
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)**

**ULTRA-ESTRUTURA DE CÉLULAS PRESENTES NO REPARO TECIDUAL
SOB ATIVIDADE FÍSICA MODERADA**

RODRIGO FERRACINE RODRIGUES

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Biologia Celular e Molecular)

Fevereiro - 2007

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

**ULTRA-ESTRUTURA DE CÉLULAS PRESENTES NO REPARO TECIDUAL
SOB ATIVIDADE FÍSICA MODERADA**

RODRIG FERRACINE RODRIGES

Orientador: PROF. DR. FLÁVIO ENRIQUE CAETANO

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Câmpus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Área de Biologia Celular e Molecular)

*Aos meus pais Braz e Arlinda
e à minha irmã Larissa*

*“Por ser exato
O amor não cabe em si
Por ser encantado
O amor revela-se
Por ser amor
Invade
E fim.”*

(Djavan)

Agradecimentos

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela concessão da Bolsa de Mestrado.

À seção de Pós-Graduação nas pessoas da coordenadora Profa. Dra. Maria Izabel Souza Camargo e às secretárias na pessoa de Heloísa Aparecida Scopinho Nicoletti, que prontamente nos atendem.

Ao Departamento de Biologia e ao Laboratório de Microscopia Eletrônica da UNESP, Campus de Rio Claro, nas pessoas do Prof. Dr. Flávio Henrique Caetano, dos técnicos Antônio Teruyoshi Yabuky, Mônica Iamonti, Cristiane Márcia Miléo, Gerson Melo Souza, Rogilene Aparecida Prado, dos funcionários Lucila de Lurdes Segalla Franco, Neuza Ap. B. Perinotto pela convivência e presteza. Ao Departamento de Educação Física nas pessoas da Profa. Dra. Eliete Luciano e técnicos Clarice, Eduardo e Beto.

Aos professores que contribuíram para minha formação, nas aulas, nos cursos, nas monitorias. Um agradecimento especial ao Prof. Dr. Miguel Petrere Jr pelo grande auxílio, disposição de tempo e ensinamentos em estatística e experimentação científica.

Ao Prof. Dr. Flávio Henrique Caetano, nas qualidades de professor, orientador, tutor e um grande amigo. Obrigado pela paciência, pela insistência, pela confiança, pela preocupação, pelos ensinamentos e exemplos, pela convivência e amizade.

Aos amigos e companheiros de orientação durante estes anos Murillo, Fábio, Thalita, Runer, Giovana, Dimitrius, Airton, Rodrigo, Rafael, Alexandre e Henrique, pela convivência e auxílio.

Aos inestimáveis amigos que Rio Claro me deu ao longo desses anos e que compartilharam comigo, no verdadeiro sentido dessa expressão, anos maravilhosos. Para não tornar exaustiva a lista nem correr o risco de esquecer alguém, ficam agradecidos por nome os mais constantes ao longo da confecção desta dissertação: Frederico, Daniela, Giovana, Danilo, Amanda, Paulo, Bruno, Fabrício, Maria Luiza. O meu “muito obrigado” a estes e a todos os outros, perto ou já longe, por tudo que acrescentaram à minha vida.

Aos meus pais, dos quais tanto me orgulho, Braz e Arlinda, pelo amor, pela confiança, pelo apoio, pela preocupação; por pregar os valores, da educação, do esforço, da honestidade e da ética. À Larissa, minha irmã, por seu carinho e sua maneira de ser, com a qual aprendo muito.

A todos que de alguma forma contribuíram para esta dissertação. A todos que torceram, demonstraram interesse, preocupação e manifestaram suas saudades. Estejam certos de que sempre tenho todos comigo.

TOCANDO EM FRENTE

(Almir Sater e Renato Teixeira)

*Ando devagar porque já tive pressa
e levo esse sorriso porque já chorei demais
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe
Só levo a certeza de que muito pouco eu sei, ou nada sei.*

*Conhecer as manhas e as manhãs
o sabor das massas e das maçãs
É preciso amor pra poder pulsar
É preciso paz pra poder sorrir
É preciso a chuva para florir*

*Penso que cumprir a vida seja simplesmente
compreender a marcha e ir tocando em frente
Como um velho boiadeiro
levando a boiada, eu vou tocando os dias
pela longa estrada eu vou, estrada eu sou*

*Conhecer as manhas e as manhãs
o sabor das massas e das maçãs
É preciso amor pra poder pulsar
É preciso paz pra poder sorrir
É preciso a chuva para florir*

*Todo mundo ama um dia, todo mundo chora
Um dia a gente chega no outro vai embora
Cada um de nós compõe a sua história
cada ser em si carrega o dom
de ser capaz e ser feliz*

*Conhecer as manhas e as manhãs
o sabor das massas e das maçãs
É preciso amor pra poder pulsar
É preciso paz pra poder sorrir
É preciso a chuva para florir*

*Ando devagar porque já tive pressa
e levo esse sorriso porque já chorei demais
cada um de nós compõe a sua história
cada ser em si carrega o dom
de ser capaz e ser feliz*

ÍNDICE

	Página
Resumo Geral	1
General Abstract	3
Introdução Geral	5
Capítulo 1 – Mastócitos e Atividade Física Moderada na Reparação tecidual.....	9
1.1 Resumo.....	10
1.2 Introdução.....	11
1.3 Objetivos.....	14
1.4 Materiais e Métodos.....	14
1.5 Resultados.....	16
1.6 Discussão.....	18
1.7 Conclusão.....	22
1.8 Literatura Citada.....	22
1.9 Apêndice (figuras, gráficos e tabelas)	27
Capítulo 2 – Fibroblastos e Atividade Física Moderada na Reparação tecidual.....	41
2.1 Resumo.....	42
2.2 Introdução.....	43
2.3 Objetivos.....	47
2.4 Materiais e Métodos.....	47
2.5 Resultados.....	49
2.6 Discussão.....	51
2.7 Conclusão.....	56
2.8 Literatura Citada.....	56
2.9 Apêndice (figuras, gráficos e tabelas)	61
Capítulo 3 – Macrófagos e Atividade Física Moderada na Reparação tecidual.....	79
3.1 Resumo.....	80
3.2 Introdução.....	81
3.3 Objetivos.....	86
3.4 Materiais e Métodos.....	86
3.5 Resultados.....	88
3.6 Discussão.....	90
3.7 Conclusão.....	94
3.8 Considerações finais.....	94
3.9 Literatura Citada.....	95
3.10 Apêndice (figuras, gráficos e tabelas)	100
Considerações Gerais	122
Literatura Geral Citada	126

RESUMO GERAL

Quando um tecido ou órgão é alvo de algum tipo de injúria, dá-se início ao processo de inflamação tecidual. As reações celulares e humorais que tomam parte desta reação são evocadas a fim de exterminar ou neutralizar o agente infeccioso e seus produtos, permitindo que o reparo tecidual se dê da melhor forma possível. Contudo, algumas vezes o resultado desta ação pode ser prejudicial, levando ao comprometimento ou a perda das funções do tecido ou órgão em questão, com conseqüências que podem afetar a saúde do indivíduo como um todo.

Em contrapartida, a atividade física moderada tem sido apontada como um grande aliado no combate à várias doenças, potencializando a ação do sistema imune e reduzindo os possíveis danos e minimizando os efeitos nocivos das respostas inflamatórias.

Desta forma, nos propomos a verificar os efeitos da atividade física moderada no processo inflamatório e de reparação tecidual, comparando 10 ratos Wistar que realizaram exercícios físicos moderados com 10 sedentários, por meio

da análise numérica (microscopia de luz) e ultra-estrutural (microscopia eletrônica de transmissão) de mastócitos, macrófagos e fibroblastos, células muito importantes para tais fenômenos. O modelo de estudo escolhido foi o implante subcutâneo de esponjas de PVC, que mimetiza situações clínicas importantes como, por exemplo, implantes de marcapasso.

Nossos resultados indicam que as células do grupo treinado respondem de maneira mais ágil (precoce) e efetiva à injúria, que o número de cada tipo celular foi significativamente maior neste grupo e ainda que, para quaisquer dos grupos, os tipos celulares em estudo agem estreitamente interrelacionados.

Portanto, concluímos em nosso trabalho que a atividade física moderada pode contribuir positiva e significativamente para o processo de inflamação e reparo tecidual, possibilitando que a homeostase seja restabelecida mais facilmente e, assim, evitando maiores danos ao indivíduo.

GENERAL ABSTRACT

When a tissue or organ is target of some offense, it feels beginning to the process of tissue inflammation. Cellular and humoral reactions that participate of this reaction are evoked to exterminate or to neutralize the infectious agent and your products, allowing the tissue repair to feel in the best possible way. However, the result of this action can sometimes be harmful, taking to the compromising or the loss of the functions of the tissue or organ in subject, with consequences that can affect the individual's health as a completely.

