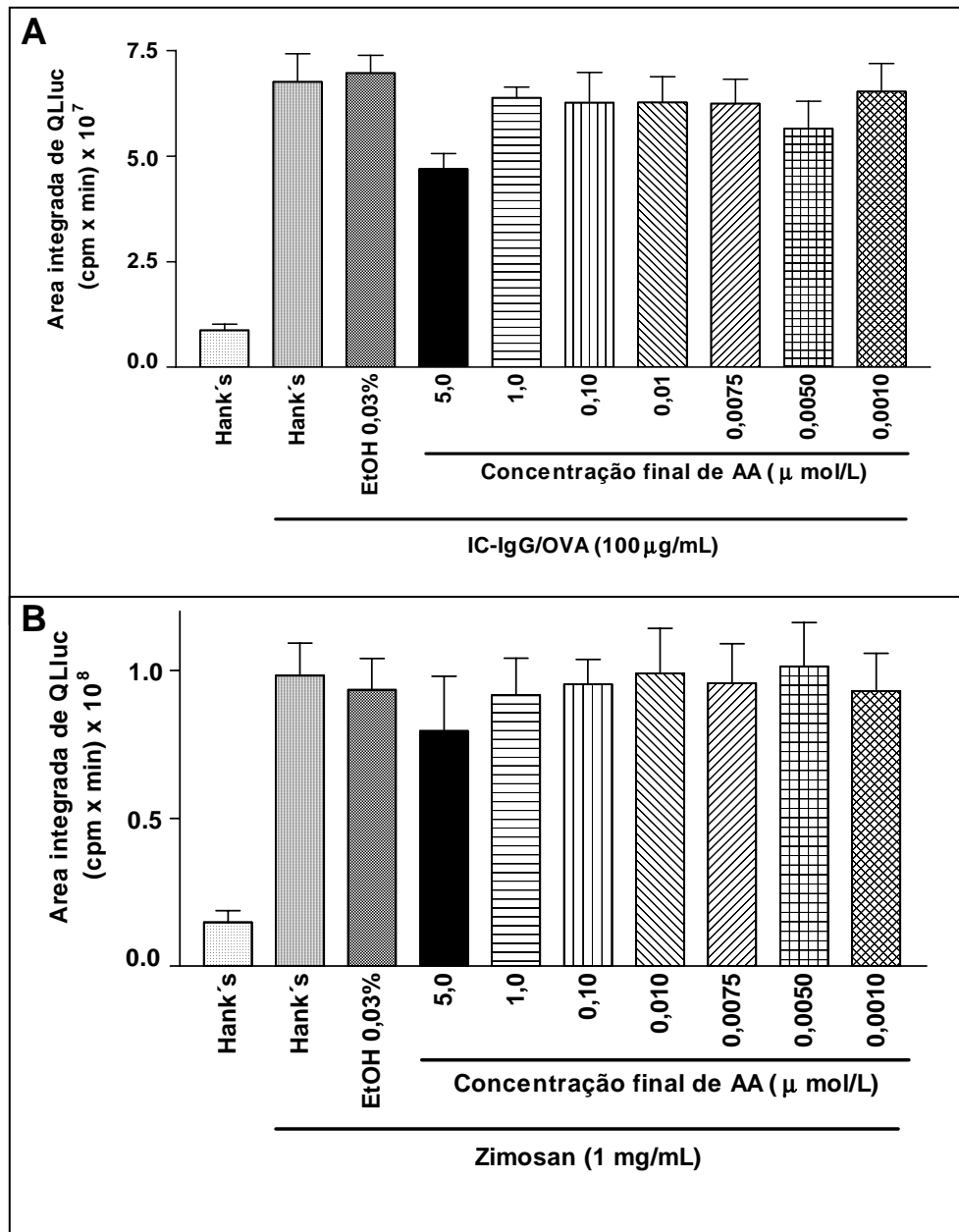


**Figura 27** - Avaliação das diferentes concentrações de AA no processo de ativação do *burst* oxidativo de macrófagos peritoneais de camundongo, através da QL-luc. IgG/OVA imunocomplexo de IgG anti ovoalbumina (100ug/mL). Hank's: Solução tamponada - controle das células não estimuladas. Os dados foram analisados pelo One-Way ANOVA seguido do teste de Dunnett e estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média; n = 7. \* = diferença significativa em relação ao controle (Hank's) ( $p < 0,05$ ).

#### **4.5.2 – Efeito de várias concentrações do ácido araquidônico (AA) na respostas de QLuc frente aos estímulos imunocomplexo IgG/OVA e Zimosan**

Para verificar e ter uma maior segurança que o AA não estaria amplificando a resposta quando as células fossem estimuladas, realizou um ensaio que consistiu em adicionar o AA em várias concentrações por um período de 5 min e posteriormente desafiar as células na presença do AA com os estímulos imunocomplexo de IgG/OVA e zimosan. A leitura foi realizada por 40 min, seguindo o padrão de tempo da fagocitose na presença do AA.

Observa-se que as concentrações utilizadas de AA em macrófagos na presença dos estímulos IgG/OVA e Zimosan não interferiram com as respostas de QLuc; a aparente diminuição do efeito do AA na concentração de 5 $\mu$ mol/L nas células estimuladas com imunocomplexo não foi estatisticamente significativa (Figura 28).



**Figura 28** - Efeito de diferentes concentrações de AA no processo de ativação do burst oxidativo de macrófagos peritoneais de camundongo por IgG/OVA (100ug) **(A)** e zimosam (1mg/mL) **(B)** avaliados por QL-luc. Hank's: Solução tamponada - controle das células não estimuladas. IC-IgG/OVA imunocomplexo de IgG anti ovoalbumina; EtOH: Etanol. Os dados foram analisados pelo One-Way ANOVA seguido do teste de Dunnett e estão expressos como média ± desvio padrão da média; n = 4. (\*) diferença significativa em relação ao controle (Hank's + IC-IgG/OVA/ Hank's + Zimosan) (p<0,05).

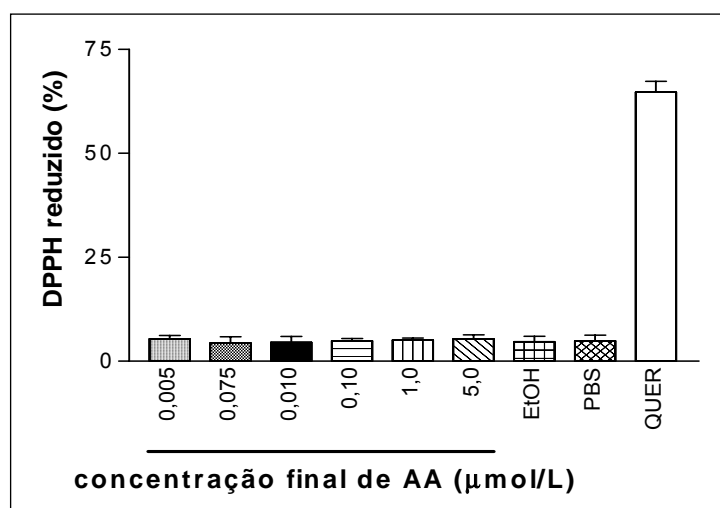


#### 4.6 - Avaliação da atividade seqüestradora de radicais livres pelo AA e do efeito deste sobre o *burst* oxidativo de Macrófagos Peritoneais de camundongos

Antes de verificar se o AA também poderia reverter a inibição da produção de ROS pela corticosterona, realizamos um experimento preliminar a fim de avaliar se este composto não poderia agir como um agente seqüestrador dessas espécies reativas, o que interferiria na interpretação dos experimentos seguintes.

Os valores de porcentagem de redução do DPPH em função da concentração de AA estão representados na Figura 29. Utilizou-se um flavonóide padrão quercetina, composto esse anti-oxidante, que possui a atividade de seqüestrar ROS (KROL et al. 1994).

Nossos dados demonstram que o ácido araquidônico não possui atividade seqüestradora de ROS, nas concentrações empregadas.



