

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**EFEITO DE LEUCOTRIENOS SOBRE O ESTADO DE
ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS DE
CAMUNDONGOS ESTRESSADOS**

GLADSTON ALVES NUNES

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia, como parte das
exigências para obtenção do título
de Mestre.

Botucatu, SP
Março – 2005

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

**EFEITO DE LEUCOTRIENOS SOBRE O ESTADO DE
ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS DE
CAMUNDONGOS ESTRESSADOS**

Mestrando: GLADSTON ALVES NUNES
Biólogo

Orientador: Prof. Dr. JOSÉ MAURÍCIO SFORCIN

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia, como parte das
exigências para obtenção do título
de Mestre.

Botucatu, SP
Março – 2005

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1	8
CONSIDERAÇÕES INICIAIS	9
Referências Bibliográficas	12
CAPÍTULO 2	14
EFEITO DE LEUCOTRIENOS SOBRE O ESTADO DE ATIVAÇÃO DE MACRÓFAGOS DE CAMUNDONGOS ESTRESSADOS.....	15
Resumo	15
Summary.....	16
Introdução.....	17
Material e Métodos	18
Resultados e Discussão	22
Referências.....	30
CAPÍTULO 3	33
IMPLICAÇÕES	34

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu orientador Prof. Dr. José Maurício Sforcin, um exemplo de dedicação à docência, que trabalhando sempre com entusiasmo e satisfação, procura ajudar a todos que o solicitam.

Obrigado pela valiosa orientação científica que muito contribuiu para meu amadurecimento pessoal e profissional.
Minha eterna admiração, gratidão e amizade.

“Não basta ensinar ao homem uma especialidade, porque ele se tornará assim uma máquina utilizável e não uma personalidade. É necessário que adquira um sentimento, um senso prático daquilo que vale a pena ser empreendido, daquilo que é belo, do que é moralmente correto.”

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À DEUS, que está sempre ao meu lado, dando-me coragem e perseverança para atingir meus objetivos.

Aos meus queridos pais pela confiança e apoio em todas as etapas de minha vida. Ao meu pai, pela eterna admiração e amizade. À minha mãe, meu eterno exemplo de amor e companheirismo.

À minha amada noiva Mônica pelo carinho, companheirismo, incentivo e apoio incondicional durante esta minha caminhada.

Ao meu futuro sogro e futura sogra pela confiança, carinho e principalmente pela amizade.

“Se não fosse vocês, eu andaria a caminho do nada pra lugar nenhum.

Eu erraria por entre vagas abertas, sobre páginas incertas de um pobre verso comum.

Se não fosse vocês, eu perderia a noção do sol e do vento, de todo e qualquer elemento que me induzisse à beleza.

Se não fosse vocês, eu ficaria presa na trama dos desafetos dos amores incompletos que o mundo encaixa nos cantos.

Se não fosse vocês, triste seria.

Que seria de mim, se não fosse vocês?”

(Flora Figueiredo)

“Aquele que vê as coisas crescerem desde o princípio terá delas a melhor visão.”

(Aristóteles, 384-322 a.C.)

“Se pude ver mais longe, foi por ter-me apoiado em ombros de gigantes.”

(Isaac Newton, 1648-1727)

AGRADECIMENTOS

Aos meus queridos amigos Fabiane Missima e Ricardo de Oliveira Orsi pelo auxílio, compreensão e amizade;

Aos professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia, do Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu, pela constante atenção e sugestões;

À Profa. Dra. Ângela Maria Victoriano de Campos Soares pela amizade, bem como pelas valiosas sugestões na elaboração desta dissertação;

Aos professores e alunos do curso de Pós-Graduação em Zootecnia, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP, Campus de Botucatu, pelos conhecimentos adquiridos durante esses anos e pela amizade;

Aos professores Dra. Denise Rangel da Silva Sartori e Dra. Maria de Lourdes Mendes Vicentini Paulino pelas valiosas sugestões, simpatia e delicadeza durante o exame de qualificação;

À Profa. Dra. Lúcia Helena Faccioli, pela amizade, bem como por ter cedido gentilmente o composto MK 886;

Ao Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes, pela cuidadosa leitura da dissertação, bem como pelo apoio nos momentos de utilização do MK 886;

Ao Prof. Dr. Silvio Luis de Oliveira, pela amizade e auxílio nos momentos de coleta de sangue dos animais;

Aos colegas mestrandos e doutorandos do Departamento de Microbiologia e Imunologia, pela amizade e auxílio;

À Carmem Silvia de Oliveira Pólo e Seila Cristina Cassineli, funcionárias da Pós-Graduação, pelo auxílio, paciência e amizade;

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Maria de Lourdes Alves, Luiz H. Alquati, Leonice A. Garcia, Sônia M. Faraldo, Luiz Severino, por toda dedicação, auxílio e principalmente pela amizade;

Aos funcionários da Biblioteca de Rubião Júnior e Lageado pelo auxílio e amizade;

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Ensino Superior), pela concessão da bolsa;

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização dessa dissertação.

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

Estresse pode ser entendido como uma condição em que a homeostase do organismo é perturbada, envolvendo a participação de diferentes sistemas do organismo, em resposta a agentes estressores, como infecções, fatores climáticos, hiperpopulação, exercício físico intenso, desnutrição, ruído, odor, entre muitos outros (SELYE, 1978).

O estresse possui conotação negativa, embora seja um evento natural, sendo um estímulo para alguns organismos ou uma ameaça para outros. A crescente complexidade social também tem contribuído com o aparecimento de tensão psicológica e doenças relacionadas ao estresse, como depressão, ansiedade, pânico, câncer, úlceras, entre outras (LEONARD & SONG, 1996). Como fatores estressogênicos da vida moderna, temos a pressão da globalização e tecnologia, desemprego, competição profissional e maior carga horária de trabalho, relações interpessoais instáveis, preocupação financeira persistente, entre outros fatores mais impactantes, como morte, acidentes e doenças graves (GERRA *et al.*, 2003).

A Imunoneuroendocrinologia ou Psiconeuroimunologia tem estudado a relação entre os sistemas imune, nervoso e endócrino. PALERMO-NETO *et al.* (2003) verificaram que estressores físicos e psicológicos atuam no comportamento e na resposta imune de camundongos.

O estresse agudo está mais relacionado a uma ameaça imediata ou situação experienciada como perigo, a curto prazo. Após o 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, preparando também o sistema imune para os desafios impostos pelo agente estressor. Por outro lado, o estresse crônico, que dura dias, meses ou anos, pode 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 macrofágica e proliferação de linfócitos (DHABHAR, 2002).