On the other hand, the moderate physical activity has been pointed as a great ally in the combat to several diseases, improving the action of the immune system and reducing the possible damages and minimizing the noxious effects of the inflammatory answers.

Thus, we intend to verify the effects of the moderate physical activity in the inflammatory and tissue repair process, comparing 10 Wistar rats that had carried through moderate physical exercises with 10 sedentary ones, through the numeric

analysis (light microscopy) and ultrastructural (transmission electronic microscopy) of mast cells, macrophages and fibroblasts, which are very important cells for such phenomena. The model of chosen study was the subcutaneous implantation of PVC sponges, that simulates important clinical situations as, for instance, implant of pacemaker.

Our results indicate that the cells of the trained group answer in a more agile (precocious) and effective way to the offense, that the number of each cellular type was significantly larger in this group and although, for any of the groups, the cellular types in study act narrowly interrelated.

Therefore, we ended in our work that the moderate physical activity can contribute positive and significantly for the inflammation and tissue repair process, making possible that the homeostasis is reestablished more easily and, like this, avoiding larger damages to the individual.

INTRODUÇÃO GERAL

Esta seção tem a intenção de familiarizar o leitor com os aspectos fundamentais da inflamação e da reparação tecidual e facilitar a compreensão das origens e razões para a execução do trabalho que segue e está baseada na obra de Clark (1985) dedicada exclusivamente à esta temática.

Quando um tecido é acometido por alguma injúria, ela é freqüentemente acompanhada pela coagulação do sangue devido ao rompimento de alguns vasos sanguíneos. A síntese e a posterior lise do coágulo são processos altamente controlados e têm por maior função gerar condições para que se possa restabelecer a homeostase.

Todavia, o coágulo também é parte da resposta inflamatória e provê um arcabouço para o recrutamento de células para o local da injúria, da seguinte forma: seus componentes ou fragmentos gerados levam a ativação das “cascatas”

do complemento, tanto pela via clássica quanto pela alternativa, e, assim, podem atrair neutrófilos e monócitos para a área lesada, provocar a desgranulação dos mastócitos e promover a liberação por parte dos leucócitos de fatores quimiotáticos e fatores de crescimento como PDGF (*platelet-derived growth factor*), TGF(*transforming growth factor*) α e β , os quais colaborarão para a geração do tecido.

Os neutrófilos e monócitos são as primeiras células a se infiltrar. O neutrófilo tem por principal função limpar o local de bactérias e outros agentes infecciosos, além da liberação de algumas enzimas que facilitarão a penetração celular através da membrana basal dos vasos sanguíneos. Os monócitos chegam ao tecido de modo semelhante ao dos neutrófilos, porém persistem por muito mais tempo, ao contrario dos neutrófilos que desaparecem, em condições normais, logo nos primeiros dias da inflamação. Uma das funções dos monócitos, após sua ativação e transformação em macrófago, é fagocitar neutrófilos, fragmentos da matriz extracelular, além de organismos patogênicos. Os macrófagos também produzem e secretam, sob estímulo ou constitutivamente, fatores de crescimento, quimiotáticos e mitogênicos, necessários para iniciar e propagar a formação do novo tecido.

O novo estroma, também chamado tecido de granulação, começa a se formar aproximadamente 3 dias após a injúria e consiste de novos vasos sanguíneos (neo-angiogênese), macrófagos, fibroblastos e perdas seletivas de tecido conjuntivo.

A atração e proliferação das células, bem como a modulação de seus fenótipos, dependem do tipo e da quantidade de citocinas presentes, do nível de atividade das células e das condições proporcionadas pela matriz extracelular.

Assim, macrófagos, fibroblastos e os vasos sanguíneos agem interdependentemente, como uma unidade. Os macrófagos provêm contínua fonte de citocinas para estimular a fibroplasia, que consiste em uma dinâmica reciprocidade de fibroblastos, citocinas e matriz extracelular. Os fibroblastos provêm a nova matriz extracelular para suportar o influxo celular, além de contribuir também para a angiogênese, isto é, a formação de novos vasos

sanguíneos. Os vasos sanguíneos, por sua vez, provêm o oxigênio e nutrientes necessários para manter o metabolismo das células.

Nessa dinâmica, ainda auxiliam os mastócitos, estimulados a liberar o conteúdo de seus grânulos, além de sintetizar outros novos, facilitando assim a passagem de células para o tecido através dos vasos sanguíneos. Os mastócitos produzem também interleucina-4 (IL-4) e podem contribuir para o acúmulo de matriz colagenosa, pois sintetizam também triptase em abundância e esta estimula a proliferação dos fibroblastos.

Após a síntese e deposição iniciais dos colágenos fibrilares I, III e VI, miofibroblastos remodelam a matriz contraindo a ferida. A contração da ferida representa uma interação complexa e imperiosamente orquestrada de células, matriz extracelular e citocinas. Por exemplo, os macrófagos, a partir da primeira semana de atividade, já secretam PDGF que estimula os miofibroblastos a contrair a porção injuriada (ferimento).

A remodelação da matriz extracelular, a maturação celular e a apoptose estabelecem a terceira fase da reparação, a qual se sobrepõe com a formação tecidual.

Contudo, a reparação tecidual não é um processo simples e linear, como estas descrições reducionistas podem sugerir. Ao contrário, suas três grandes etapas, definidas por convenção e para facilitar seu entendimento, (1) inflamação, (2) formação de tecido e (3) remodelação tecidual, sucedem-se no tempo mas não são mutuamente exclusivas, dado o caráter interdependente destes eventos e, na realidade, sobrepõem-se para levar o processo a bom termo.

Muitas vezes, sobretudo nos vertebrados mais derivados e na fase adulta da vida, a resposta à lesão tecidual termina por não restabelecer o tecido tal como era, mas se dá como uma resposta fibroproliferativa que se transforma em uma cicatriz, ou seja, é muito mais um remendo do que uma restauração. A gravidade deste tipo de desfecho depende principalmente de sua extensão e do local onde se dá. Por exemplo, não haveria grandes conseqüências se ocorresse na epiderme; porém em órgãos como o fígado acarretaria grandes prejuízos a saúde.

Por outro lado, a atividade física é constantemente apontada como um elemento capaz de gerar e garantir saúde. Muitos trabalhos têm investigado os efeitos da atividade física, tanto em condições saudáveis quanto patológicas, buscando entender melhor sua relação com os processos fisiológicos e modulação do sistema imune, influência sobre células, citocinas, fatores de crescimento, hormônios e contemplando também os efeitos de diferentes níveis de atividade física.

Desta forma, despertou-se o interesse em pesquisar a influência da atividade física moderada em situações de inflamação crônica causada pela presença no tecido de um elemento inorgânico localizado subcutaneamente, uma vez que esta é uma situação cotidiana em muitos quadros clínicos, como, por exemplo, implantes de marcapasso e silicone.

Isto posto, decidiu-se utilizar como modelo experimental o implante subcutâneo de esponjas de PVC em ratos Wistar machos e adultos e executar a análise mirando mastócitos, macrófagos e fibroblastos, devido a participação expressiva, acima descrita, que tais células têm neste processo. Optou-se pela investigação comparativa entre um grupo sedentário e treinado, em nível ultra-estrutural, dada a correspondência direta existente no domínio celular entre forma e função, e também embasada por valores provenientes de contagens, para que se pudesse expressar as diferenças entre os grupos com apoio e ajuda interpretativa dos métodos estatísticos.

**MASTÓCITOS E ATIVIDADE FÍSICA MODERADA
NA REPARAÇÃO TECIDUAL**

CAPÍTULO 1

1.1 RESUMO

Os mastócitos são células globosas, grandes e com citoplasma repleto de grânulos basófilos. Elas participam do processo inflamatório liberando mediadores químicos armazenados, promovendo o recrutamento de leucócitos e o relaxamento de vasos sanguíneos. Há evidências de que os produtos derivados da prática de atividade física moderada melhoram as defesas do organismo no combate a inflamações. Este trabalho compara ultra-estrutural e numericamente mastócitos com e sem influência de atividade física moderada. Ratos Wistar machos foram randomizados em dois grupos, 10 sedentários (S) e 10 treinados (T), os quais receberam implantes de esponja de PVC na região dorsal. Os animais T foram submetidos à atividade física moderada com natação diária. Após 05, 10, 15, 20 e 30 dias os animais foram mortos, os implantes removidos e submetidos a preparações para microscopia eletrônica de transmissão. O número de mastócitos é significativamente maior no grupo T. Morfologicamente mantém-se o padrão clássico destas células, salvo algumas exceções. Quanto a desgranulação, foram observados os padrões anafilático e gradual, além da

extrusão de grânulos encerrados em membrana. Concluiu-se, por meio das análises, que a atividade física moderada é potencialmente benéfica e melhora o desempenho do sistema imune.