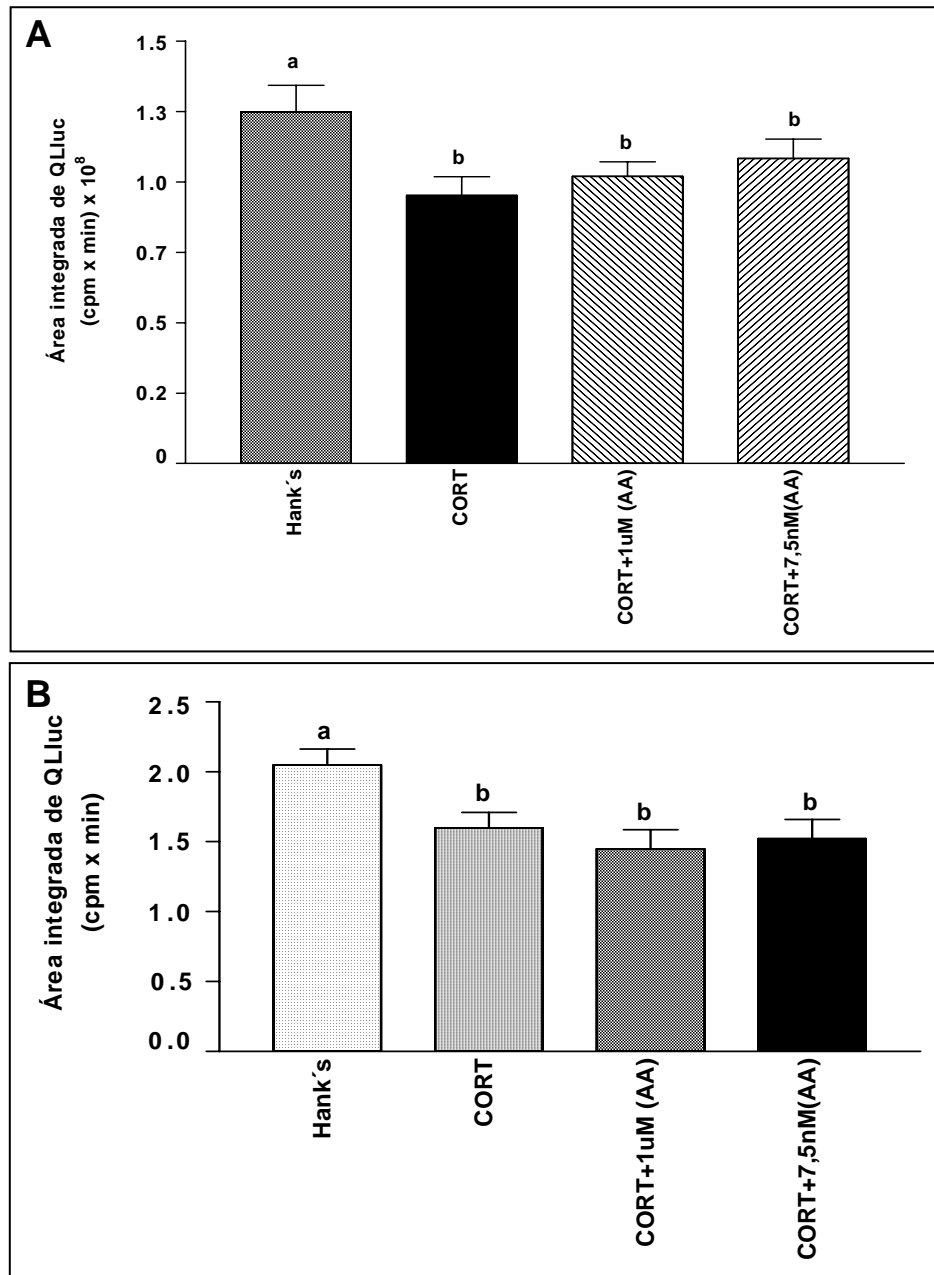
**Figura 29** - Porcentagem de redução do DPPH frente às diferentes concentrações de ácido araquidônico. Valores expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de dois experimentos, com medidas em duplicatas. Abreviaturas: DPPH: 2,2-difenil-1-picrilhidrazil; EtOH: Etanol (0,03%) QUER: Quercetina (10 µmol/L); PBS: Solução tamponada pH 7,2.

#### **4.7 - Efeito do ácido araquidônico sobre a inibição de QLluc produzida pela corticosterona**

Como foi observado nos ensaios anteriores de QLluc, a corticosterona ( $10^{-5}$  mol/L) inibiu a produção de espécies reativas de oxigênio, dentro das condições experimentais empregadas. Diante disso buscou-se avaliar também nesse fenômeno o possível efeito do AA.

Nesse ensaio adicionou-se o AA a  $1\mu\text{mol/L}$  e  $7,5\text{nmol/L}$  na presença dos estímulos IgG/OVA e Zimosan e/ou na presença da corticosterona.

Na figura 30 (A e B) observa-se que os macrófagos peritoneais estimulados com IgG/OVA e Zimosan sofreram inibição pela corticosterona a  $10^{-5}\text{mol/L}$  na produção de ROS. Na presença de AA ( $1\mu\text{mol/L}$  e  $7,5\text{nmol/L}$ ), observou-se que não ocorreu uma reversão do processo de inibição realizado pela corticosterona, sendo possivelmente devido à presença da corticosterona no período de leitura por 40 min.



**Figura 30** - Efeito do ácido araquidônico (AA) no processo de Inibição realizado pela corticosterona (CORT) avaliados por QL-luc em macrófagos estimulados com IgG/OVA (100ug); zimosan (1mg/mL). Macrófagos tratados ou não com corticosterona e desafiados com IC-IgG/OVA imunocomplexo de IgG anti ovoalbumina na presença e/ou ausência do AA **(A)** e zimosan **(B)**. Hank's: Solução tamponada. CORT: Corticosterona  $10^{-5}$  mol/L. Os dados foram analisados pelo One-Way ANOVA seguido do teste de Dunnett e estão expressos como média  $\pm$  desvio padrão da média; n = 7.

#### **4.8 - Efeito da corticosterona na atividade da fosfolipase A<sub>2</sub> secretada humana do grupo IIA (hsPLA<sub>2</sub> gIIA)**

Tendo em vista os resultados anteriores sobre o efeito do AA na ação inibitória da corticosterona, procuramos verificar se este hormônio poderia estar interferindo na inibição da liberação do AA. Para isso, pesquisamos a influência da corticosterona na fosfolipase A<sub>2</sub> secretada humana do grupo IIA (hsPLA<sub>2</sub> gIIA) que é uma enzima envolvida na liberação do AA.

A ativação da fosfolipase A<sub>2</sub> produz segundos mensageiros que influenciam a função fagocítica e o processo de produção de espécies reativas de oxigênio. Uns desses produtos são o ácido araquidônico e o inositol trifosfato que está diretamente ligado às respostas celulares.

Assim, realizou-se o ensaio de atividade enzimática usando o indicador de ácido graxo livre ADIFAB (proteína de ligação de ácido graxo intestinal marcada com acrilodan - é um indicador fluorescente para a medida da concentração de ácidos graxos livres). A detecção do ácido graxo pelo ADIFAB é baseada na mudança de posição do fluoróforo acrilodan em relação à ligação apolar da proteína I-FABP quando ela se torna ocupada pelo ácido graxo. A mudança espectral do ADIFAB permite a determinação da concentração de ácidos graxos através da razão da intensidade de fluorescência do indicador ligado e desligado medido em 505 e 425 nm, respectivamente.

A Figura 31 mostra a razão de intensidade de fluorescência em função do tempo após a adição da fosfolipase A, observamos que a PLA<sub>2</sub> apresentou uma atividade hidrolítica, indicada pelo aumento da razão da intensidade de fluorescência

( $I_{505}/I_{425}$ nm), como observado. Nos ensaios com a incubação com a corticosterona ( $0,86 \times 10^{-6}$ mol/L) observa-se uma diminuição na atividade da PLA<sub>2</sub>.

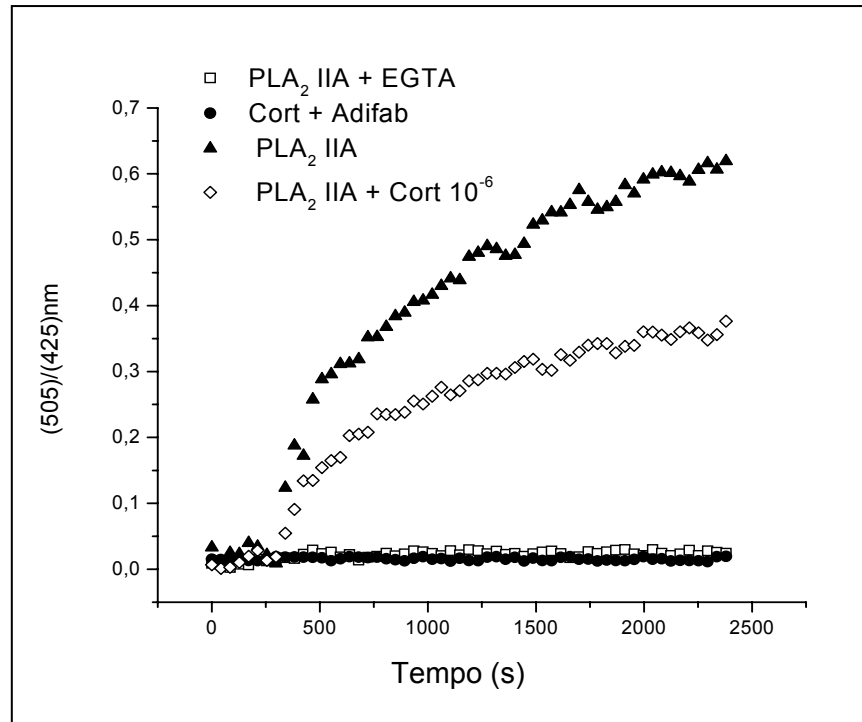


Figura 31 - Efeito da corticosterona na atividade da fosfolipase A<sub>2</sub> secretada humana do grupo IIA (hsPLA<sub>2</sub> gIIA). Representação da atividade da proteína PLA<sub>2</sub> na concentração de 0,5µg/mL na presença e ausência da corticosterona (CORT)  $0,86 \times 10^{-6}$ mol/L. Razão da intensidade de fluorescência (I) em 505 e 425 nm após a adição  $100\text{ng. mL}^{-1}$  da hsPLA<sub>2</sub> gIIA. Para o controle experimental foi adicionado  $100\text{ng. mL}^{-1}$  da hsPLA<sub>2</sub>gIIA na presença de 1mM de EGTA. Gráficos representativos de um total de 2 experimentos. A adição das proteínas foi feita após 10 minutos. EGTA: ácido etileno glicol -bis- (β- amino etil eter) ADIFAB: proteína de ligação de ácido graxo intestinal marcada com acrilodan).