Agentes estressores podem induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias (MAES *et al.*, 1998). Muitos eventos inflamatórios são controlados por citocinas ou por outros mediadores. Assim, sob estímulos estressogênicos, o ácido araquidônico (AA) pode ser liberado por ação direta da fosfolipase A2 sobre os fosfolipídios de membrana, e, por cicloxigenação e lipoxigenação enzimáticas, são produzidos prostaglandinas e leucotrienos, respectivamente.

Leucotrienos são mediadores lipídicos derivados dos metabólitos do ácido araquidônico, pela via da 5-lipoxigenase (5-LO), sendo potentes quimioatraentes para neutrófilos e eosinófilos, e liberados após ativação celular por patógenos ou mediadores solúveis. Estes fatores produzem um distúrbio da membrana celular e levam ao aumento de cálcio intracelular, resultando na translocação de fosfolipase A2 citosólica para as membranas nuclear e plasmática. Este processo culmina na liberação do AA dos fosfolipídios de membrana, originando, após sua metabolização, prostaglandinas, tromboxanas, lipoxinas, ácidos hidroperoxieicosatetraenóicos e leucotrienos, substâncias chamadas coletivamente de eicosanóides (PETERS-GOLDEN & BROCK, 2001).

A literatura sugere um importante papel de leucotrienos na ativação celular e regulação da atividade microbicida de fagócitos, e conseqüentemente, na proteção do hospedeiro contra diferentes agentes infecciosos. Leucotrienos têm importante função no controle da replicação do vírus da estomatite vesicular (CHEN *et al.*, 2001), nos mecanismos de defesa contra a infecção pelo *Histoplasma capsulatum* (MEDEIROS *et al.*, 2004) e na destruição do *Mycobacterium bovis* por polimorfonucleares (COFFEY *et al.*, 2004).

Além do papel imunomodulador de leucotrienos na síntese de citocinas e quimiocinas, sabe-se que esses mediadores lipídicos contribuem para a produção de óxido nítrico (NO), o qual é importante para o controle da replicação de diferentes agentes infecciosos como fungos, bactérias e vírus (DREW & LEEUWENBURGH, 2002). TALVANI *et al.* (2002) descreveram que leucotrienos

induzem produção de NO por macrófagos peritoneais de animais infectados com *Trypanossoma cruzi* de maneira dose e tempo dependente.

Estudos utilizando antagonistas, inibidores da síntese de leucotrienos, sugerem importante papel imunomodulatório de leucotrienos na síntese de diferentes mediadores nos processos infecciosos (PETERS-GOLDEN & COFFEY, 1998). Trabalhos recentes demonstraram que inibidores de ativação da 5-LO (MK 886) e antagonistas de leucotrienos bloqueiam a ativação de quinases associadas ao receptor de leucotrienos, impedindo a fosforilação da fosfolipase A2 citosólica e a liberação de ácido araquidônico.

O MK 886 é um potente inibidor da síntese de leucotrienos, tanto *in vivo* como *in vitro*, não tendo efeito em outras vias do ácido araquidônico. Sua ação se dá na translocação da 5-LO e bloqueio de sua subsequente ativação, evitando assim a biossíntese celular deste metabólito (ROUZER *et al.*, 1990).

Considerando que o estresse modula a resposta imune e que leucotrienos são produzidos durante o estresse, projetos devem avaliar esse mediador sobre as alterações decorrentes da síndrome de adaptação ao estresse. Para tal, a investigação do efeito do composto MK 886 durante o estresse levou ao desenvolvimento desta dissertação, e o tema foi tratado em 2 capítulos.

O Capítulo 2, denominado “Efeito de um inibidor de leucotrienos sobre o estado de ativação de macrófagos de animais estressados”, apresenta-se de acordo com as normas para publicação na revista **Physiology & Behavior**.

O capítulo 3 apresenta as implicações decorrentes da realização deste trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHEN, N., RESTIVO, A., REISS, C.S. Leukotrienes play protective roles early during experimental VSV encephalitis. **J. Neuroimmunol.**, v. 120, p. 94-102, 2001
- COFFEY, M.J., PHARE, S.M., PETERS-GOLDEN, M. Role of leukotrienes in killing of *Mycobacterium bovis* by neutrophils. **Prostaglandins, leukotriens and essential fat acids**, v. 71, p. 185-90, 2004
- DHABHAR, F.S. Stress-induced augmentation of immune function – the role of stress hormones, leukocyte trafficking, and cytokines. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 16, p. 785-98, 2002
- DREW, B., LEEUWENBURGH, C. Aging and the role of reactive nitrogen species. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v. 959, p. 66-81, 2002
- GERRA, G., MONTI, D., PANERAI, A.E., SACERDOTE, P., ANDERLINI, R., AVANZINI, P., ZAIMOVIC, A., BRAMBILLA, F., FRANCESCHI, C. Long-term immune-endocrine effects of bereavement: relationships with anxiety levels and mood. **Psychiatry Res.**, v. 121, p. 145-58, 2003
- LEONARD, B.E., SONG, C. Stress and the immune system in the etiology of anxiety and depression. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 54, n. 1, p. 299-303, 1996
- MAES, M., SONG, C., LIN, A., De JONGH, R., GASTEL, A.V., KENIS, G., BOSMANS, E., De MEESTER, I., BENOY, I., NEELS, H., DEMEDTS, P., JANCA, A., SCHARPÉ, S., SMITH, R.S. The effects of psychological stress on humans: increased production of pro-inflammatory cytokines and a Th1-like response in stress-induced anxiety. **Cytokine**, v. 10, p. 313-8, 1998
- MEDEIROS, A.I., SÁ-NUNES, A., SOARES, E.G., PERES, C.M., SILVA, C.L., FACCIOLI, L.H. Blockade of endogenous leukotrienes exacerbates pulmonary histoplasmosis. **Infection and Immunity**, v. 72, p.1637-44, 2004