1.2 INTRODUÇÃO

A inflamação é fundamentalmente uma resposta protetora cujo objetivo final é livrar o organismo da causa inicial da lesão (p.ex., micróbios, toxinas) e das conseqüências desta lesão (p.ex., células e tecidos necróticos). Sem inflamação, as infecções prosseguiriam desimpedidas, as feridas jamais cicatrizariam e os órgãos danificados poderiam tornar-se chagas permanentes. A resposta inflamatória está estreitamente interligada ao processo de reparo tecidual, assim sendo, serve para destruir, diluir ou encerrar o agente lesivo. Deste modo, põe em movimento uma série de eventos que, tanto quanto possível, reconstituem e cicatrizam o tecido danificado. Entretanto esta resposta protetora, sendo potencialmente lesiva, tem um custo para o organismo. A reparação por fibrose produz faixas fibrosas que podem interferir com a atividade orgânica normal, limitando a mobilidade das articulações e obstruindo órgãos como o intestino, por exemplo. As drogas inflamatórias encontradas no mercado visam aumentar os efeitos saudáveis da inflamação e controlar os efeitos nocivos (RICHES, 1996; CABRERO et al., 2002; BAUGH e DONNELLY, 2003; GRIP et al., 2003).

A inflamação pode ser dividida em padrões agudos e crônicos. Enquanto a fase aguda caracteriza-se por respostas exsudativas e formação de edemas, a inflamação crônica caracteriza-se por respostas mais proliferativas que exsudativas, freqüentemente geradas pela permanência do agente infeccioso. Um modelo de inflamação crônica é a induzida por meio do implante de um corpo estranho. Nestas reações granulomatosas a população de leucócitos é predominantemente mononuclear com a mistura de macrófagos, proliferação de fibroblastos e neovascularização (PEACOCK e VANWINKLE, 1985; RICHES, 1996; NORBORG et al., 2000; AKGUL e EDWARDS 2003; WALKER et al.;

2003). Para tanto os mastócitos executam um papel muito importante, uma vez que agora são reconhecidos como indutores primários e amplificadores tanto da resposta imune inata quanto da adaptativa e não apenas células efetoras das doenças alérgicas e de respostas imunes ligadas a parasitoses do intestino delgado (GURISH e BOYCE, 2006).

Os mastócitos são células alongadas quando estão aderidas ao tecido conjuntivo e arredondadas quando estão isoladas. De fato, estas células têm origem na medula óssea e podem migrar através do sangue até os tecidos periféricos. Seu tamanho varia de acordo com sua localização, e mede em média de 5µm a 20µm de diâmetro. Apresentam o citoplasma repleto de grânulos que exibem metacromasia em presença de corantes básicos, como o azul de toluidina. Esta metacromasia é resultante da presença de heparina, um glicosaminoglicano rico em grupamentos sulfato, presente no interior dos grânulos.

Ao microscópio eletrônico, estas células apresentam numerosos grânulos citoplasmáticos, poucas mitocôndrias, complexo de Golgi e retículo endoplasmático granular pouco desenvolvidos e o núcleo com localização central. A superfície dos mastócitos é coberta por finos prolongamentos citoplasmáticos.

A heparina possui um amplo papel, participando inclusive da regulação da atividade da matriz extracelular por aumentar a ligação entre a fibronectina e o colágeno. Além dela, outros glicosaminoglicanos podem ser armazenados nos grânulos de mastócitos. Entre 08 e 12 horas após sua ativação, os mastócitos produzem os chamados fatores neo-sintetizados – fator de crescimento de transformação beta (TGF-β) e fator de crescimento de fibroblastos (FGF) - que participam dos processos de modulação e reparação dos tecidos, atuando sobre os fibroblastos e a fibrose. Os fatores de crescimento produzidos e liberados (desgranulação) pelos mastócitos estimulam a diferenciação e a proliferação celular, bem como a diapedese (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 1999; JAMUR, 2005).

Geralmente distinguem-se dois padrões básicos de desgranulação dos mastócitos. A desgranulação anafilática (DA) ou citotóxica e a desgranulação gradual (DG). A DA é caracterizada pela formação de canais de desgranulação

intracitoplasmáticos por meio da fusão dos grânulos uns aos outros e pela extrusão de grânulos livres de membrana pela superfície celular através de múltiplos poros da membrana. Já a DG é caracterizada pela presença de grânulos não fundidos, cheios ou parcialmente cheios, sem extrusão dos grânulos. Há ainda um terceiro tipo de desgranulação não muito bem estudado que envolve grânulos limitados por membrana que alcançam o meio extracelular sem causar danos a membrana plasmática, podendo ser um exemplo de secreção apócrina (JUNG et al., 2003). Letourneau et al. (2003) sugere que há correlação entre a patologia e o tipo de desgranulação, ou seja, o composto do grânulo que está sendo liberado é que determinaria o tipo de desgranulação.

Considerando as patologias, evidências epidemiológicas têm mostrado que exercícios físicos moderados, realizados regularmente, são benéficos na proteção do organismo às doenças infecciosas (NIEMAN, 1994, LOWDER et al., 2005), câncer (STERNFELD, 1992) na aceleração dos processos de reparo e controle da inflamação (NIEMAN, 1998, ROBERTS et al., 2006) e na manutenção do sistema imune (WOODS et al., 2003). Estudos com animais de laboratório têm demonstrado a complexidade da interação exercício-sistema imune e afirmam que o exercício moderado melhora algumas respostas inflamatórias, enquanto o exercício exaustivo afeta negativamente a capacidade imunológica (WOODS et al., 1997; PEIJIE et al., 2003). Os possíveis mecanismos de imuno-modulação induzidos pelos exercícios podem incluir mudanças hormonais, metabólicas e fisiológicas (FIELD, 1991; SMITH, 1997). A atividade física moderada, realizada regularmente, pode atenuar as respostas de estresse do organismo reduzindo a produção dos hormônios imunossupressores e também levando a liberação do hormônio de crescimento (GH), do peptídeo natriurético atrial (ANP) (MAACK, 1992) e da glutamina sérica (KOYAMA et al., 1998; CURI et al., 2005), acelerando a recuperação dos tecidos inflamados.

Nos últimos anos, as investigações têm focado nas reações de fase tardia, que são similares as manifestações de doenças crônicas, porque se percebe que estas reações inflamatórias não só envolvem mediadores, mas também mobilizam

vários tipos celulares e refletem as condições clínicas mais acuradamente que respostas agudas menos complexas (NAGAI et al., 2000).

Para reproduzir as reações inflamatórias e de reparação tecidual que ocorrem em situações clínicas importantes e rotineiras como, por exemplo, implantes de marcapasso, implantes de silicone, utilização de materiais em fraturas ósseas, pesquisas têm empregado o modelo de implante subcutâneo de materiais inorgânicos, como esponjas de PVC (AMEMIYA e DAKE, 1994; RONDO et al. 1996; YANAGIHARA et al., 2000; RAULIN, et al., 2000).

Assim, devido à participação e influência que os mastócitos exercem nas reações e nos processos de inflamação e reparação e a potencialidade moduladora da atividade física moderada, é interessante e necessário realizar experimentos que reúnam estes elementos e estender a análise ao nível ultra-estrutural, dada a relação direta existente entre a morfologia e a atividade dos componentes celulares, e realizar a quantificação das células, como mais uma forma de agregar conhecimentos, dado que poucas pesquisas têm levado em conta análises quantitativas em implantes *in vivo* (THOMSEN e GRETZER, 2001).

1.3 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é comparar, por meio de análises ultra-estruturais e quantitativas, mastócitos de ratos Wistar que receberam implantes subcutâneos de esponjas de PVC e foram submetidos a realização de atividade física moderada com os daqueles que também receberam tais implantes mas não praticaram a referida atividade.

1.4 MATERIAIS E MÉTODOS

1.4.1 Animais e treinamento

Foram utilizados 20 ratos machos adultos Wistar com aproximadamente 70 dias de idade no início do experimento, alimentados com ração balanceada padrão Purina, água *ad libitum* e mantidos em gaiolas coletivas a temperatura ambiente de 25°C e fotoperíodo de 12C:12E.

Os ratos foram distribuídos randomicamente nos seguintes grupos: sedentário (S), ratos que não realizaram exercícios físicos (n=10); treinado (T), ratos que realizaram exercícios físicos moderados (n=10). Aos 10 dias do início do treinamento (período de adaptação progressiva), os ratos sedentários e treinados foram submetidos à cirurgia de implante de esponja de PVC (polivinilcloro) e recolocados nas gaiolas. O grupo T retornou ao esquema de exercício dois dias após o implante. Aos 5, 10, 15, 20 e 30 dias depois da realização da cirurgia, respectivamente, 2 ratos de cada grupo permaneceram em repouso por 24h e foram mortos.