*Discussão*

## 5 - DISCUSSÃO

---

A fagocitose e a endocitose são funções celulares importantes nos mecanismos de defesa do organismo por realizarem o reconhecimento e a destruição de agentes estranhos e patogênicos. Considera-se como fagocitose a captação e interiorização em vacúolos de partículas com mais de  $0,5\mu\text{m}$ , por mecanismos independentes de clatrina, requerendo a polimerização de actina (RABINOVITCH, 1995; OLIVEIRA et al. 1996).

O início da fagocitose se dá com a ligação da partícula a receptores presentes na membrana das células: é o processo de reconhecimento, ao qual se segue um conjunto de eventos bioquímicos que resultam na polimerização da actina, com a formação de pseudópodes e o envolvimento da partícula.

Avaliamos inicialmente a fagocitose por macrófagos residentes mediada por receptores  $\text{Fc}\gamma\text{R}$ . Os resultados obtidos mostraram que a corticosterona, na concentração de  $10^{-5}\text{mol/L}$ , tem ação inibitória sobre a fagocitose de EA que é mediada por esses receptores. Quando se utilizou o estímulo  $\text{IgG/OVA}$ , não se observou tal inibição, mesmo em diferentes concentrações utilizadas.

A inibição da interiorização de EA pode estar relacionada com a diminuição dos receptores  $\text{Fc}\gamma\text{R}$  na membrana dos macrófagos por ação da corticosterona (GOMEZ et al. 1998).

Tendo em vista essa diferença na suscetibilidade à inibição pela corticosterona com EA e  $\text{IgG/OVA}$  na forma precipitada, procuramos verificar se a interiorização desses dois tipos de imunocomplexos se fazia por mecanismos celulares diferentes, ou seja, por envolvimento do citoesqueleto de actina ou pela formação de cavéolas, ou ainda mediado por clatrina.

Drogas inibidoras específicas para distinguir entre esses três tipos de interiorização são utilizadas, como a citocalasina B que tem a capacidade de se ligar aos microfilamentos de actina; a nistatina atua sobre as proteínas caveolinas e a clorpromazina sobre as clatrininas como também no colesterol presente na membrana (ELFERINK, 1978; ORDWAY et al. 2002; SANTOS et al. 2008).

A clorpromazina é um fenotiazínico que tem afinidades com constituintes da membrana, como lipídeos e proteínas. Segundo Elferink (1978) a clorpromazina inibe a fagocitose de zimosan e a liberação de enzimas em células polimorfonucleares, por interferir em certas funções de membrana.

Existem várias maneiras das células interiorizarem partículas, sendo a fagocitose uma delas. A pinocitose de um modo geral refere-se à interiorização de partículas menores, podendo ser dividida em endocitose dependente de clatrina, endocitose dependente de caveolina e endocitose independente de clatrininas e caveolinas (CONNER; SCHMID, 2003). Utilizando inibidores específicos (nistatina, clorpromazina e citocalasina B), verificamos que tanto a interiorização de EA como a do imunocomplexo IgG/OVA são dependentes da polimerização de actina G. Adicionalmente a interiorização de IgG/OVA também pareceu ser dependente de clatrina.

O fato de ambos os processos envolverem a participação dos microfilamentos de actina, não implica que essa participação seja idêntica, podendo haver diferenças no grau de polimerização requerida já que os dois tipos de imunocomplexos incluem partículas com diferentes morfologias. Enquanto que o EA é um estímulo de tamanho definido, sendo assim interiorizado por inteiro, o imunocomplexo precipitado de IgG/OVA, sofre fragmentações que originam partículas de diferentes



tamanhos. Essa, talvez, seja uma explicação do porquê da corticosterona não ser capaz de inibir o processo da fagocitose de IgG/OVA.

A corticosterona não alterou a fagocitose de zimosam por macrófagos residentes independente da concentração utilizada. Essas partículas, contendo polímeros de manana e  $\beta$ -glucana, podem se ligar a vários receptores diferentes, como o de manose, dectina-1, receptores *toll-like* e receptores de complemento (CR3). Portanto, o tratamento por 10 minutos com a corticosterona parece não alterar a expressão de nenhum desses receptores.

Alguns trabalhos mostram que os macrófagos alveolares sofrem inibição no processo de fagocitose de zimosan opsonizado na presença de glicocorticóides (Belayat et al. 1998), sendo esses mecanismos de inibição dose e tempo-dependentes. Macrófagos esplênicos de réptil *Hemidactylus flaviviridis* incubados por um período de 4h na presença da hidrocortisona diminuíram a fagocitose e a produção de nitrito, por mecanismo genômico clássico (MONDAL; RAÍ, 2002).

Long et al. (2005), evidenciaram que macrófagos peritoneais de camundongo submetidos *in vitro* a concentrações decrescentes ( $10^{-4}$  a  $10^{-10}$  mol/L) de corticosterona (20 a 25 min) sofrem inibição da fagocitose de *neutral red* (vermelho neutro) e da produção de ânion superóxido. No entanto não houve alteração na presença do RU 486 e da actinomicina, indicando um mecanismo não genômico.

O imunocomplexo e o zimosan, quando se ligam aos receptores presentes na superfície dos macrófagos, desencadeiam uma agregação destes que culmina numa cascata de sinalização citoplasmática. Essa cascata de sinalização se inicia com a fosforilação de tirosinas presentes nos domínios citoplasmáticos desses receptores (motivos de ativação celular - ITAM). A fosforilação é realizada por proteínas quinases específicas que constituem a base para muitos efeitos bioquímicos no

processo de fagocitose e *burst* oxidativo (GARCÍA-GARCÍA; ROSALES, 2002; MARZOCCHI-MACHADO e LUCISANO-VALIM, 2005).

A sinalização citoplasmática gera segundos mensageiros intracelulares, que permanecem no citoplasma. São exemplos clássicos, AMP cíclico,  $Ca^{2+}$ , inositol trifosfato e diacilglicerol, que em conjunto causam ativações específicas por se ligarem a proteínas quinases, proteínas fosfatases e proteínas intracelulares ligadoras de cálcio (RAVETCH; BOLLAND, 2001).

Baccan (2004) relata que macrófagos residentes, ao serem tratados com corticosterona (0,3 $\mu$ g/mL) por 10 minutos, sofreram diminuição na fosforilação de tirosinas, e que a polimerização de actina não foi alterada frente a este hormônio.

Uma das explicações da diminuição da fagocitose de EA por macrófagos residentes estaria na redução da fosforilação dessas proteínas ocasionando a diminuição da sinalização intracelular.

O grau de fluidez também é importante na manutenção da homeostase da membrana celular. Vários autores explicam que uma das ações não genômicas dos glicocorticóides, seria a inserção na membrana fosfolipídica ocasionando uma possível alteração na fluidez de membrana (FALKENSTEIN, 2000; BACCAN, 2004). Em ensaios realizados *in vitro* por Baccan (2004), com macrófagos residentes, verificou-se que a corticosterona (0,3 $\mu$ g/mL) por 10 minutos, aumentava a fluidez de membrana o que era importante para alteração na fagocitose.

Como existe uma relação direta entre a lipofilicidade de moléculas com a alteração da fluidez de membrana (MOREIRA et al. 2007), foi avaliado o efeito do ácido araquidônico nas concentrações de 1  $\mu$ mol/L e 7,5 nmol/L na fluidez de membrana de macrófagos utilizando a sonda 1,6-difenil-1,3,5, hexatrieno (DPH), segundo ensaios preliminares realizados (dados não mostrados) os resultados

obtidos sugerem que não houve nenhuma alteração na fluidez de membrana comparada com o controle.