- PALERMO-NETO, J., MASSOCO, C.O., SOUZA, W.K. Effects of physical and psychological stressors on behavior, macrophage activity, and Ehrlich tumor growth. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 17, p. 43-54, 2003
- PETERS-GOLDEN, M., COFFEY, M.J. Review: Role of leukotrienes in antimicrobial defense of the lung. **J. Lab. Clin. Med.**, v. 132, p. 251-7, 1998
- PETERS-GOLDEN, M., BROCK, T.G. Intracellular compartmentalization of leukotriene synthesis: unexpected nuclear secrets. **FEBS Letters**, v. 487, p. 323-6, 2001
- ROUZER, C.A., FORD-HUTCHINSON, A.W., MORTON, H.E., GILLARD, J.W. MK 886, a potent and specific leukotriene biosynthesis inhibitor blocks and reverses the membrane association of 5-lipoxygenase in ionophore-challenged leukocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 265, p. 1436-42, 1990
- SELYE, H. The stress of life. McGraw-Hill Book Co.: New York, 1978
- TALVANI, A., MACHADO, F.S., SANTANA, G.C., KLEIN, A., BARCELOS, L., SILVA, J.S., TEIXEIRA, M.M. Leukotriene B(4) induces nitric oxide synthesis in *Trypanosoma cruzi*-infected murine macrophages and mediates resistance to infection. **Infect. Immun.**, v. 70, p. 4247-53, 2002

CAPÍTULO 2

“Efeito de um inibidor de leucotrienos sobre o estado de ativação de macrófagos de animais estressados”.

Resumo

O estresse compreende uma multiplicidade de eventos, envolvendo o sistema imune e ativação do sistema nervoso autônomo, bem como a ativação do eixo hipotálamo-pituitária-adrenal, com conseqüente aumento de catecolaminas e glicocorticóides, respectivamente. Além do papel imunomodulador dos leucotrienos na síntese de citocinas, este mediador contribui para a produção de óxido nítrico (NO), o qual é importante no controle da replicação de fungos, bactérias e vírus. Estudos sobre a participação de leucotrienos e intermediários reativos do oxigênio contribuem para uma melhor compreensão da resposta imune durante o estresse. O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação de um inibidor de leucotrienos (MK 886), *in vivo* e *in vitro*, sobre o estado de ativação de macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c submetidos a estresse por imobilização, determinando a produção de intermediários reativos do oxigênio (H_2O_2) e do nitrogênio. Animais submetidos a estresse agudo ou crônico não apresentaram alterações significativas na produção de H_2O_2 e NO. Entretanto, macrófagos de animais submetidos a estresse agudo ou crônico e estimulados *in vitro* com MK 886 apresentaram inibição na geração de NO. Animais submetidos a estresse crônico e tratados com MK 886 apresentaram elevação na geração de H_2O_2 e inibição na produção de NO. Nossos resultados sugerem um importante papel dos leucotrienos quanto à síntese de NO, o qual é importante no controle da replicação de agentes infecciosos, principalmente em animais estressados e imunossuprimidos.

Palavras-chave: estresse, macrófagos, leucotrienos, peróxido de hidrogênio, óxido nítrico, MK 886

“Effect of a leukotrienes inhibitor on macrophages activation of stressed mice”.

Summary

Stress comprises a great variety of events involving the immune system and the central nervous system, providing evidence for autonomic pathways and endocrine modulation of the immune response following stress exposure. Besides the immunomodulatory role of leukotrienes in cytokines synthesis, this mediator contributes for nitric oxide (NO) production, which is important to the control of fungi, bacteria and virus replication. Studies regarding the involvement of leukotrienes and oxygen (H_2O_2) and nitrogen intermediates contribute for a better comprehension of the immune response during stress. The objectives of this research were to evaluate peritoneal macrophages activation as well as to observe the effect of a leukotrienes inhibitor (MK 886) in mice submitted to immobilization stress. Mice submitted to acute or chronic stress showed no alterations in H_2O_2 and NO production. However, macrophages of acute or chronic stressed-mice and stimulated *in vitro* with MK 886 showed NO inhibition. Chronically stressed-mice treated with MK 886 showed an increase in H_2O_2 generation and inhibited NO production. Our data suggest an important role of leukotrienes with regards to NO synthesis, which is important to control several infectious agents replication, mainly in stressed and immunosuppressed animals.

Key-words: stress, macrophages, leukotrienes, hydrogen peroxide, nitric oxide, MK 886

1. Introdução

O estresse compreende uma multiplicidade de eventos, desencadeados por um agente estressor, ativando uma resposta fisiológica no organismo, conhecida como reação de luta ou fuga (DHABHAR, 2002). Dentre os agentes considerados estressores, temos ruído, desnutrição, fatores climáticos, exercício físico intenso, hiperpopulação, choque, entre muitos outros (KIOUKIA-FOUGIA *et al.*, 2002).

A resposta ao estresse resulta em liberação de neurotransmissores, citocinas e hormônios, havendo alterações metabólicas, endócrinas e imunes associadas ao eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) e ao sistema nervoso autônomo (KIOUKIA-FOUGIA *et al.*, 2002).

O estresse agudo apresenta efeitos imunoestimulantes, enquanto que o crônico pode provocar imunossupressão (MASTORAKOS & ILIAS, 2000).

Durante o estresse, a resposta imune celular é mais afetada, em relação à imunidade humoral. Alguns autores têm demonstrado que o estresse pode afetar o padrão Th1/Th2 de resposta, direcionando-o mais para Th2, sob ação de glicocorticóides e catecolaminas (ELENKOV & CHROUSOS, 1999).

Agentes estressores podem induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias (MAES *et al.*, 1998). Muitos eventos inflamatórios são controlados por citocinas ou por outros mediadores. Assim, o ácido araquidônico pode ser liberado por ação direta da fosfolipase A2 sobre os fosfolipídios de membrana, e, por cicloxigenação e lipoxigenação enzimáticas, são produzidos prostaglandinas e leucotrienos, respectivamente. Leucotrienos são mediadores lipídicos derivados dos metabólitos do ácido araquidônico, pela via da 5-lipoxigenase (5-LO), sendo potentes quimioatraentes para neutrófilos e eosinófilos, e liberados após ativação celular por patógenos ou mediadores solúveis (PÉTERS-GOLDEN & BROCK, 2001). O MK 886 é um potente inibidor da síntese de leucotrienos, tanto *in vivo* como *in vitro*, não tendo efeito em outras vias do ácido araquidônico. Sua ação se dá na translocação da 5-LO e bloqueio de sua subsequente ativação, evitando assim a biossíntese celular deste metabólito (ROUZER *et al.*, 1990).

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito dos leucotrienos sobre o estresse agudo e crônico sobre a produção de H_2O_2 e NO por macrófagos incubados ou não com MK 886 *in vitro*. Foi avaliado também o estado de ativação de macrófagos de camundongos submetidos a estresse crônico e tratados diariamente com MK 886.