Para o implante da esponja de PVC, os ratos foram anestesiados por inalação com éter etílico e tricotomizados na região mediana dorsal, onde foi realizada uma incisão cirúrgica perpendicular ao eixo da coluna vertebral. Após a divulsão dos tecidos subcutâneos foram implantadas esponjas de PVC, com 7,0 mm³ previamente autoclavadas, distando 4,0 mm da incisão para evitar interferência dos processos de cicatrização. Em seguida foi feita a sutura da incisão. Todos os procedimentos foram realizados em condições estéreis.

Os animais do grupo T realizaram natação com carga equivalente a 3% do peso corporal acoplada ao tórax, por 60 minutos diários, 5 dias por semana, por até 30 dias. As sessões de natação foram iniciadas às 8:00h em recipiente de amianto (100cmx 70cmx60cm) com coluna d'água de 40 cm, para evitar que os ratos apoiassem a cauda no fundo do recipiente. A temperatura da água foi mantida em 32 ± 1°C. Após o término das sessões de natação, os ratos foram enxutos e retornados às suas respectivas gaiolas em sala com temperatura de 25°C. Os animais S foram colocados na água, nas mesmas condições anteriores, aproximadamente 2 minutos por dia, para simular a manipulação dos animais T.

1.4.2 Análise Ultra-estrutural

Após a morte dos animais, os implantes de PVC foram removidos e fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,3 por 24h e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, seguindo desidratação em série graduada de acetona. O material foi incluído em resina Epon-Araldite e cortado em ultramicrótomo Sorvall Porter Blum MT2. Foi então contrastado com acetato de uranila e citrato de chumbo. O material foi analisado sob microscopia eletrônica de transmissão com microscópio eletrônico Phillips CM 100.

1.4.3 Análise Quantitativa

Os mastócitos foram quantificados em cortes de 0.5 μ m corados com Azul de Toluidina. Foram analisados e quantificados 15 campos para cada subgrupo (5S, 10S, 15S, 20S, 30S, 5T, 10T, 15T, 20T, 30T) através de um microscópio de luz Zeiss. Os resultados obtidos foram estatisticamente analisados pelo teste de ANOVA Two Way (análise de variância para dados amostrais independentes) com os fatores grupo (treinado e sedentário) e tempo (5, 10, 15, 20 e 30 dias), para $p < 0,01$.

1.5 RESULTADOS

1.5.1 Análise Ultra-estrutural

Morfologicamente, os mastócitos, tanto do grupo S quanto do grupo T, são bastante semelhantes entre si. Apresentam-se arredondados no início do experimento (figs. 1, 2, 3 e 4) e tornam-se mais alongados a partir dos grupos de 15 dias (figs. 5, 6, 7, 8, 9 e 10).

A membrana plasmática apresenta muitos prolongamentos citoplasmáticos finos por toda a superfície. O citoplasma é preenchido por grânulos e pobre em organelas, sinalizando que os mastócitos encontram-se maduros. O núcleo é

relativamente grande e central e é preenchido basicamente por eucromatina, ficando a heterocromatina restrita à periferia.

Os mastócitos foram observados, freqüentemente, em grupos de 2 a 4 bastante próximos uns aos outros, geralmente próximos a vasos sanguíneos, como é característico para este tipo celular.

Entretanto, os grupos apresentam algumas diferenças quanto aos grânulos: os mastócitos do grupo 5T possuem maior abundância deles em relação aos do grupo 5S (figs. 1 e 2). Porém, o grupo 10S possui grânulos em quantidade similar àquela do grupo 5T. Enquanto isso, no grupo 10T os grânulos parecem estar em um estágio de desgranulação mais avançado que em 10 S (figs. 3 e 4). A situação do grupo 15S é semelhante à do grupo 15T, porém neste último podem ser verificados contatos mais abundantes dos mastócitos com outros tipos celulares e elementos fibrilares da matriz extracelular (figs. 5 e 6). No grupo 20S, nota-se que seu aspecto morfológico é diferenciado com relação aos demais grupos e possui grânulos menos abundantes quando comparados ao grupo 20T (figs. 7 e 8). Entre os grupos 30S e 30T, não há diferença significativa entre a quantidade de grânulos, porém no grupo 30S a desgranulação prossegue mais intensa em relação ao grupo 30T, que possui grânulos mais elétrons densos e, portanto, menor atividade (figs. 9 e 10).

Quanto a desgranulação, verificam-se diferentes padrões. Nos primeiros estágios predominam grânulos não fundidos, parcialmente vazios, com menor elétrons-densidade, muitas vezes expandidos, sem que sofram extrusão, características típicas da DG (figs. 11, 12, 13, 14). Nos estágios mais avançados predomina a fusão dos grânulos, formando canais de desgranulação e também ocorre a liberação de grânulos livres de membrana através de poros na superfície celular, característicos da DA (figs. 15, 16, 17, 18). Tais grânulos podem ser encontrados próximos aos mastócitos, associados a matriz extracelular (MEC) ou próximos a outros tipos celulares ou ainda fagocitados por estes. Algumas vezes, notam-se alguns grânulos que sofreram extrusão, mas parecem estar encerrados por membrana (figs. 4 e 10), aspecto acompanhado às vezes por alterações morfológicas nas células, como no grupo de 20 S (fig.19).

Nota-se ainda que os mastócitos mantêm íntimos contatos com outras células e com a MEC, evidenciada nas fotos pelo colágeno, (figs. 20, 21, 22, 23 e 24). Este fenômeno, embora seja verificado em ambos os grupos, é mais intenso e precoce no grupo T.

1.5.2 Análise quantitativa

A partir da contagem acima descrita, verificamos que o maior número de mastócitos no grupo T ocorre aos 5 dias e no grupo S ocorre aos 10 dias (figura 25).

A análise de variância *ANOVA two-way*, cujas fontes de variabilidade na variável dependente (número de fibroblastos) são tempo (com 5 níveis: 5, 10, 15, 20, 30 dias) e o grupo (sedentário e treinado), detectou que não há interação significativa entre os fatores (T e G) e seus efeitos isolados são altamente significativos ($p < 0.01$) (tabela 1).

Dentro de cada intervalo as médias do grupo S foram consistentemente menores que as do grupo T (figura 26).

1.6 DISCUSSÃO

A morfologia dos mastócitos do presente estudo coincide bastante com aquela descrita por Jamur (2005). Cabe apenas observar que a autora descreve os mastócitos como alongados quando estão aderidos à matriz extracelular e arredondados quando isolados. Em nosso trabalho, são notados os dois aspectos morfológicos, apesar das células estarem no tecido conjuntivo.

É fácil entender a localização deste tipo celular, já que uma de suas principais funções é aumentar a permeabilidade vascular e facilitar a diapedese das células.

A quantidade de grânulos e o seu padrão de desgranulação sugerem que as células do grupo T desempenham seu papel mais precocemente em relação ao grupo S. Além disso, as células do grupo T tornam-se mais alongadas antes (ao

redor dos 10 dias) que as do grupo S (ao redor dos 15 dias). Segundo ainda a mesma autora, existe relação entre a forma da célula e a interação dela com o tecido. Assim, este poderia ser mais um indício de que as células do grupo T estão mais adiantadas em suas interações que as do grupo S. Além disso, a formação de poros na superfície celular, por onde grânulos livres de membranas são extrudados em condições de DA, é observada no grupo T aos 10 dias e no grupo S aos 15.

Simplificadamente pode-se dizer que a desgranulação é predominantemente DG do início ao meio do experimento e daí até o final predomina a DA. Estes resultados são corroborados pelos estudos de Dvorak et al. (1996) que afirmam que a DG precede e é inversamente relacionada à DA. Nossos resultados mostram ainda que muitas vesículas com características típicas da DG começam mais tarde a mostrar sinais de fusão, típicos da DA, evidenciando a transição. Estes autores também atribuem às células sob DA as características de morfologia e processos de superfície alongados, o que está de acordo com nossas observações, como já descrito.

É difícil, em uma análise ultra-estrutural, tentar estabelecer motivos para tais padrões de desgranulação, mas a literatura pesquisada oferece algum suporte. Letourneau et al. (2003) correlacionam o tipo de desgranulação à patologia e ao componente granular que está sendo liberado. Segundo Dvorak e Morgan (1997) é por meio da DG que a histamina dos macrófagos é liberada. Dvorak et al. (1996) estabelecem ainda que a estimulação de mastócitos com anti-IgE produz extensiva evidência de DA, enquanto MCP-1 (*monocyte chemotactic protein*) é o maior estimulante da DG.

Nem mesmo a literatura consultada nos permite inferir seguramente algo a respeito dos grânulos que, eventualmente, são extrudados com a membrana. Algumas vezes, eles estão associados a padrões morfológicos alterados das células, como é o caso dos grupos de 20 dias, que poderia indicar que o fenômeno é decorrente de alguma situação fisiológica adversa. Contudo, notamos também este tipo de desgranulação associado ao padrão morfológico clássico da célula, o que pode negar a hipótese anterior. Ao descrever este fenômeno, Jung et

al. (2003) também não o explora e nem justifica que tipo de evento o ocasionaria, porém afirma não haver nenhum dano à célula e sugere que poderia ser um tipo de secreção apócrina. Logan et al. (2003) identificam a citólise como um importante modo de deposição de grânulos nos tecidos, apesar de não a considerarem um tipo de exocitose.