Segundo Whiting (2000), a inserção de esteróides lipofílicos na membrana de tecidos resulta numa perturbação das interações entre os lipídeos, alterando assim a função de proteínas presentes na membrana. A incorporação do colesterol já é bem compreendida, mas os efeitos dos hormônios na fluidez de membrana não são muito bem caracterizados. Portanto essa mudança na fluidez de membrana precisa ser melhor compreendida, pois sugere-se que o mecanismo de ação dos esteróides estaria diretamente ligado a modificações na mobilidade da membrana plasmática.

A fagocitose vem sempre acompanhada com o processo de estimulação do *burst* oxidativo devido a ativação na NADPH oxidase. Os estímulos utilizados em nosso trabalho (IgG/OVA e zimosan) desencadeiam a produção de espécies reativas de oxigênio, a qual é crucial para a morte de agentes patogênicos. A primeira espécie reativa a ser produzida é o ânion superóxido, através da ativação da NADPH oxidase, sendo que as outras espécies são formadas através de dismutações e de reações na presença de peroxidases.

Visto que a corticosterona inibiu a fagocitose mediada por receptores Fcγ com o estímulo EA e sendo que esses receptores estão diretamente ligado à produção do *burst* oxidativo avaliamos, por quimioluminescência dependente de luminol (QLlum) e lucigenina (QLluc), o efeito da corticosterona na produção de espécies reativas de oxigênio como também para o estímulo zimosan. O luminol é uma sonda usada para medir a produção de diversos ROS produzida pelos fagócitos: peróxido de hidrogênio, radical hidroxil, oxigênio singleto, óxido nítrico, entre outros. A quimioluminescência dependente de lucigenina mede a produção do primeiro radical

formado, o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), através da redução do oxigênio molecular pelo sistema da NADPH oxidase (VAN DYKE; CASTRANOVA, 1987).

Inicialmente avaliamos a população celular da cavidade peritoneal, por meio de contagens diferenciais de 10 experimentos distintos, onde ficou caracterizado que 93% das células presentes eram macrófagos/monócitos. A porcentagem de neutrófilos presente não interferiu com esta quantificação, pois foram realizados ensaios utilizando uma concentração celular de neutrófilos que correspondia a 2%, e pode-se verificar que a resposta de QL dependente de lucigenina foi igual ao controle (células não estimuladas) (dados não mostrados).

Para cada estímulo utilizado, os perfis de quimioluminescência foram distintos. Para o estímulo IgG/OVA, a cinética de emissão de luz atinge um pico máximo (tempo: 8 -11 min) e observa-se diminuição ao longo do tempo; já com o zimosan, verifica-se que a emissão de luz tende a aumentar ao longo do tempo (tempo final de leitura: 40 min), sendo que o pico máximo de QLluc para zimosan é de 69 - 72 min (SUZUKAWA, 2008). Pode-se sugerir que o processo de formação das espécies reativas de oxigênio também é tempo dependente conforme o receptor o qual é ativado.

Na avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio, na presença do hormônio, realizamos experimentos controles com dimetilsulfóxido na mesma concentração utilizada para o preparo da solução de corticosterona, verificando que o solvente não interferiu na produção das espécies reativas de oxigênio. Segundo Kahler (2000), dimetilsulfóxido é muito usado como solvente em estudos *in vitro* de quimioluminescência, e em concentrações abaixo de 1% (v/v) não interfere nos resultados.

Nossos dados demonstraram que a corticosterona na concentração de  $10^{-5}$  mol/L diminuiu a produção de  $O_2^-$  induzida por ambos os estímulos (IgG/OVA e zimosan), mas não alterou a produção total de ROS.

A presença do hormônio no período de 50 min poderia justificar a inibição observada na produção do ânion superóxido, já que no período de 10 min não se observou alteração na produção desse ânion. Isso sugere que o efeito da corticosterona foi por um mecanismo clássico de resposta genômica (ISMAILI; GARABEDIAN, 2004).

Em relação à inibição da produção de ânion superóxido pela NADPH oxidase, sugerimos que essa enzima é mais sensível à ação do hormônio do que as demais enzimas presentes na produção das outras espécies. Assim a corticosterona poderia estar atuando como inibidor de genes que ativam síntese de proteínas responsáveis pela produção de ânion superóxido.

Pesquisas realizadas por De Castro (2000) mostraram que ratos submetidos ao estresse por imobilização têm o nível da corticosterona aumentado e a produção de ânion superóxido diminuída, em macrófagos alveolares ativados com PMA. Wazières (1998), utilizando estresse por barulho, verificou que os níveis de corticosterona também se alteraram e que a produção de espécies reativas de oxigênio avaliadas por QLlum por macrófagos alveolares estimulados com zimosan opsonizado e FMLP foi aumentada nos grupos estressados. Já com os macrófagos peritoneais esse processo não ocorreu.

De fato os resultados da literatura são bastante contraditórios, o que nos leva a crer que o estado de ativação dos macrófagos, os diversos estímulos e as diferentes concentrações de corticosterona explicariam a diversidade desses resultados.

Essa eventual diminuição da produção de ânion  $O_2^-$  pela corticosterona pode ser explicada pelo aumento da fluidez de membrana como sugerido no processo de fagocitose, já que a liberação de ROS necessita da reunião do complexo NADPH oxidase na membrana celular.

Diante dos resultados até aqui obtidos, onde verificamos o efeito da corticosterona na diminuição da fagocitose de EA (10 min) e no processo do *burst* oxidativo com os estímulos IgG/OVA e zimosan (50 min), avaliamos se essa inibição poderia estar relacionada com alguns mediadores presentes no processo fagocítico e *burst* oxidativo.

Nessa etapa do trabalho, procurando conhecer o mecanismo pelo qual a corticosterona inibe a fagocitose de EA e do *burst* oxidativo, partimos da hipótese de que esse hormônio estivesse interferindo na liberação do AA e com isso causando a inibição observada.

Segundo Suzuki (1991), Olsson e Sundler (2007) e Suram (2006), os receptores  $Fc\gamma R$  e dectina-1 quando estimulados liberam ácido araquidônico. Dessa forma pode-se verificar que o AA é um mensageiro secundário importante nesse processo de produção das espécies reativas de oxigênio e na fagocitose.

Em processos de sinalizações celulares, vias mais complexas são ativadas com a produção de mediadores inflamatórios. A cascata do ácido araquidônico e seus metabólitos fazem parte dessas substâncias importantes que atuam na regulação das atividades celulares. O ácido araquidônico é originado a partir de fosfolípidios da membrana celular e possui um pequeno período de vida, sendo transformado em uma família de metabólitos denominados de eicosanóides (LENNARTZ, 1999).

O ácido araquidônico é liberado pelos macrófagos em resposta a uma variedade de estímulos particulados e solúveis. Essa liberação é devida à ativação de fosfolipases (A, C, D), principalmente a fosfolipase A<sub>2</sub>, dando origem a uma sucessão de eventos intracelulares que se processam na membrana celular e no citoplasma da célula.

Inicialmente realizou-se uma curva de toxicidade do ácido araquidônico nos macrófagos peritoneais em diferentes concentrações (10µmol/L - 1nmol/L), através do ensaio de exclusão ao corante azul de tripan. Observou-se que as células incubadas por 45 minutos com o ácido araquidônico na concentração de 10µmol/L tiveram morte celular significativa (> 95%) e as células permaneceram viáveis nas concentrações abaixo de 5µmol/L.

Estudos revelam que dependendo das concentrações e do tempo de incubação do AA, com determinados tipos de células, este pode ter um efeito citotóxico. Pompéia (2002), tratando células humanas (HL-60) por um período de 6 – 24 horas com AA, verificou que baixas concentrações deste (10 - 400 µmol/L) são citotóxicas e altas concentrações (400 - 1600µmol/L) induzem necrose.

Ensaio foram realizados para avaliar se o efeito do ácido araquidônico interferiria na a fagocitose e produção das espécies reativas por macrófagos peritoneais estimulados com EA, IgG/OVA e zimosan. Para tanto realizamos uma curva dose-resposta, e verificamos que as concentrações utilizadas de AA, bem como a concentração de etanol, solvente utilizado para solubilizar o ácido araquidônico, não alteraram nas respostas celulares quando comparado aos controles. Segundo Nilsson (1996), o etanol interfere na expressão dos receptores CR1 e Fcγ na membrana celular de neutrófilos, diminuindo a resposta destes receptores medeiam.

Verificou-se que o AA não reagiu com o radical livre DPPH, nas condições experimentais empregadas, sugerindo que o seu efeito no metabolismo oxidativo das células não é mediado por atividade antioxidante, mas provavelmente pela interferência em vias de sinalização intracelular.

Observamos que macrófagos residentes tratados com corticosterona (10 min) tiveram uma inibição na fagocitose de EA e que na presença do ácido araquidônico, nas concentrações de 1 $\mu$ mol/L e 7,5nmol/L, esta inibição não ocorreu, o que sugere que a ausência ou diminuição da concentração do AA é importante no efeito da corticosterona na fagocitose de EA.