2. Material e Métodos

Este projeto está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela Câmara de Ética em Experimentação Animal, FMVZ, UNESP, Campus de Botucatu.

2.1. Animais e indução do estresse

Foram utilizados camundongos machos da linhagem isogênica BALB/c, com peso médio de 15-20 g e aproximadamente 6 semanas de idade, mantidos no Departamento de Microbiologia e Imunologia, IB, UNESP, Campus de Botucatu.

Para indução do estresse agudo, os animais foram submetidos a estresse por imobilização em tubo PVC (12 cm de comprimento e 3 cm de diâmetro, com capacidade ~ 50 mL), aerado, por 2 horas (DHABHAR & McEWEN, 1999).

Para indução do estresse crônico, os animais foram submetidos ao mesmo protocolo, por 15, 30, 45, 60, 75, 90 e 120 minutos diariamente durante 7 dias consecutivos. Este procedimento foi de fácil manipulação e não provocou dor física nos animais (DOMÍNGUEZ-GERPE & REY-MÉNDEZ, 2001).

2.2. Composto MK 886 – inibidor da síntese de leucotrienos

Composto MK 886 ou L-663,536 (3 [1-(4-clorobenil)-3-t-butil-tio-5-isopropilindol-2-yl]-2,2-ácidodimetilpropanóico), doado pela Merck Frosst, Canada Inc, foi diluído segundo instruções do fabricante, em 100 μ L de etanol absoluto e acrescido de água, de modo a se obter a solução de tratamento (MEDEIROS *et al.*, 2004).

2.3. Ensaios *in vitro* e *in vivo* com MK 886

Nos ensaios *in vitro*, camundongos foram submetidos a estresse agudo ou crônico (n = 8) e, após indução do estresse, macrófagos peritoneais foram incubados por 24 h com MK 886, nas seguintes concentrações: 1 e 10 μ M (MANCUSO *et al.*, 1998).

Para avaliação do efeito *in vivo* do MK 886 durante o estresse crônico, os animais foram divididos em 4 grupos (G1, G2, G3 e G4), de 8 animais. O grupo G1 foi considerado controle, e foi tratado com 0,5 mL de solução fisiológica (NaCl 0,9%). G2 foi submetido a estresse por imobilização, sendo tratado também com 0,5 mL de solução fisiológica. G3 foi tratado diariamente com o composto MK 886 – inibidor da síntese de leucotrienos (5 mg/kg em 0,5 mL), por via oral (MEDEIROS *et al.*, 2004). O grupo G4 foi submetido a estresse e tratado com MK 886, momentos antes da indução do estresse, seguindo o mesmo protocolo. Durante o estresse, os grupos ficaram sem água e ração. Após 24 h dos respectivos tratamentos, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical.

2.4. Obtenção de macrófagos peritoneais

Os animais foram colocados em câmara asséptica de fluxo laminar e fixados em decúbito dorsal, em suporte de dissecação. A parede abdominal foi exposta, rebatendo-se a pele da região.

Macrófagos peritoneais de camundongos foram obtidos após a injeção de 3 a 5 mL de PBS gelado na cavidade abdominal. Após massagear o abdomen levemente por 30 segundos, o líquido peritoneal foi coletado e colocado em tubo plástico Falcon. Este procedimento foi repetido 3 a 4 vezes e, em seguida, os tubos foram centrifugados a 1500 rpm, por 10 minutos. As células foram ressuspensas em 1 mL de meio completo para cultura de células (meio RPMI 1640, suplementado com 10% de soro bovino fetal, 2 mM de L-glutamina, 20 mM de HEPES), e a suspensão celular ajustada para 2×10^6 células/mL. 100 μ L destas suspensões foram distribuídos em placas de microcultura, com posterior incubação a 37° C em tensão de 5% de CO₂. Após 2 horas, as células não-

aderentes foram removidas, e os macrófagos aderidos foram incubados novamente, a 37°C por 24 h.

2.5. Avaliação do estado de ativação de macrófagos

2.5.1. Determinação da produção de reativos intermediários do oxigênio (H_2O_2)

A produção de H_2O_2 por macrófagos foi determinada através da microtécnica de oxidação do vermelho fenol (PICK & MIZEL, 1981).

Os sobrenadantes das culturas foram coletados para a determinação da produção de óxido nítrico e as células utilizadas para a determinação de H_2O_2 . As células foram ressuspensas ao volume original em solução de vermelho fenol, contendo 140 mM de NaCl; 10 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,0; 5,5 mM de dextrose de raiz forte tipo II (0,01 mg/ml). A reação foi interrompida após 1 hora, pela adição de 10 μ L de NaOH 1N. As amostras foram efetuadas em triplicatas.

A absorbância foi determinada em microleitor de ELISA automático, com filtro de 620 nm, sendo o branco constituído de solução de vermelho fenol e NaOH. Os resultados foram expressos em nmoles de H_2O_2 / 2×10^5 células, a partir da curva padrão estabelecida em cada ensaio, constituída de concentrações molares conhecidas de H_2O_2 em tampão vermelho fenol.

2.5.2. Determinação da produção de intermediários reativos do nitrogênio (NO)

O óxido nítrico decompõe-se, em meio de cultura, em nitritos (NO_2^-) e nitratos (NO_3^-). A produção de NO_2^- por macrófagos foi determinada por método colorimétrico, baseado na reação de Griess (GREEN *et al.*, 1981), combinando 100 μ L do sobrenadante da amostra teste com 100 μ L do reagente de Griess (Need 0,1% e sulfanilamida 1% em H_3PO_4 5%), por 10 minutos à temperatura

ambiente. As amostras foram lidas em leitor de ELISA, em 540 nm. Os resultados foram expressos em μmoles de NO / 2×10^5 células, comparando-se a densidade óptica com a curva padrão de NO_2^- , realizada junto com o experimento.

2.6. Avaliação dos níveis séricos de glicose e corticosterona

Antes do sacrifício dos animais, o sangue foi coletado do plexo retro-orbital e, para avaliação de indicadores do estabelecimento do estresse, o soro foi utilizado imediatamente para determinação da concentração de glicose (Accutrend®). O soro foi congelado a -20°C e a corticosterona foi determinada por radioimunoensaio, utilizando kits comerciais (Coat-A-count®).