Chama atenção também que aos 30 dias, sobretudo no grupo S, notam-se grânulos menores, bastante elétron-densos, sugerindo que tais células encontram-se em processo de nova síntese, produzindo mais mediadores e dando prosseguimento ao processo. Estes fatos são respaldados pelos estudos de Dvorak e Morgan (1997) que afirmam que na cura de feridas os mastócitos que perderam o conteúdo de seus grânulos por DG têm as vesículas novamente preenchidas e de Dvorak et al. (1998) que relatam que mastócitos são submetidos à maturação granular quando co-cultivados com fibroblastos *in vitro*. Contudo, não é possível verificar, ao menos nas imagens que embasam nossas análises, o grande desenvolvimento de organelas como o complexo de Golgi e de polissomos livres que tanto Jamur (2005) quanto Letourneau (2003) descrevem como característicos de células que estão sintetizando seus grânulos novamente. Associado a isto, a morfologia arredondada, tal como verificada no início do experimento, que muitas células do grupo 30S assumem pode ser um indicativo de que o processo de inflamação ainda é bastante intenso no grupo S. O mesmo não se verifica em relação ao grupo T.

É muito importante atentar ainda para as estreitas relações que os mastócitos mantêm com outros tipos celulares e até mesmo com elementos da matriz extracelular por meio dos prolongamentos citoplasmáticos presentes na superfície celular ou até pela união de células (reveja a figura 18). Segundo Jamur (2005), são as integrinas, receptores de membrana, que provêm a adesão dos mastócitos às proteínas da MEC, como a fibronectina, por exemplo, e as células residentes no tecido conjuntivo. Mastócitos conectados à fibronectina apresentam maior ativação e essa interação pode ser um dos fatores de maior responsabilidade pela modulação das respostas biológicas destas células, como diferenciação, migração, síntese e liberação de mediadores, alterações

morfológicas, sobrevivência celular e apoptose. Além disso, nessas interações, Dvorak et al (1998) ressaltam o importante papel desempenhado pelos grânulos extrudados, os quais podem ser observados ligados a pacotes de fibras colágenas, unidos à superfície dos mastócitos ou retidos entre mastócitos e células adjacentes, como os fibroblastos. Grânulos nessas condições foram observados em abundância em nossas análises.

O fato do grupo T demonstrar maior intensidade e antecipar-se no estabelecimento de contato com células residentes do tecido conjuntivo e elementos da MEC são mais um indicativo de que a atividade física moderada é benéfica na resolução da inflamação.

Numericamente, os resultados indicam que a população de mastócitos é significativamente maior no grupo T que no grupo S, sugerindo que a atividade física moderada pode realmente melhorar a resposta imune à inflamações (WOODS et al., 1997; NIEMAN, 1998), ou, ao menos, aumentar o potencial do sistema imune para resolver este tipo de situação. Apesar das análises estatísticas detectarem que os efeitos isolados dos fatores T e G são significativos, é importante observar que o tempo é igual para ambos os grupos e eles diferem quanto a prática ou não de exercícios, ou seja, a diferença numérica existente pode ser atribuída aos efeitos da atividade física moderada.

O fato da maior população de mastócitos ocorrer aos 5 dias no grupo T e aos 10 dias no grupo S é mais uma evidência de que a atividade física moderada tem efeitos antecipadores nos processos inflamatórios, mesmo porque, como ilustrado, os mastócitos são células que estabelecem interações importantes com outras células, seja por contato físico ou por mediadores produzidos, e assim podem acelerar as demais etapas do processo inflamatório. Por exemplo, os mastócitos podem modular a atividade pró-coagulante dos macrófagos e a produção do fator de necrose tumoral (TNF) de modo dependente de concentração e tempo (DACKIW et al., 1995) e há evidências de que a degranulação dos mastócitos podem até mesmo regular a densidade de macrófagos em úteros de ratas, segundo trabalho de Bosquiazzo et al (2005). Além disso a proliferação de fibroblastos pode ser promovida pela ativação de

mastócitos (JUNG et al., 2003; BUCKLEY et al., 2001) e, da mesma forma, a depleção de mastócitos está associada a diminuição da fibrose (YAMAMOTO et al., 2001; EVERETT et al., 1995). Considerando que o grupo T exibe mais rapidamente tanto o pico numérico de mastócitos quanto a diminuição de sua população e ainda que aos 30 dias tais células no grupo S exibem maior atividade que no grupo T, a atividade física moderada revela-se bastante benéfica para a resolução da injúria e restabelecimento da homeostase.

1.7 CONCLUSÃO

A partir de nossas análises podemos concluir que o número de mastócitos é significativamente maior no grupo treinado do que no sedentário, que a atuação e as interações entre os mastócitos e o tecido se dão mais precocemente no grupo T e que a atividade física moderada potencializa a ação destas células.

1.8 LITERATURA CITADA

AKGUL, C., EDWARDS, S. W. Regulation of neutrophil apoptosis via death receptors. **Cell Mol Life Sci**, v. 60, n. 11, p. 2402-2408. 2003.

AMEMIYA, T.; DAKE, Y. Granuloma after augmentation of the eyelids with liquid silicone: an electron microscopic study. **Ophthal Plast Reconstr Surg**, v.10, n. 1, p. 51-56. 1994.

BAUGH, J. A.; DONNELLY, S. C. Macrophage migration inhibitory factor: a neuroendocrine modulator of chronic inflammation. **J Endocrinol**, v. 179, n.1, p. 15-23. 2003.

BOSQUIAZZO, V. L.; DURANDO, M.; VARAYOUD, J.; RAMOS, J. G.; RODRÍGUEZ, H. A.; MUÑOZ-DE-TORO, M.; LUQUE, E. H. Macrophage density in the pregnant rat uerine cervix is modulated by mast cell degranulation. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 65, n. 2, p. 147-158. 2005.

BUCKLEY, C. D.; PILLING, D.; LORD, J. M.; AKBAR, A. N.; SCHELL-TOELLNER, D.; SALMON, M. Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. **Trends in Immunology**, v. 22, n. 4, p. 199-203. 2001.

CABRERO, A.; LAGUNA, J. C.; VAZQUEZ, M. Peroxisome proliferator-activated receptors and the control of inflammation. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v.1, n. 3, p. 243-248. 2002.

CURI, R.; LAGRANHA, C. J.; DOI, S. Q.; SELLITTI, D. F.; PROCOPIO, J.; PITÓN-CURI, T. C.; CORLESS, M.; NEWSHOLME, P. Molecular mechanisms of glutamine action. **Journal Of Cellular Physiology**, v. 204, n. 2, p. 392-401. 2005.

DACKIW, A. P. B.; NATHENS, A. B.; RIBEIRO, M. B.; CHEUNG, P. Y. C.; MARSHALL, J. C.; ROTSTEIN, O. D. Mast cell modulation of macrophage procoagulant activity and TNF production. **Journal of Surgical Research**, v. 59, n. 1, p. 1-5. 1995.

DVORAK, A. M.; SCHROEDER, J. T.; MACGLASHAN, D. W.; BRYAN, K. P.; MORGAN, E. S.; LICHTENSTEIN, L. M.; MACDONALD, S. M. Comparative ultrastructural morphology of human basophils stimulated to release histamine by anti-IgE, recombinant IgE-dependent histamine-releasing factor, or monocyte chemotactic protein-1. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 98, n. 2, p. 355-370. 1996.

DVORAK, A. M.; MORGAN, E. S. Diamine oxidase-gold enzyme-affinity ultrastructural demonstration that human gut mucosal mast cells secrete histamine by piecemeal degranulation in vivo. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 99, n.6, p. 812-820. 1997.

DVORAK, A. M.; COSTA, J. J.; MONAHAN-EARLEY, R. A.; FOX, P.; GALLI, S. J. Ultrastructural analysis of human skin biopsy specimens from patients receiving recombinant human stem cell factor: Subcutaneous injection of rhSCF induces dermal mast cell degranulation and granulocyte recruitment at the injection site. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 101, n. 6, p. 793-806. 1998.

EVERETT, E. T.; PABLOS, J. L.; HARLEY, R. A.; LEROY, E. C.; NORRIS, J. S., The role of mast cells in the development of skin fibrosis in tight-skin mutant mice. **Comp Biochem Physiol**, v. 110A, n. 2, p. 159-165. 1995.

FIELD, C J; GOUGEON, R; MARLISS, E B. Circulating Mononuclear Cell Numbers and Function During Intense Exercise and Recovery. **J Appl Physiol**, v. 71, n. 3, p. 1089-1097, 1991.