Segundo Lennartz e Brown (1991), a fagocitose de hemácias opsonizadas com IgG e partículas de leveduras por monócitos é dependente de diferentes vias de sinalização, pois uma via depende de ácido araquidônico (EA) e a outra independe de ácido araquidônico (levedura).

A PLA<sub>2</sub> libera o AA, que estimula a NADPH oxidase e promove uma redistribuição da membrana durante a fagocitose, aumentando o número de vesículas eletrodensas, que ao se unirem na superfície da membrana, levam a formação dos pseudópodes (LENNARTZ, 1999).

Também foi avaliada a participação do AA na produção de espécies reativas de oxigênio e verificou-se que o ácido araquidônico não reverteu o processo de inibição mediada pela corticosterona na liberação de ânion superóxido.

Podemos sugerir que a liberação do ácido araquidônico em macrófagos residentes é dependente do estímulo utilizado, e que a participação do AA nas rotas bioquímicas intracelulares para a fagocitose e *burst* oxidativo são distintas.

Alguns trabalhos mostram a importância do AA na fagocitose e na produção de espécies reativas de oxigênio. Segundo Schwacha et al. (1993), quando ocorre



um defeito na liberação do AA, a produção de peróxido de hidrogênio é afetada. Já Cherny (2001) demonstra que AA tem uma íntima relação com a NADPH oxidase em eosinófilos humano, e canais de H<sup>+</sup>.

A diminuição da liberação do AA pela corticosterona pode ter sido causada por uma ação inibitória na PLA<sub>2</sub>, que é uma das enzimas primárias envolvidas na liberação deste a partir de fosfolípidos de membrana. Em nossos estudos o ácido araquidônico por si, como observamos, não estimula a fagocitose, mas é um componente fundamental para que ocorra o englobamento de partículas através da formação de pseudópodes desencadeado pela ativação do receptor Fcγ.

As fosfolipases A<sub>2</sub> são enzimas que catalisam a hidrólise de ácidos graxos na posição sn-2 de fosfolípidos de membrana. Constitui a principal rota metabólica pela qual ácidos graxos, como ácido de araquidônico, são liberados e convertidos em eicosanóides que modulam a resposta inflamatória (BALBOA, 2003).

A PLA<sub>2</sub> gIIA foi inicialmente caracterizada como uma enzima secretada encontrada no fluido sinovial (KRAMER et al. 1989; SEILHAMER et al. 1989) . Estudos subseqüentes têm demonstrado um amplo padrão de expressão em tecidos, sendo encontrada em macrófagos (INADA et al. 1991), plaquetas (KRAMER et al. 1989), neutrófilos (WRIGHT et al. 1990) e mastócitos (MURAKAMI et al. 1992).

Procurando avaliar a atividade da fosfolipase secretória PLA<sub>2</sub>gIIA, realizamos experimentos utilizando um indicador de ácido graxo livre o ADIFAB, para avaliar a atividade da enzima frente à corticosterona. Os resultados apresentados nesse trabalho mostraram que a atividade enzimática da PLA<sub>2</sub>gIIA na presença da corticosterona (0,86x10<sup>-6</sup> mol/L) foi diminuída e é dependente de Ca<sup>2+</sup>, pois na presença de EGTA a atividade hidrolítica foi abolida.

Vários estudos evidenciam que altas doses de glicocorticóides diminuem a atividade da PLA<sub>2</sub> por diferentes mecanismos: por gerar proteínas como lipocortina-I, que inibe *in vitro* a atividade da PLA<sub>2</sub> através de mecanismos que não estão bem definidos, ou por reduzir a expressão da PLA<sub>2</sub> do grupo II (NAKANO, 1990; GOULDING, 1993).

Croxtall et al. (1995; 1996) demonstraram que os glicocorticóides inibem a liberação do ácido araquidônico através da inibição da ativação da PLA<sub>2</sub> citoplasmática. Essa ação é mediada pela lipocortina-1, que age inibindo componentes da sinalização celular, proteína G e MAPK.

Assim, concluímos que a inibição observada pela corticosterona na fagocitose de EA parece ocorrer de uma maneira não genômica, já que o tratamento com a corticosterona por 10 min não é suficiente para ativar mecanismos genômicos. Em relação à produção de espécies reativas de oxigênio esse processo seria um mecanismo genômico devido ao tempo maior que 30 min (FALKENSTEIN et al. 2000).

Portanto neste trabalho nós sugerimos uma nova via de atuação da corticosterona na fagocitose de EA, uma via não genômica, a qual difere da via convencional mediada pelo receptor citoplasmático de glicocorticóides e alteração da transcrição, e a importância do ácido araquidônico nesse processo.

*Conclusões*

## 6 – CONCLUSÕES

---

A compreensão dos mecanismos fisiológicos implicados na regulação do sistema imune e nervoso constitui há muito tempo o principal foco de atenção de grande parte das pesquisas realizadas na área da neuroimunomodulação. Assim, o entendimento de como os hormônios afetam células do sistema imune é de grande importância. Neste trabalho avaliamos os efeitos da corticosterona no processo de fagocitose e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) em macrófagos peritoneais de camundongos e o papel do ácido araquidônico nesses processos.

Nossos resultados experimentais sugerem que:

A corticosterona modula, por um efeito não genômico, o processo de fagocitose de macrófagos residentes mediada por receptores  $Fc\gamma$ , sendo dependente da partícula utilizada.

Nos ensaios com quimioluminescência, verificamos que a produção de ânion superóxido foi alterada na presença da corticosterona por um período de 50 min, o que não se observou com a produção total de ROS. Esses resultados sugerem que essa inibição ocorreu por mecanismo genômico clássico dos glicocorticóides.

Em ensaios com o ácido araquidônico a  $1\mu\text{mol/L}$  e  $7,5\text{nmol/L}$ , não observamos alterações nas respostas de fagocitose e produção de ROS mediadas por receptores  $Fc\gamma$ , manose/fucose.

Verificamos que macrófagos residentes tratados com corticosterona (10 min) tiveram uma inibição na fagocitose de EA e na presença do ácido araquidônico ( $1\mu\text{mol/L}$  e  $7,5\text{nmol/L}$ ), esta inibição não ocorreu, o que sugere que a ausência ou diminuição da concentração do AA é importante no processo de fagocitose.

Na presença da corticosterona ( $0,86 \times 10^{-6}$  mol/L) verificamos uma diminuição na atividade da fosfolipase ( $s\text{PLA}_2\text{gIIA}$ ), o que sugere que a via de liberação do ácido araquidônico é prejudicada na presença desse hormônio.

*Bibliografia*

## 7 – BIBLIOGRAFIA

---

ADEREM, A.; UNDERHILL D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. **Annual Review of Immunology**, Palo Alto, v.17, p.593-623, 1999.

ALLEN, R. C. Phagocytic leukocyte oxygenation activities and chemiluminescence: a kinetic approach to analysis. **Methods in Enzymology**, New York, v. 133, p. 449-93, 1986.

ALVES, J. G.; PALERMO NETO, J. Neuroimunomodulação: sobre o diálogo entre os sistemas nervosos e imune. **Revista Brasileira de Psiquiatria**, São Paulo, p.1516-4446, 2007.

ARAGÃO, E. A. **Efeito da suramina na atividade da fosfolipase A<sub>2</sub> secretada humana do grupo IIA**. 2008. 123f. Tese (Doutorado em Química) – Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, 2008.

AUGER, M. J.; ROSS, J. A. The biology of the macrophage. In: Lewis CE, McGee JO, eds. **The macrophage**. Oxford: Oxford University Press; p.1-57, 1992.

BABIOR, B. M. NADPH oxidase: an update. **Blood**, New York, v.93, n.5, p.1464-1475, 1999.

BACCAN, G. C. **Estresse e fagocitose: papel da corticosterona e catecolaminas na fagocitose imunológica desempenhada por macrófagos murinos**. 2004. 167f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Faculdade de medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, 2004.

BACCAN, G. C.; OLIVEIRA, R. D. R.; MANTOVANI, B. Stress and immunological phagocytosis: possible nongenomic action of corticosterone. **Life Sciences**, Berlin, v. 75, p. 1357-1368, 2004.

BAEK S.H.; LIM J.H.; PARK D.W.; KIM S.Y.; LEE Y.H.; KIM J.R.; KIM J.H. Group IIA secretory phospholipase A(2) stimulates inducible nitric oxide synthase expression via ERK and NF-kappaB in macrophages. **European Journal of Immunology**, Weinheim, v.31, n.9, p.2709-17, 2001.

BARTLETT, G. R. Phosphorus assay in column chromatography. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.234, n.3, p.466-8. 1959.

BHATNAGAR, S. DALLMAN, M. Neuroanatomical basis for facilitation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to a novel stressor after chronic stress. **Neuroscience**, Oxford, v. 84, n. 4, p.1025-1039, 1998.