2.7. Análise estatística

Os procedimentos estatísticos foram realizados com o auxílio do software Graph Pad, San Diego, CA, USA (GODFREY, 1985). Diferenças significativas entre os diversos tratamentos foram determinados por Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de comparações múltiplas pelo método de Tukey-Kramer, com o cálculo da diferença mínima significativa para $\alpha = 0,05$. Para análise da concentração de glicose e corticosterona, foi utilizado o teste t de Student.

3. Resultados e discussão

Considerando que a glicemia tem sido utilizada como indicador de estresse (KIOUKIA-FOUGIA *et al.*, 2002), a concentração sérica de glicose foi determinada após indução do estresse crônico. Conforme observado na figura 1, animais estressados apresentaram valores glicêmicos superiores ao grupo controle, embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa. Trabalhos experimentais de KIOUKIA-FOUGIA *et al.* (2002) também não evidenciaram aumento na glicemia de animais submetidos a três modelos diferentes de estresse. Este fato pode ser explicado em virtude de o nível de glicose aumentar rapidamente após o estresse agudo, e nem sempre manter-se elevado após longo período de indução de estresse.

A ativação do eixo HPA tem um papel importante nas respostas comportamentais e imunológicas observadas normalmente durante o estresse. Entretanto, não houve diferença quanto à concentração sérica de corticosterona em animais estressados, embora tenha sido mais elevada em relação ao controle ($p>0,05$) (figura 1). AZPIROZ *et al.* (1999) também não encontraram diferenças quanto à concentração de corticosterona em camundongos estressados cronicamente, sugerindo uma resposta adaptativa do eixo HPA na presença prolongada de altas concentrações de glicocorticóides.

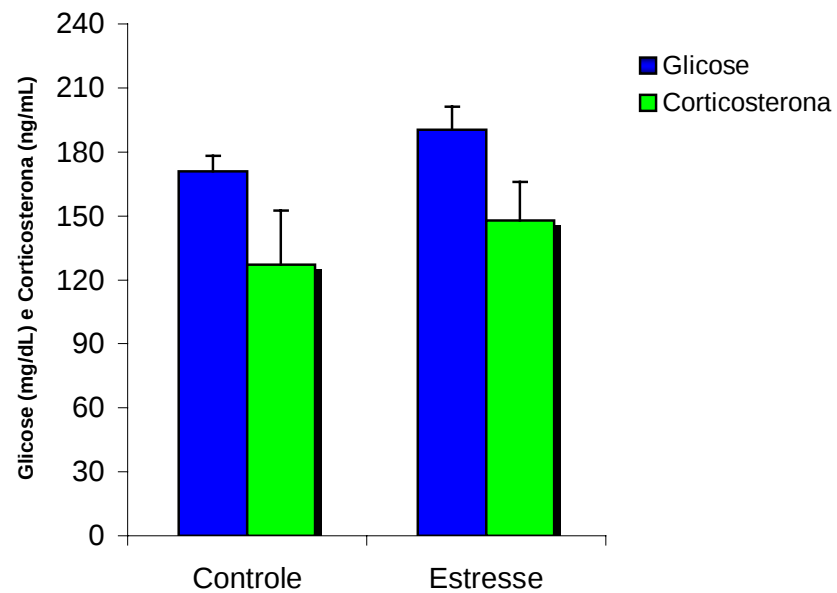


Figura 1. Concentração sérica de glicose (mg/dL) e corticosterona (ng/mL) de camundongos submetidos a estresse crônico. Resultados representam a média $\pm$ desvio-padrão de 8 animais.

A produção de intermediários reativos do oxigênio está relacionada com a atividade microbicida de macrófagos, estando sob controle da oxidase do fagócito (phox) – um complexo proteico de multi-subunidades associado à membrana do fagossoma (RIBER & LIND, 1999).

Um outro importante mecanismo microbicida de macrófagos é a produção de intermediários reativos do nitrogênio. O óxido nítrico é derivado da L-arginina e sintetizado por ação da enzima NO sintase. O NO é responsável pela inibição da síntese de DNA e da respiração mitocondrial em vários tipos celulares, sendo também capaz de inibir o transporte ativo na membrana de fungos e bactérias (MACFARLANE *et al.*, 1999).

Observamos que não houve diferenças significativas quanto à produção de H₂O₂ por animais submetidos a estresse agudo em relação ao controle (figura 2A). Por outro lado, níveis mais elevados na produção de NO foram detectados em animais submetidos a estresse agudo, embora este aumento não tenha sido estatisticamente significativo (figura 2B).

Observamos que não houve efeito do MK 886 *in vitro* sobre a produção de H₂O₂ por macrófagos peritoneais de camundongos submetidos a estresse agudo. Entretanto, observou-se inibição na produção de NO quando essas células foram incubadas na presença deste composto (10 µM) (figura 2B).

Estes resultados demonstram o envolvimento dos leucotrienos sobre o estado de ativação de macrófagos, em animais submetidos a estresse.