GRIP, O.; JANCIAUSKIENE, S.; LINDGREN, S. Macrophages in inflammatory bowel disease. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v. 2, n. 2, p. 155-160. 2003.

GURISH, M. F.; BOYCE, J. A. Mast cells: Ontogeny, homing and recruitment of a unique innate effector cell. **J Allergy Clin Immunol**, v. 117, n. 6, p. 1285-1291. 2006.

JAMUR, M. C. Mastócitos. In: Carvalho, H. F.; Collares-Buzato, C. B. (Org.). **Células: uma abordagem multidisciplinar**. Barueri: Ed. Manole, 2005. p. 382-391.

JUNG, Y. YASOSHIMA, A.; SAEGUSA, J.; NAKAYAMA, H.; DOI, K. Ultrastructural features of mast cells in picryl chloride (PCL)-induced contact dermatitis in IqI/Jic mice. **Exp Toxic Pathol**, v. 54, n. 4, p. 265-271. 2003.

JUNQUEIRA, L. C; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 9ª edição, 1999. p. 84-85.

KOYAMA, K; KAYA, M; TSUJITA, J; HORI, S. Effects of Decreased Plasma Glutamine Concentrations on Peripheral Lymphocyte Proliferation in Rats. **Eur Appl Physiol**, v. 77, n. 1-2, p. 25-31. 1998.

LETOURNEAU, R.; ROZNIECKI, J. J.; DIMITRIADOU, V.; THEOHARIDES, T. C. Ultrastructural evidence of brain mast cell activation without degranulation in monkey experimental allergic encephalomyelitis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 145, n. 1-2, p. 18-26. 2003.

LOGAN, M.; ODEMUYIWA, S.; MOQBEL, R. Understanding exocytosis in immune and inflammatory cells: The molecular basis of mediator secretion. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, n. 5, p. 923-932. 2003.

LOWDER, T.; PADGETT, D. A.; WOODS, J. A. Moderate exercise protects mice from death due to influenza virus. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 19, n. 5, p. 377-380. 2005.

MAACK, T. Receptor of Atrial Natriuretic Factor. **Annu Rev Physiol**, v. 54, p. 11-27. 1992.

NAGAI, H.; ABE, T.; YAMAGUCHI, I.; MITO, K.; TSUNEMATSU, M.; KIMATA, M.; INAGAKI, N. Role of mast cells in the onset of IgE-mediated late-phase cutaneous response in mice. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.106, n. 1, sup. 1, p. s 91-s98. 2000.

NIEMAN, D. C. Exercise, Infection and Immunity. **Int J Sports Med**, v. 15, sup. 3, p. s131-141. 1994.

NIEMAN, D. C. Exercises Immunology: integration and regulation. **Int J Sports Med**, v. 19, sup. 3, p. s171. 1998.

NORDBORG, C.; NORDBORG, E.; PETURSDOTTIR, V. The pathogenesis of giant cell arteritis: morphological aspects. **Clin Exp Rheumatol**, v. 18, n. 4, sup. 20, p. S18-21. 2000.

PEACOCK, E. E.; VANWINKLE, W. **Wound Repair**, 3rd ed., WB Saunders, 1985. p. 55-56.

PEIJIE, C.; HONGWU, L.; FENGPENG, X.; JIE, R.; JIE, Z. Heavy load exercise induced dysfunction of immunity and neuroendocrine responses in rats. **Life Sciences**, v. 72, n. 20, p. 2255-2262. 2003.

RAULIN, C.; GREVE, B.; HARTSCHUH, W.; SOEGDING, K. Exudative Granulomatous Reaction to Hyaluronic Acid (Hylaform). **Contact Dermatitis**, v. 43, n. 3, p. 178-179. 2000.

RICHES, D. W. H. Macrophage Involvement in Wound Repair Remodeling and Fibrosis. In: CLARK, R. A. F. (Org.). **The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair**. New York : Plenum Press, 1996. p. 95 – 141.

ROBERTS, C. K.; WON, D.; PRUTHI, S.; LIN, S. S.; BARNARD, R. J. Effect of a diet and exercise intervention on oxidative stress, inflammation and monocyte adhesion in diabetic men. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.73, n. 3, p. 249–259, 2006.

RONDO, J. W.; VIDARTE, G.; MICHALANY, N. Histologic study of the skin with gold thread implantation. **Plast Reconstr Surg**, v. 97, n.1, p.256-258. 1996.

SMITH, J. A. Exercises Immunology And Neutrophilis. **Int J Sports Med**, v.18, sup.1, p. s46-s55. 1997.

STERNFELD, B. Cancer and teh Protective Effect of Physical Activit: The Epidemiological Evidence. **Med Sci Sports Exer**, v. 24, n. 11, p. 1195-1209. 1992.

THOMSEN, P.; GRETZER, C. Macrophage interactions with modified material surfaces. **Current Opinion in Solid State and Material Science**, v. 5, n. 2-3, p. 163-176. 2001.

WALKER, A.; WARD, C.; DRANSFIELD, I.; HASLETT, C.; ROSSI, A. G. Regulation of Granulocyte Apoptosis by Hemopoietic Growth Factors, Cytokines and Drugs: Potential Relevance to Allergic Inflammation. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v.2, n. 4, p. 339-347. 2003.

WOODS, J A; CEDDIA, M A; KOZAK, C; WOLTERS, B W. Effects Of Exercise On Macrophage MHC II Response to Inflammation. **Int J Sports Med**, v. 18, n. 6, p. 483-488. 1997.

WOODS, J. A.; CEDDIA, M. A.; ZACK, M. D.; LOWDER, T. W.; LU, Q. Exercise training increases the naïve to memory T cell ratio in old mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 17, n. 5, p. 384-392. 2003.

YAMAMOTO, T.; KATAYAMA, I.; NISHIOKA, K. Mast cell numbers in multiple dermatofibromas. **Dermatology**, v. 190, n. 1, p. 9-13. 1995.

YANAGIHARA, M.; FUJII, T.; WAKAMATU, N.; ISHIZAKI, H.; TAKEHARA, T., NAWATE, K. Silicone Granuloma on the Entry Points of Acupuncture, Venepuncture and Surgical Needles. **J Cutan Pathol**, v. 27, n. 6, p. 301-305. 2000.

1.9 APÊNDICE

figuras, gráficos e tabelas

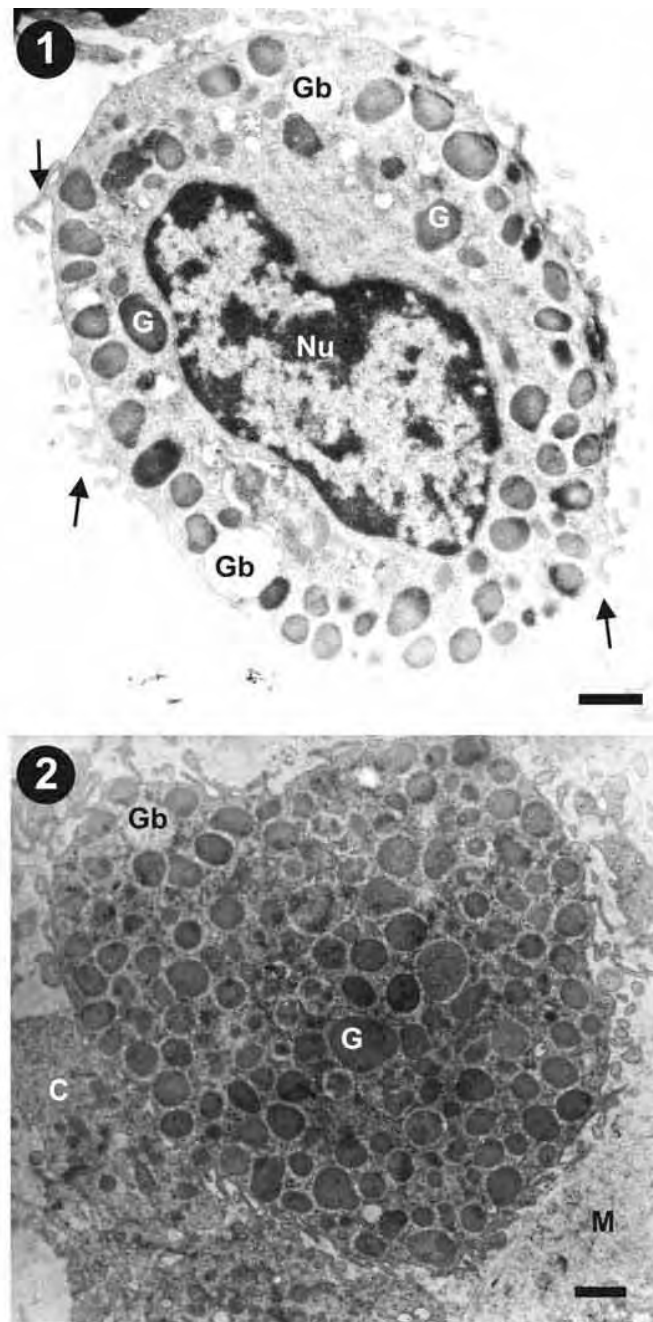


Figura 1. Mastócito do grupo 5S. Note o formato arredondado da célula. Os grânulos (G) não ocupam totalmente o citoplasma. Alguns deles já apresentam baixa elétron-densidade (Gb). As organelas são pobremente desenvolvidas. O núcleo é central, possui um nucléolo, acompanha o formato da célula e é praticamente todo ocupado por eucromatina, encontrando-se a heterocromatina restrita à periferia e há também um nucléolo (Nu). A superfície celular apresenta pequenos prolongamentos citoplasmáticos (setas). Barra 1µm.