BECK S.; LAMBEAU G.; SCHOLZ-PEDRETTI K.; GELB M. H.; JANSSEN M.J.; EDWARDS S.H.; WILTON D.C.; PFEILSCHIFTER J.; KASZKIN M. Potentiation of tumor necrosis factor alpha-induced secreted phospholipase A2 (sPLA2)-IIA expression in mesangial cells by an autocrine loop involving sPLA2 and peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.8, p.29799-812, 2003.

BELAYAT, F.; MENIAL, K.; MICHAUX C.; KAFIDI, N.; COIGNOUL, F.; DEWAELE, A. *In Vitro* effect of glucocorticoids on phagocytic function of sheep alveolar macrophages. **The Veterinary Journal**, London, v.155, p.177- 181, 1998.

BERGENDI, L.; BENES, L.; DURACKOVÁ, Z.; FERENCIK, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. **Life Sciences**, Berlin, v.65, n.18/19, p.1865-1874,1999.

BERRIDGE M.J.; BOOTMAN M.D.; RODERICK H.L. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 4, n. 7, p.517-29, 2003.

BREHM M.; SCHILLER E.; ZELLER W. J. Quantification of reactive oxygen species generated by alveolar macrophages using lucigenin-enhanced chemiluminescence--methodical aspects. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v.87, n. 2-3, p.131-8, 1996.

BLOIS, M. S.; Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, London, v.181, p.1199-1200, 1958.

BOKOCH G. M.;DIEBOLD B. A. Current molecular models for NADPH oxidase regulation by Rac GTPase. **Blood**, New York, v. 1000, n.8, p. 2692-96. 2002.

BOOTH, J. W.; TRIMBLE, W. S.; GRINSTEIN, S. Membrane dynamics in phagocytosis. **Immunology**, Boston, v.13, p. 357-364, 2001.

CAMPBELL, R.D.; DODDS A. W.; PORTER R. R. The binding of human complement component C4 to antibody-antigen aggregates. **Biochemical Journal**, Berlin, v.189,p.67-80,1980.

CHARMANDARI E.; KINO T.; CHROUSOS G. P. Glucocorticoids and their actions: an introduction. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.1024, p.1–8, 2004.

CHEUNG, K; ARCHIBALD, A.C.; ROBINSON, M. F. The origin of chemiluminescence produced by neutrophils stimulated by opsonized zymosan. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v.130, n.1, p.2324-2339,1983.

CHERNY, V. V.; HENDERSON , L. M.; XU, W., THOMAS, L. L.; DECOURSEY, T. E. Activation of NADPH oxidase-related proton and electron currents in human eosinophils by arachidonic acid. **Journal of Physiology**, London, v. 535, n.3, p.783–794, 2001.

CLARCK; SHEPARD, A. Dialysis technique for preparing fluorescent Antibody. **Virology**, New York, v.20, p.642-644, 1963.

CLINE, M. J.; GOLDE, D.W. A review and reevaluation of the histiocytic disorders. **American Journal of Medicine**, New York, v.55, n.1, p.49-60, 1973.

CHAKRABORTI, S. Phospholipase A(2) isoforms: a perspective. **Cell Signal**, Oxford, v.15, n.7, p.637-65, 2003.

CHADFIELD M.; OLSEN J. Determination of the oxidative burst chemiluminescent response of avian and murine-derived macrophages versus corresponding cell lines in relation to stimulation with Salmonella serotypes. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Amsterdam v.10, n.80, p.289-308, 2001.

CROXTALL, J. D.; CHOUDHURY, Q.;TOKUMOTOS, H.; FLOWER, R. J. Lipocortin-1 and the control of arachidonic Acid release in cell signalling glucorticoids inhibit G protein-dependent activation of cPLA2 activity. **Biochemical Pharmacology**, Berlin, v.50, n. 4, p. 465-474, 1995.



CROXTALL, J.D.; CHOUDHURY, Q.; NEWMAN, S.; FLOWER, R.J. Lipocortin 1 and the control of cPLA2 activity in A549 cells. Glucocorticoids block EGF stimulation of cPLA2 phosphorylation. **Biochemical Pharmacology**, Berlin, v.52, n.2, p. 351-6, 1996.

CROWL, R. M.; STOLLER, T. J.; CONROY, R. R. E.; STONER, C. R. Induction of phospholipase A2 gene expression in human hepatoma cells by mediators of the acute phase response. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.266, n.4, Feb 5, p.2647-51. 1991.

CONNER, S. D.; SCHMID, S. L. Regulated portals of entry into the cell. **Nature**, London, v. 422, p.37-44, 2003.

DAVIES, J. D. Mammary ductal foam cells: macrophage immunophenotype for further cells? **Human Pathology**, Philadelphia, v.25, n.2, p.214-215, 1994.

DAHLGREN, C.; KARLSSON, A. Respiratory burst in human neutrophils. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 232, n. 1-2, p. 3-14, 1999.

DE CASTRO, C. M. M. B.; CASTRO, R. M.; MEDEIROS, A. F.; SANTOS, A. Q.; FERREIRA, W. T.; FILHO, J. L. L. Effect of stress on the production of in alveolar macrophages. **Journal of Neuroimmunology**, Amsterdam, v.108, p.68-72, 2000.

DHABHAR, F. S. Stress-induced augmentation of immune function the role of stress hormones, leukocyte trafficking, and cytokines. **Brain, behavior, and immunity**, Orlando, v.16, n.6, p.785-98, 2002.

ELFERINK, J. G. R. Chlorpromazine inhibits phagocytosis and exocytosis in rabbit polymorphonuclear leukocytes. **Biochemical Pharmacology**, Berlin, v.28, p.965-968, 1978.

FALKENSTEIN, E.; NORMAN, A. W.; WEHLING, M. Mannheim classification of nongenomically Initiated (Rapid) Steroid Action(s). **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, Springfield, v.85, n.5, p. 2072-2075, 2000.

FALKENSTEIN, E.; TILLMANN, H. C.; CHRIST, M.; FEURING, M.; WEHLING, M. Multiple actions of steroid hormones - A focus on rapid, nongenomic effects. **Pharmacological Reviews**, Baltimore, v. 52, n. 4, p.513-555, 2000.

FAHEY, J.L.; WUNDERLICH, J.; MISHELL, R. The immunoglobulins of mice. I – Four major classes of immunoglobulins: 7S2-, 7S1-, 1A, 2A- and 18S1M- Globulins. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.120, p.223, 1964.

FEARON, D.T.; AUSTEN, K. F. Properdin: initiation of alternative complement pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.72, n. 8, p.3220-4, 1975.

FRANCHIMONT, D. Overview of the actions of glucocorticoids on the immune response. A good model to characterize new pathways of immunosuppression for new treatment strategies. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.1024, p.124–137, 2004.

FORMAN, H.J.; TORRES, M. Reactive oxygen species and cell signaling: respiratory burst in macrophage signaling. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, New York, v.15, n.166, p. 4-8, 2002.

FONTEH, A. N.; MARION, C. R.; BARHAM, B. J.; EDENS, M. B.; ATSUMI, G.; SAMET, J. M.; HIGH, K. P.; CHILTON, F. H. Enhancement of mast cell survival: a novel function of some secretory phospholipase A(2) isotypes. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.167, n.8, p.4161-71, 2001.

GARCÍA-GARCÍA, R.; ROSALES, C. Signal transduction during Fc receptor-mediated phagocytosis. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v.72, p.1092-1108. 2002.

GRIFFIN, F. M. Jr.; GRIFFIN, J. A.; LEIDER, J. E.; SILVERSTEIN, S. C. Studies on the mechanism of phagocytosis. I. Requirements for circumferential attachment of particle-bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v.1, n.142(5), p.1263-82,1975.

GOMES, F.; RUIZ, P.; BRICENÕ, F.; LOPES, R.; MICHAN A. Treatment with progesterone analogues decreases macrophage Fc $\gamma$  receptors expression. **Clinical immunology and immunopathology**, New York, v.89, n.3, p.231-239, 1998.

GORDON, M. A.; EDWARDS, M. P.; TOMPKINS V. N. Refinement of fluorescent antibody by gel filtration. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, Malden, v.9, p. 96-99, 1962.

GORDON, S.; PERRY, V.H.; ROSEN, H. Plasma membrane receptors of the mononuclear phagocyte system. **Journal of Cell Science**, London, v.9, p.1-26, 1998. Supplement.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Oxygen free radicals and iron in relation to biology and medicine: some problems and concepts. **Archives of biochemistry and Biophysics**, New York, v.246, n.2, p.501-514, 1986.

HELMY, K. Y.; KATSCHKE, K. J. JR.; GORGANI, N. N.; KLJAVIN, N. M.; ELLIOTT, J. M.; DIEHL, L.; SCALES, S. J.; GHILARDI, N.; CAMPAGNE, M. L.. CRlg: A macrophage complement receptor required for phagocytosis of circulating pathogens. **Cell**, Cambridge, n.124, p.915–927, 2006.