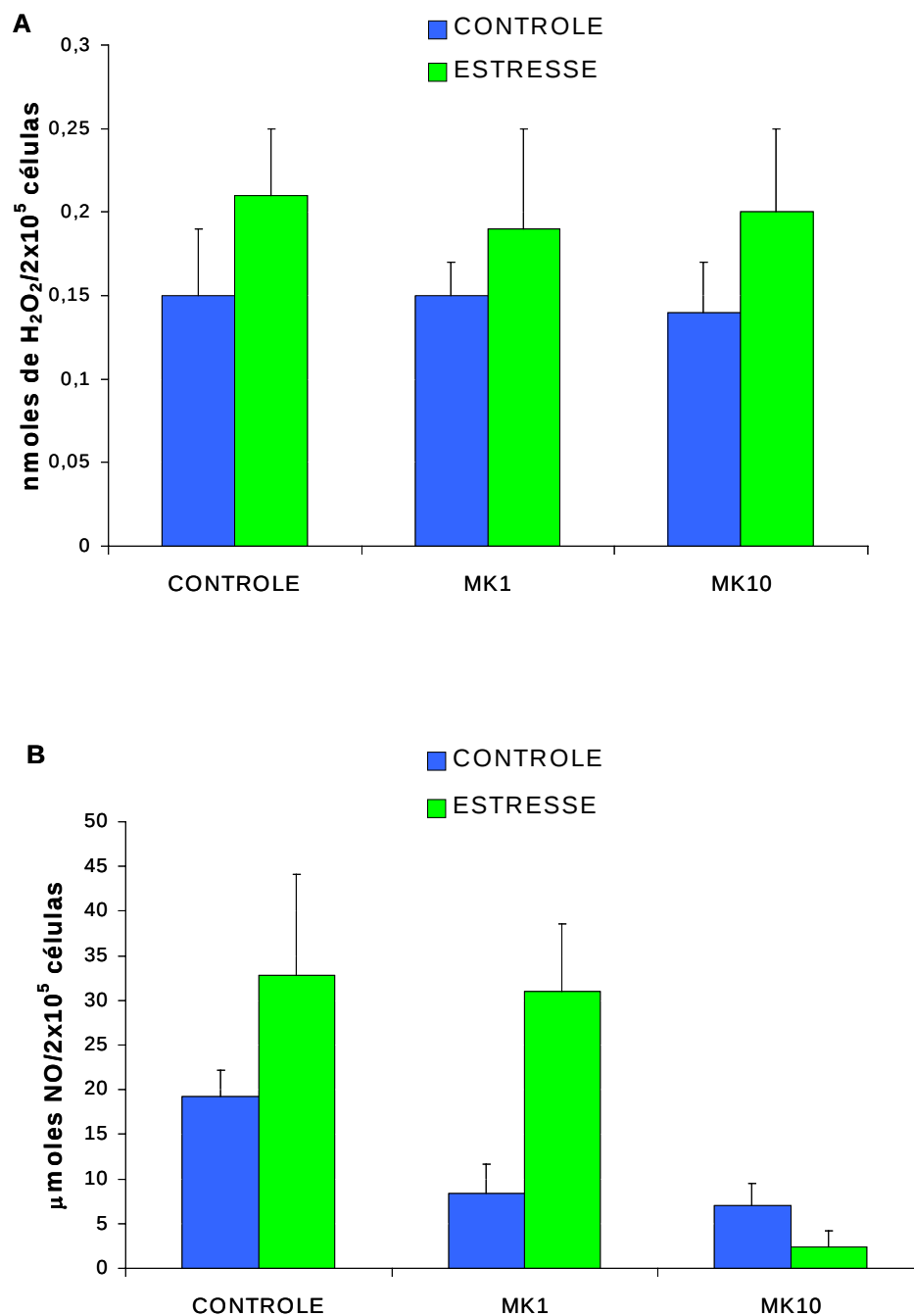


Figura 2. Produção de H_2O_2 (nmols/2x10⁵ células) (A) e NO (μ moles/2x10⁵ células) (B) por macrófagos peritoneais de camundongos submetidos a estresse agudo e incubados com MK 886 (1 e 10 μ M): ensaios *in vitro*. Resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de 8 animais.

Tem sido relatado que o estresse agudo apresenta efeito imunoestimulante, enquanto que o crônico pode provocar imunossupressão (DHABHAR & McEWEN, 1999; MASTORAKOS & ILIAS, 2000). Assim, investigamos o efeito do estresse induzido por imobilização durante 7 dias consecutivos.

Observamos que os animais submetidos a estresse crônico apresentaram elevação na produção de H_2O_2 em relação ao controle, de maneira não significativa. Quando os camundongos foram tratados diariamente com MK 886, houve aumento significativo na produção de H_2O_2 ($p < 0,05$). Animais submetidos a estresse e tratados concomitantemente com MK 886 apresentaram potencialização na produção de H_2O_2 (figura 3A).

Com relação à geração de NO por macrófagos peritoneais de camundongos, não houve alteração na produção deste metabólito entre os grupos controle e estressados. Por outro lado, animais tratados somente com MK 886 apresentaram inibição na produção de NO. Da mesma forma, animais estressados e tratados por 7 dias consecutivos com MK 886 também apresentaram diminuição na geração deste intermediário reativo do nitrogênio (figura 3B).