Figura 2. Mastócito do grupo 5T. Esta célula tem o formato praticamente redondo também, menos regular que da figura 1, e seu citoplasma está preenchido por grânulos (G), alguns também com baixa elétron-densidade (Gb). Não é possível visualizar o núcleo. As organelas são raras. Note como já existem muitos elementos de matriz extracelular (M) e de outras células (C) ao redor da célula. Barra 1µm.

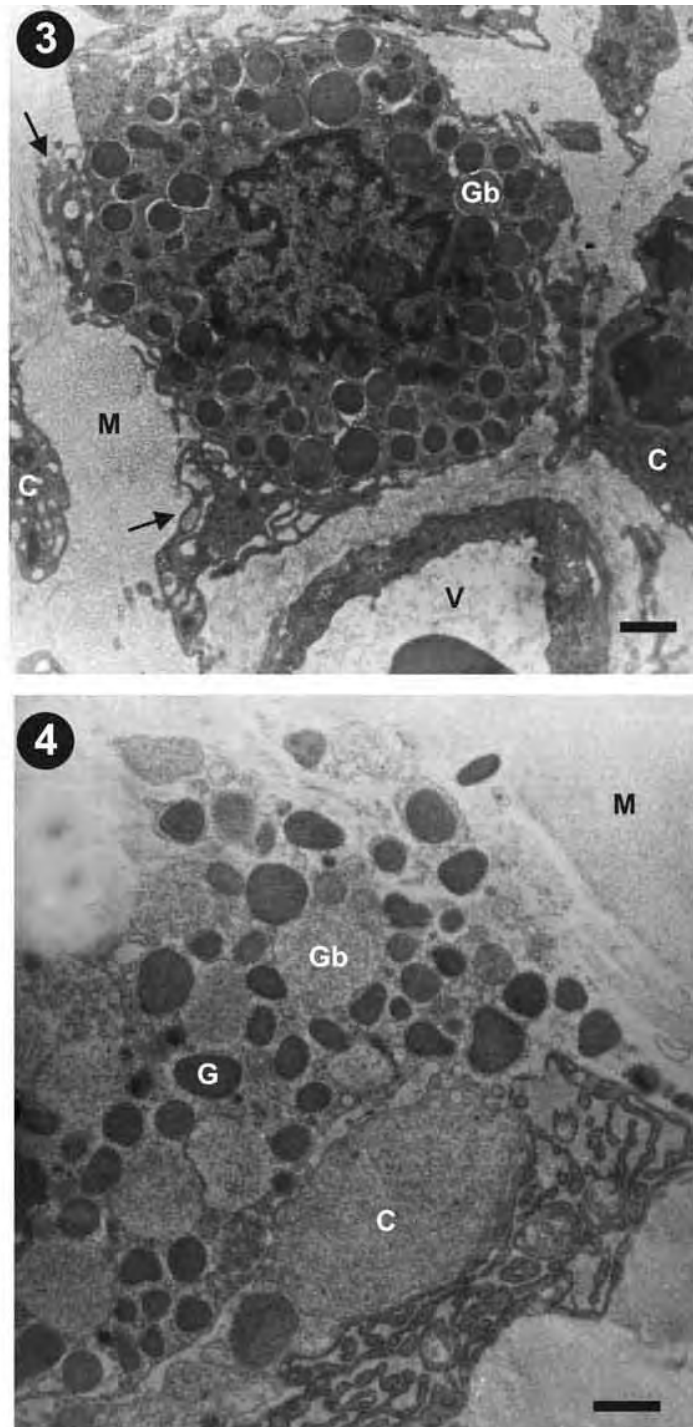


Figura 3. Mastócito do grupo 10S. Note a semelhança entre esta célula e a da figura 2, do grupo 5T. A diferença de elétron-densidade entre os grânulos evidenciam sinais de desgranulação. Os prolongamentos citoplasmáticos (setas) estão mais desenvolvidos. Elementos fibrilares da matriz extracelular (M), outras células (C) e um vaso sanguíneo rodeiam o mastócito. Barra 1µm.

Figura 4. Mastócito do grupo 10T. A célula já é mais alongada que redonda e a desgranulação é mais intensa e se dá de maneira mais diversificada em relação àquela apresentada na figura 3. Aqui também fica clara a relação estabelecida com processos citoplasmáticos de outras células (C) e com elementos da matriz extracelular (M). Barra 1µm.

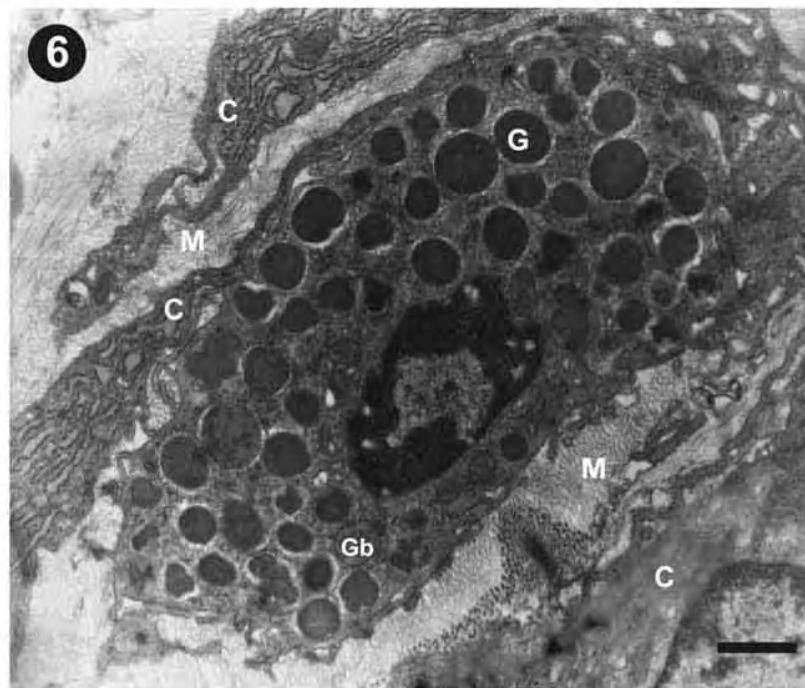
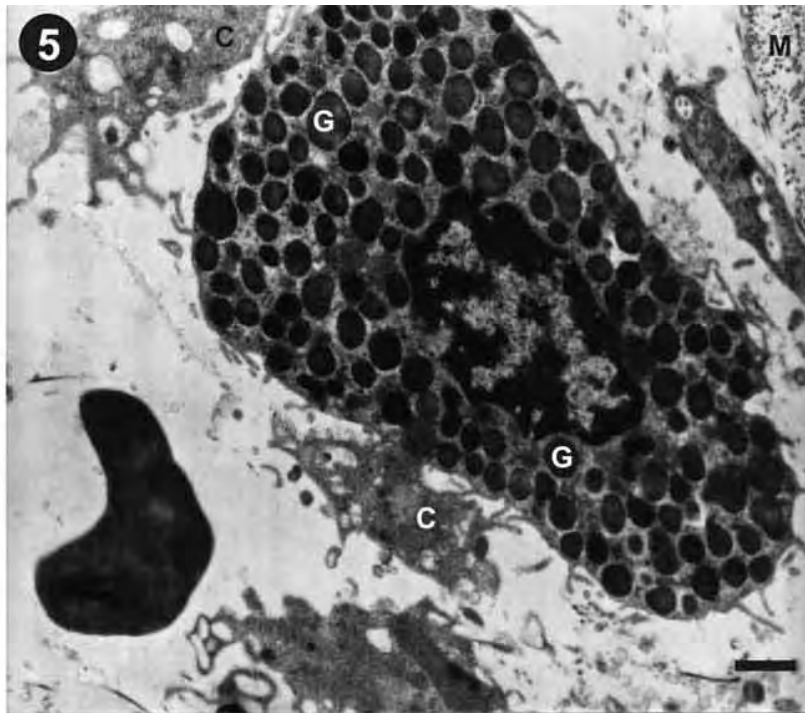


Figura 5. Mastócito do grupo 15S. Note como a célula apresenta-se mais alongada e contatos, ainda que pontuais, com outras células (C) e alguns elementos fibrilares da matriz extracelular (M). Barra 1 μ m.