HERRE, J.; GORDON, S.; BROWN, G. D. Dectin-1 and its role in the recognition of  $\beta$ -glucans by macrophage. **Molecular Immunology**, Oxford, v.40, p.869-76, 2004.

ILES, K. E.; FORMAN, H.J. Macrophage signaling and respiratory burst. **Immunology Research**, Amsterdam, v.26, n. 1-3, p.95-105, 2002.

INADA, M.; TOJO, H.; KAWATA, S.; TARUI, S. E.; OKAMOTO, M. Preferential distribution of group-II-like phospholipase A2 in mononuclear phagocytic cells in rat spleen and liver. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.197, n.2, p.323-9, 1991.

ISMAILI, N.; GARABEDIAN M. J. Modulation of glucocorticoid receptor function via phosphorylation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.1024, p. 86–101, 2004.

ITZHAKI, R. F.; GILL, D. M. A micro-biuret method for estimating proteins. **Annals Biochemistry**, Calcutta, v.9, p.401-10, 1964.

JONES, S. L.; LINDBERG, F. P.; BROWN E, J. Phagocytosis. In: Paul WE. 4ed. **Essays in Fundamental Immunology**, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1999.

KAHLER, C. P. Evaluation of the use of the solvent dimethyl sulfoxide in chemiluminescent studies. **Blood Cell, Molecules and Diseases**, Orlando, v.26, n. 6, p.626-633, 2000.

KARIMI, K.; LENNARTZ, M. R. Protein kinase C activation precedes arachidonic acid release during IgG-mediated phagocytosis, **Journal of Immunology**, Baltimore, v.155, p. 5786-5794, 1995.

KROL W, CZUBA Z, SCHELLER S, PARADOWSKI Z, SHANI J. Structure-activity relationship in the ability of flavonols to inhibit chemiluminescence. **Journal Ethnopharmacology**, Lausanne. V. 41, p.121-6, 1994.

KRAMER R.M.; HESSION C.; JOHANSEN B.; HAYES G.; MCGRAY P.; CHOW E. P.; TIZARD R. PEPINSKY R.B. Structure and properties of a human non-pancreatic phospholipase A2. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.5, n.264, p.5768-75, 1989.

KIZAKI, T.; YAMASHITA, H.; OH-ISHI, S.; DAY, N. K.; GOOD, R. A. e OHNO, H. Immunomodulation by cells of mononuclear phagocyte lineage in acute cold-stressed or cold-acclimatized mice. **Immunology**, Oxford, v.86, n.3, p.56-62. 1995. Erratum in: *Immunology*. v.87, n.4, p.668, 1996.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v.227, p.680-685, 1970.

LAY, W.H.; NUSSENZWEIG, V.  $Ca^{2+}$  - dependent binding of antigen 19S antibody complexes to macrophage. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v.223, p.1172, 1969.

LENNARTZ, M. R.; BROWN, E. J. Arachidonic acid is essential for IgG Fc receptor-mediated phagocytosis by human monocytes. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.15, n.147(2), p.621-6, 1991.

LENNARTZ, M.R.; LEFKOWITH, J.B.; BROMLEY, F.A.; BROWN, E.J. IgG-mediated phagocytosis activates a calcium- independent, phosphatidylethanolamine specific phospholipase. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v.54, p.389-398, 1993.

LENNARTZ, M. R. Phospholipases and phagocytosis: the role of phospholipid- derived second messengers in phagocytosis. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Amsterdam, v.31, p. 415-430. 1999.

LONG, F.; WANG Y. X.; LIU, L.; ZHOU J.; CUI, R. Y.; JIANG C. L. Rapid nongenomic inhibitory effects of glucocorticoids on phagocytosis and superoxide anion production by macrophages. **Steroids**, San Francisco, v.70, p. 55–61, 2005.

LUCISANO, Y. M.; MANTOVANI, B. Lysosomal enzyme release from polymorphonuclear leukocytes induced by immune complexes of IgM and of IgG. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.132, p.2015-20, 1984.

MANTOVANI, B. Phagocytosis on in vitro aged erythrocytes – a sharp distinction between activated and normal macrophage. **Experimental Cell Research**, New York, v.173, p.282-86, 1987.

MARSHALL, J. G; BOOTH, J. W.; STAMBOLIC V.; MAK, T; BALLA, T.; SCHREIBER, A. D.; MEYER, T. e GRINSTEIN, S. Restricted accumulation of phosphatidylinositol 3-kinase products in a plasmalemmal subdomain during Fc gamma receptor-mediated phagocytosis. **The Journal of Cell Biology**, New York, v.25, n.153(7), p.1369-80. 2001.

MARZOCCHI-MACHADO C. M.; LUCISANO-VALIM Y. M. Receptores para imunoglobulina G (Fc $\gamma$ R). **Medicina (Ribeirão Preto)**, v.38, n.1, p.82-95, 2005.

MONDAL S.; RAI U. Dose and time-related in vitro effects of glucocorticoid on phagocytosis and nitrite release by splenic macrophages of wall lizard *Hemidactylus flaviviridis*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C**, Oxford, n.13, p.2461–470, 2002.

MORANO, M. I.; VAZQUEZ, D. M.; AKIL, H. The role the hippocampal mineralocorticoid and glucocorticoid. Receptor in the hipothalamo-pituitary-adrenal axis of the aged fisher rat. **Molecular and cellular neurosciences**, San Diego, v.5, p.400-412, 1994.

MORGAN B.P. Physiology and pathophysiology of complement: progress and trends. **Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences**, Philadelphia, v.32, n.3, p.265-98, 1995.

MOREIRA, M. R.; KANASHIRO, A.; KABEYA, L. M.; POLIZELLO, A. C.; AZZOLINI, A. E.; CURTI, C.; OLIVEIRA, C. A.; T-DO AMARAL, A.; LUCISANO-VALIM, Y. M. Neutrophil effector functions triggered by Fc-gamma and/or complement receptors are dependent on B-ring hydroxylation pattern and physicochemical properties of flavonols. **Life Sciences**, Berlin, v. 4, n.81, p.317-26, 2007.

MULLER, H. K.; LUGG, D. J.; QUINN, D. Cell mediated immunity in antarctic wintering personnel. **Immunology and cell biology**, Adelaide, v.73, n.4, p.316-320, 1995.

MURAKAMI, M.; KUDO, I.; SUWA, Y. E.; INOUE, K. Release of 14-kDa group-II phospholipase A2 from activated mast cells and its possible involvement in the regulation of the degranulation process. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v.209, n.1, p.257-65. 1992.

NAKANO T.; OHARA O.; TERAOKA H.; ARITA H. Glucocorticoids suppress group II phospholipase A2 production by blocking mRNA synthesis and post-transcriptional expression. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.25, n.265, p. 2745 -8, 1990.

NETH, O.; JACK, D. L.; DODDS, A. W.; HOLZEL, H.; KLEIN, N.J.; TURNER, M. W.; Mannose-binding lectin binds to a range of clinically relevant microorganisms and promotes complement deposition. **Infection and immunity**, Washington, v.68, n.2, p.688-93, 2000.

NILSSON, E., HALLDH, G., MAGNUSSON, K. E., HEDT, J., PALMBLAD, J. In Vitro Effects of Ethanol on Polymorphonuclear Leukocyte Membrane Receptor Expression and Mobility. **Biochemical Pharmacology**, Berlin, v. 51, p. 225-231, 1996.

NUUTILA J.; LILIUS E.M. Flow cytometric quantitative determination of ingestion by phagocytes needs the distinguishing of overlapping populations of binding and ingesting cells. **Cytometry Part A**, Hoboken, v.65A, p.93-102, 2005.

OUCHTERLONY, O. Diffusion-in-gel methods for immunological assays. **Progress in Allergy**. Basel. v.15, p.1-78, 1958.

OLIVEIRA, C.A., KASHMAN, Y., MANTOVANI, B. Effects of lantruculin A on immunological phagocytosis and macrophage spreading-associate changes in F-actin/G-actin content of the cells. **Chemico Biological Interactions**, Amsterdam, v.100, p.141–153, 1996.

OLSSON, S.; SUNDLER R. The macrophage  $\beta$ -glucan receptor mediates arachidonate release induced by zymosan: Essential role for Src family kinases. **Molecular Immunology**, Oxford, v. 44, p.1509–1515, 2007.

ORDWAY, D.; VIVEIROS, M.; ARROZ, J.; MOLNAR, J.; KRISTIANSEN, E.; AMARAL, L. Chlorpromazine has intracellular killing activity against phagocytosed *Staphylococcus aureus*

at clinical concentrations. **Journal of infection and chemotherapy**, Tokyo, v.8, p.227–231, 2002.

PILLEMER L., BLUM L., LEPOW I.H., ROSS O.A., TODD E.W., WARDLAW A.C.; The properdin system and immunity. I. Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena. **Science**, Washington, v.20, n.120(3112), p.279-85, 1954.