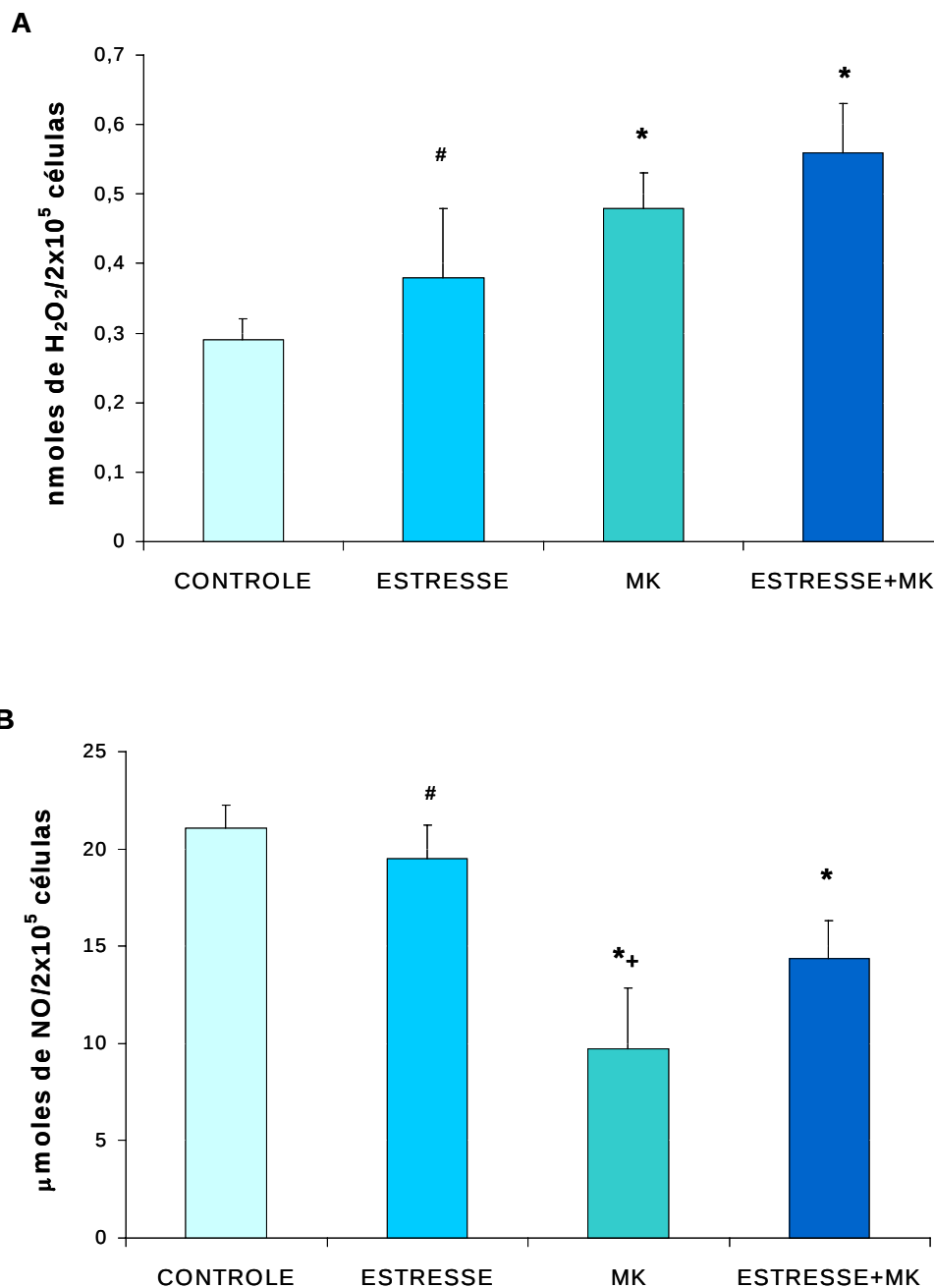


Figura 3. Produção de H_2O_2 (nmols/ 2×10^5 células) (A) e NO (μ moles/ 2×10^5 células) (B) por macrófagos peritoneais de camundongos submetidos a estresse crônico e tratados com MK 886 (5 mg/kg): ensaios *in vivo*. Resultados representam a média $\pm$ desvio padrão de 8 animais.

A: # significativamente diferente do estresse + MK

* significativamente diferente do controle

B: * significativamente diferente do controle

+ # significativamente diferente do estresse + MK

Animais submetidos a estresse crônico não apresentaram diferenças significativas quanto à produção de H_2O_2 (figura 4A). Por outro lado, houve inibição significativa quanto à produção de NO por macrófagos peritoneais de camundongos estressados ou não cronicamente (figura 4B). MK 886 não apresentou efeito *in vitro* sobre a produção de NO no grupo controle. Trabalhos recentes descreveram que a ausência de leucotrienos pode modular a síntese de NO, uma vez que este metabólito do ácido araquidônico contribui para a produção de óxido nítrico, controlando a replicação de diferentes microrganismos como fungos, bactérias e vírus (DREW & LEEUWENBURGH, 2002).

Podemos também observar que, no grupo estressado, as células incubadas *in vitro* com MK 886 nas concentrações 1 e 10 μ M apresentaram níveis mais baixos na produção deste metabólito em relação ao grupo controle, porém similar ao controle do grupo estressado (figura 4B).

Tem sido sugerido que o MK 886 diminui a produção de NO (CHEN *et al.*, 2001). Nossos resultados concordam com a afirmação destes autores, visto que houve inibição na produção de NO em nossos ensaios quando utilizamos MK 886 tanto *in vitro* como *in vivo*.

Leucotrienos induzem produção de NO, o qual é um potente mecanismo de destruição de vários patógenos intracelulares. Considerando que o MK 886 inibiu a produção de NO tanto *in vitro* como *in vivo*, pode-se sugerir que esta droga inibiu a ação dos leucotrienos, que deveriam estar em concentração elevada, em virtude da ação de citocinas pró-inflamatórias geradas durante o estresse.

Nossos resultados sugerem um importante papel dos leucotrienos quanto à síntese de óxido nítrico, o qual é importante no controle da replicação de agentes infecciosos, principalmente em animais estressados e imunossuprimidos.

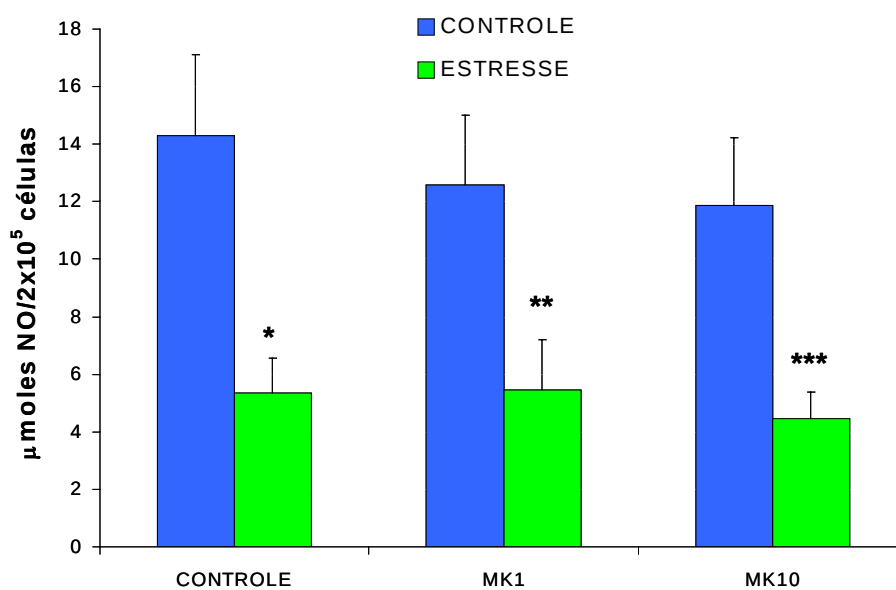
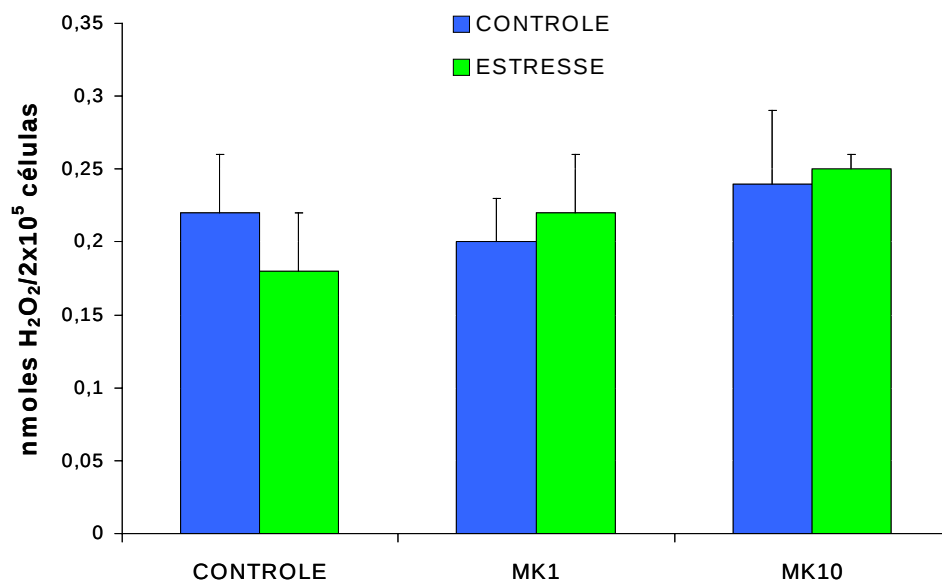