POMPEIA, C.; CURY-BOAVENTURA, M. F., CURI, R. Arachidonic acid triggers and oxidative burst in leukocytes. **Brazilian journal of medical and biological research**, São Paulo, v.36, p.1549-1560, 2003.

RABINOVITCH, M. Professional and non-professional phagocytes: an introduction. **Trends in cell Biology**, Cambridge, v.5, p. 85-88, 1995.

RAVETCH J. V.; BOLLAND S. IgG Fc receptors. **Annual Review of Immunology**, Palo alto, v.19, p.275-90, 2001.

RAVETCH, J. V. A full complement of receptors in immune complex diseases. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v.110, p.1759–1761, 2002.

RICHERI, G. V.; OGATA, R. T. E.; KLEINFELD, A. M. A fluorescently labeled intestinal fatty acid binding protein. Interactions with fatty acids and its use in monitoring free fatty acids. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.267, n.33, p.23495-501, 1992.

RICHERI, G. V.; OGATA, R. T. E.; KLEINFELD, A. M. The measurement of free fatty acid concentration with the fluorescent probe ADIFAB: a practical guide for the use of the ADIFAB probe. **Molecular and Cellular Biochemistry**, The Hague, v.192, n.1-2, p.87-94, 1999.

ROBINSON B. S.; HII C. S.; FERRANTE A. Activation of phospholipase A2 in human neutrophils by polyunsaturated fatty acids and its role in stimulation of superoxide production. **The Biochemical Journal**, London , v.15, n.336, p. 611-7, 1998.

RODRIGUES, T; SANTOS. A.C.; PIGOSO, A.A.; MINGATTO, F. E.; UYEMURA, S. A.; CURTI, C. Thioridazine interacts with the membrane of mitochondria acquiring antioxidant activity toward apoptosis potentially implicated mechanisms. **British Journal of Pharmacology**, London, v.136, p.136-142, 2002.

ROSEN, G.M.; POU, S.; RAMOS, C.L.; COHEN, M.S.; BRITIGAN, B.E. Free radicals and phagocytic cells. **Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, Bethesda, v.9, n.2, p.200-9, 1995.

ROSS G.D.; REED W.; DALZELL J.G.; BECKER S.E.; HOGG N. Macrophage cytoskeleton association with CR3 and CR4 regulates receptor mobility and phagocytosis of iC3b-opsonized erythrocytes. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v.51, n.2, p.109-17, 1992.

ROUSSEAU, G. G. Control of gene expression by glucocorticoid hormones. **Biochemical Journal**, London, v.224, p. 1-12, 1984.

SAKATA A.; Ida E.; TOMINAGA M.; ONOUE K.; Arachidonic acid acts as an intracellular activator of NADPH-oxidase in Fc gamma receptor-mediated superoxide generation in macrophages. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.15, n. 38(12), p.4353-9, 1987.

SAMPATH P.; POLLARD T.D.; Effects of cytochalasin, phalloidin, and pH on the elongation of actin filaments. **Biochemistry**. Washington, v.19, n. 30, p.973-80, 1991.

SANTOS, R.I.M.; RODRIGUES, A. H.; SILVIA M. L.; MORTARA, R. A.; ROSSI M. A.; JAMUR M. C.; OLIVER C.; ARUJUDA E. Oropouche vírus entry into HeLa cells involves clathrin and requires endosomal acidification. **Virus Research**, Amsterdam, v.138, p. 139-143, 2008.

SCHWACHA, M. G.; GUDEWICZ, P. W.; SNYDER, J. A.; LOEGERING, D. J. Depression of macrophage respiratory *burst* capacity and arachidonic acid release after Fc receptor-mediated phagocytosis. **The Journal of Immunology**, Baltimore, v.150, n.1, p. 236-245, 1993.

SEILHAMER, J. J., PLANT, S. , PRUZANSKI, W. , SCHILLING, J. STEFANSKI, E., VADAS, P., JOHNSON, L. K. Multiple forms of phospholipase A2 in arthritic synovial fluid. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v.106, p.38-42, 1989.

SELYE, H. What is stress? **Metabolism**, New York, v.5, p.525-530, 1955.



SESTI-COSTA R. **Estresse agudo pelo frio na fagocitose de timocitos apoptóticos.** 2005. 97f. Dissertação (Mestrado em Imunologia) – Faculdade de medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, 2005.

STRATAKIS C. A.; CHROUSOS, G. P. Neuroendocrinology and pathophysiology of the Stress System. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.771; p.1-18, 1995.

SUZUKAWA, A. A. **Estudo dos padrões de ansiedade de camundongos e os efeitos do estresse na resposta hormonal e funções efetoras de macrófagos.** 2008. 104f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Faculdade de medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto – SP, 2008.

SUZUKI, T. Signal transduction mechanisms through Fc $\gamma$  receptors on the mouse macrophage surface. **Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology**. Bethesda, v.5, p. 187-193, 1991.

SURAM S.; BROWN G. D.; GHOSH M.; GORDON S.; LOPER R.; TAYLOR P. R.; AKIRA S.; UEMATSU S.; WILLIAMS D. L.; LESLIE C. C. Regulation of cytosolic phospholipase A2 activation and cyclooxygenase 2 expression in macrophages by the beta-glucan receptor. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 3, n.281, p.5506-14, 2006.

SZOKA, F; PAPAHADJOPOULOS, D. Formation of large unilamellar vesicles by reverse phase evaporation. **Proceedings of the National Academy of Sciences – U.S.A.**, Washington, v.75; p.4194-4198, 1978.

SWANSON, J. A.; BAER, S. C. Phagocytosis by zippers and triggers. **Trends in Cell Biology**. Cambridge, v.5, n.3, p. 89-93. 1995.

SWANSON, J. A.; HOPPE, D. The coordination of signaling during Fc receptor-mediated phagocytosis. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v. 76, p.1093-1103, 2004

TRIGGIANI, M.; GRANATA, F.; BALESTRIERI, B.; PETRAROLI, A.; SCALIA, G.; DEL VECCHIO, L.; MARONE, G. Secretory phospholipases A2 activate selective functions in human eosinophils. **Journal of Immunology**, Baltimore, v.15, n.170(6), p.3279-88, 2003.

TRIGGIANI, M.; GRANATA, F.; GIANNATTASIO, G.; MARONE G. Secretory phospholipases A2 in inflammatory and allergic diseases: not just enzymes. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, St Louis, v.16, n.5, p.1000-6, 2005.

TSONI, S. V.; BROWN, G.D.  $\beta$ -Glucans and Dectin-1. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.1143, p.45-60, 2008.

UNDERHILL, D. M.; OZINSKY, A. Phagocytosis of microbes: Complexity in Action. **Annual Review Immunology**. Palo Alto, v.20, p. 825 -52. 2002.

URSIN, H. Stress, distress, and immunity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v.741, n.204-11, 1994.

VAN DYKE, K.; CASTRANOVA, V. **Cellular chemiluminescence**. v.1. Boca Raton, CRC Press, 1987.

ZHAO, X.; BEY, E. A.; WIENTJES, F. B.; CATHCART, M. K. Cytosolic phospholipase A2 (cPLA2) regulation of human monocyte NADPH oxidase activity. cPLA2 affects translocation but not phosphorylation of p67(phox) and p47(phox). **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.12, n.277(28), p.25385-92, 2002.

WALPORT, M. J. Complement. First of two parts. **The New England journal of medicine**, Boston, v.344, n.14, p.1058-66. 2001.

WEBSTER, J. I.; TONELLI, L.; STERNBERG, E. M. Neuroendocrine Regulation of Immunity. **Annual review of immunology**, Palo alto, v.20, p.125-63, 2002.

WICK, G.; HU, Y.; SCHWARZ, S.; KROEMER, G. Immunoendocrine Communication via the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis in Autoimmune Diseases. **Endocrine Reviews**, Baltimore, v. 14, n.5, p.539- 563, 1993.

WAZIÈRES, B.; SPEHNER, V.; HARRAGA, S.; LAPLANTE, F.; CORALLO, F.; BLOY, C. H.; DUPOND, J. L.; VUITTON, D. A.; SEILLÈS E. Alteration in the production of free oxygen radicals and proinflammatory cytokines by peritoneal and alveolar macrophages in old mice and immunomodulatory effect of RU 41740 administration. **Immunopharmacology**, Amsterdam, v. 39, n.1, p. 51-9, 1998.

WRIGHT, G. C.; WEISS, J.; KIM, K. S.; VERHEIJ, H. E.; ELSBACH, P. Bacterial phospholipid hydrolysis enhances the destruction of Escherichia coli ingested by rabbit neutrophils. Role of cellular and extracellular phospholipases. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v.85, n.6, p.1925-35,1990.

WHITING, K. P.; RESTALL, C. J.; BRAIN P.F. Steroid hormone-induced effects on membrane fluidity and their potential roles in non-genomic mechanisms. **Life Sciences**, Berlin, v.67, p.743-757, 2002.

# 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](#)