Figura 4. Produção de H_2O_2 (nmoles/2x10⁵ células) (A) e NO (μmoles/2x10⁵ células) (B) por macrófagos peritoneais de camundongos submetidos a estresse crônico e incubados com MK 886 (1 e 10 μM): ensaios *in vitro*. Resultados representam a média ± desvio padrão de 8 animais.
 * significativamente diferente do controle-controle
 ** significativamente diferente do controle-MK1
 *** significativamente diferente do controle-MK10

Referências

- Azpiroz, A., Fano, E., Garmendia, L., Arregi, A., Cacho, R., Beitia, G., Brain, P.F. Effects of chronic mild stress (CMS) and imipramine administration, on spleen mononuclear cell proliferative response, serum corticosterone level and brain norepinephrine content in male mice. **Psychoneuroendocrinology**, 1999, 24: 345-361.
- Chen, N., Restivo, A., Reiss, C.S. Leukotrienes play protective roles early during experimental VSV encephalitis. **J. Neuroimmunol.**, 2001, 120:94-102.
- Dhabhar, F.S., McEwen, B.S. Enhancing versus suppressive effects of stress hormones on skin immune function. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 1999, 96:1059-1064.
- Dhabhar, F.S. Stress-induced augmentation of immune function – the role of stress hormones, leukocyte trafficking, and cytokines. **Brain, Behavior and Immunity**, 2002, 16:785-798.
- Domínguez-Gerpe, L., Rey-Méndez, M. Alterations induced by chronic stress in lymphocyte subsets of blood and primary and secondary organs of mice. **Immunology**, 2001, 2:7-21.
- Drew, B., Leeuwenburgh, C. Aging and the role of reactive nitrogen species. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 2002, 959:66-81.
- Elenkov, I.J., Chrousos, G.P. Stress hormones, Th1/Th2 patterns, pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease. **Trends in Endocrinology and Metabolism**, 1999, 10:359-368.
- Godfrey, K. Statistics in practice. Comparing the means of several groups. **N. Engl. J. Med.**, 1985, 313:1450-1456.
- Green, L.C., Ruiz De Luzuriaga, K., Wagner, D.A., Rand, W., Istfand, N., Young, V.R., Tannenbaum, S.R. Nitrate biosynthesis in man. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**, 1981, 78:7764-7768.

- Kioukia-Fougia, N., Antoniou, K., Bekris, S., Liapi, C., Christofidis, I., Papadopoulou-Daifoti, Z. The effects of stress exposure on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, thymus, thyroid hormones and glucose levels. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, 2002, 26:823-830.
- Macfarlane, A.S., Schwacha, M.G., Einstein, T.K. *In vivo* blockage of nitric oxide with aminoguanidine inhibits immunosuppression induced by an attenuated strain of *Salmonella* Typhimurium, potentiates *Salmonella* infections and inhibits macrophage and polymorphonuclear leukocyte influx into the spleen. **Infect. Immun.**, 1999, 67:891-898.
- Maes, M., Song, C., Lin, A., De Jongh, R., Gastel, A.V., Kenis, G., Bosmans, E., De Meester, I., Benoy, I., Neels, H., Demedts, P., Janca, A., Scharpé, S., Smith, R.S. The effects of psychological stress on humans: increased production of pro-inflammatory cytokines and a Th1-like response in stress-induced anxiety. **Cytokine**, 1998, 10:313-318.
- Mancuso, P., Standiford, T.J., Marshall, T., Peters-Golden, M. 5-lipoxygenase reaction products modulate alveolar macrophage phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. **Infection and Immunity**, 1998, 66:5140-5146.
- Mastorakos, G., Ilias, I. Maternal hypothalamic-pituitary-adrenal axis in pregnancy and the postpartum period postpartum-related disorders. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 2000, 900:95-106.
- Medeiros, A.I., Sá-Nunes, A., Soares, E.G., Peres, C.M., Silva, C.L., Faccioli, L.H. Blockade of endogenous leukotrienes exacerbates pulmonary histoplasmosis. **Infection and Immunity**, 2004, 72:1637-1644.
- Peters-Golden, M., Brock, T.G. Intracellular compartmentalization of leukotriene synthesis: unexpected nuclear secrets. **FEBS Letters**, 2001, 487:323-326
- Pick, E., Mizel, D. Rapid microassay for the measured of hydrogen peroxide produced by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. **J. Immunol. Methods**, 1981, 46:216-226.

Riber, U., Lind, P. Interaction between *Salmonella typhimurium* and phagocytic cells in pigs phagocytosis, oxidative burst and killing in polymorphonuclear leukocytes and monocytes. **Vet. Immun. Immunopathol.**, 1999, 67:259-270.

Rouzer, C.A., Ford-Hutchinson, A.W., Morton, H.E., Gillard, J.W. MK 886, a potent and specific leukotriene biosynthesis inhibitor blocks and reverses the membrane association of 5-lipoxygenase in ionophore-challenged leukocytes. **J. Biol. Chem.**, 1990, 265:1436-1442.

CAPÍTULO 3

IMPLICAÇÕES

A relação estresse-imunidade tem sido amplamente investigada por vários pesquisadores.

A importância do presente trabalho reside no fato de que o estudo do papel de leucotrienos sobre o estado de ativação de macrófagos de animais estressados poderia fornecer elementos para uma melhor compreensão da relação estresse-imunidade, e abrir perspectivas para futuras investigações.

Leucotrienos induzem produção de NO, o qual é um potente mecanismo de destruição de vários patógenos intracelulares. Considerando que o MK 886 inibiu a produção de NO tanto *in vitro* como *in vivo*, nossos resultados sugerem um importante papel dos leucotrienos quanto à síntese de NO, o qual é importante no controle da replicação de agentes infecciosos, principalmente em animais estressados e imunossuprimidos.