Figura 6. Mastócito do grupo 15T. A célula também é alongada e mantém contatos muito próximos, tanto com outras células (C) quanto com elementos fibrilares da matriz extracelular (M), porém mais intensamente em relação à figura 5. Barra 1 μ m.

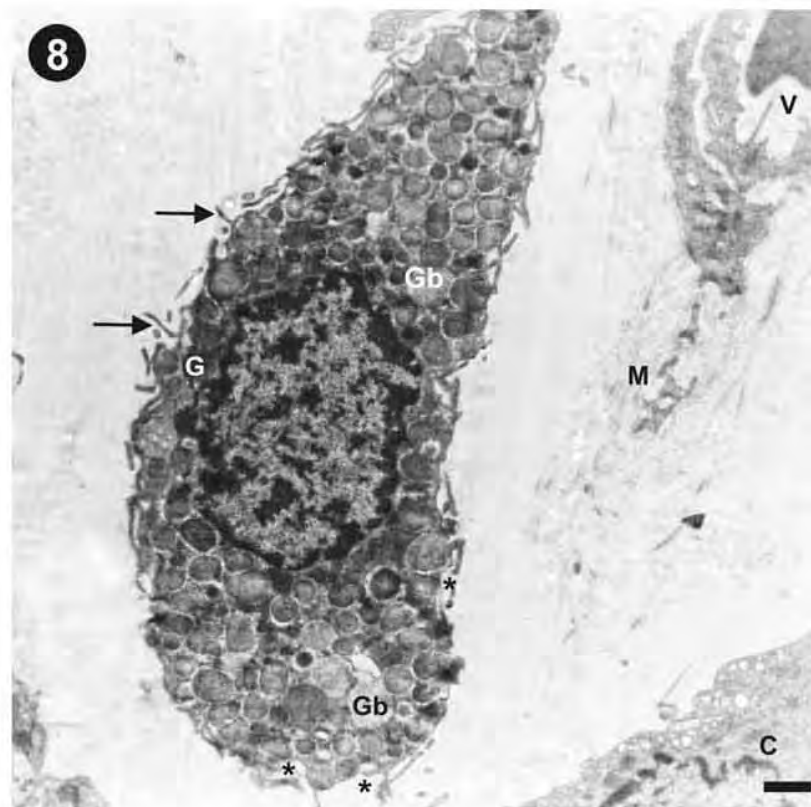
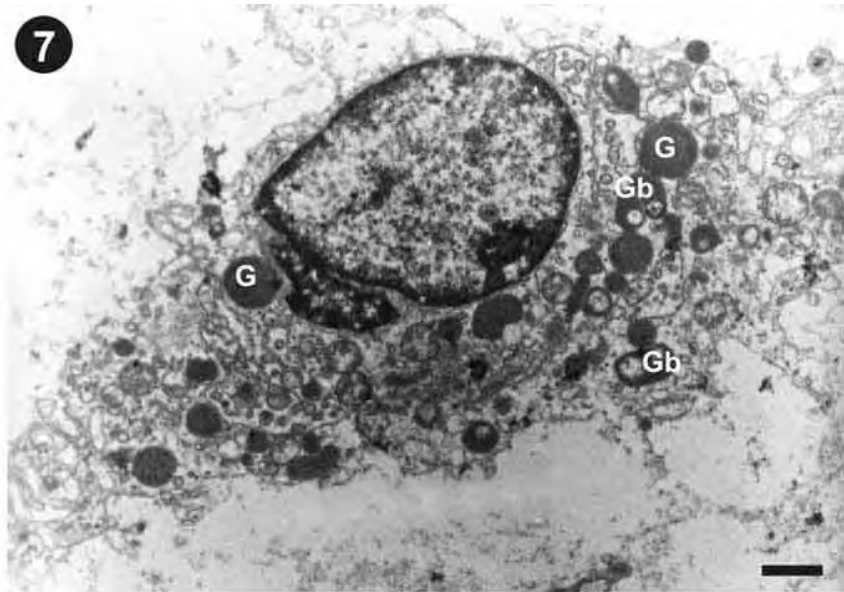


Figura 7. Mastócito do grupo 20S. Célula com aspecto morfológico bastante diferenciado, ainda que alongado. Não existem contatos com outras células e o número de grânulos (G) é bem menor, e alguns apresentam centros de baixa eletron-densidade (Gb). Barra 1 μ m.

Figura 8. Mastócito do grupo 20T. Célula com aspecto morfológico padrão, bem alongado. Muitos grânulos exibem baixa elétron-densidade (Gb), indicando desgranulação. Há alguns prolongamentos citoplasmáticos (setas) e há proximidade com outras células (C), um vaso sanguíneo (V) e elementos da matriz extracelular (M). Note a formação de poros (asteriscos) na superfície celular, provavelmente para extrusão de grânulos livres de membrana. Barra 1 μ m.

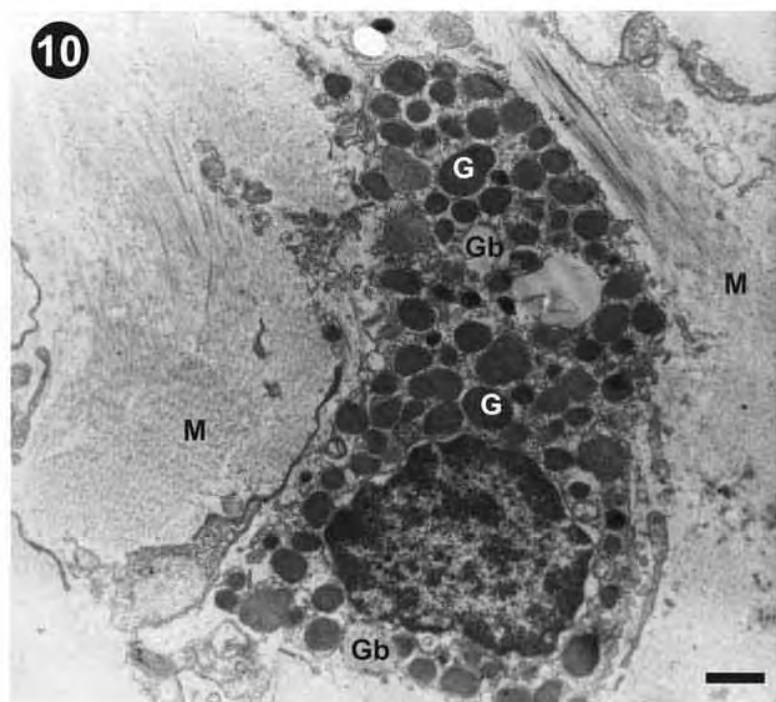
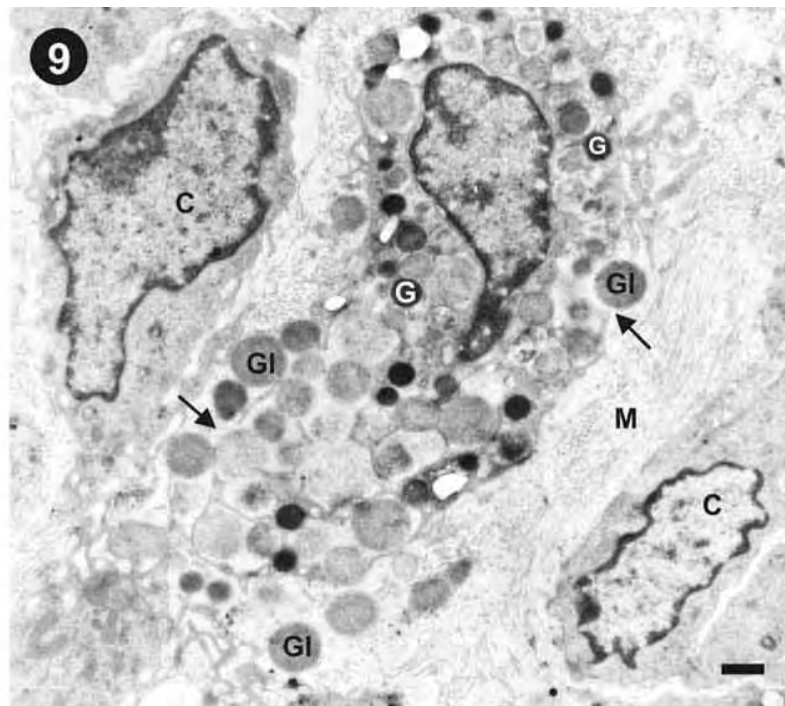


Figura 9. Mastócito do grupo 30S. Mastócitos em intensa desgranulação evidenciada pela quantidade de grânulos e suas diferentes elétrondensidades e pelos poros na membrana plasmática (seta), por onde podem ser liberados grânulos livres de membrana (Gl). O contato com elementos fibrilares da matriz extracelular (M) e com outros tipos celulares (C) também é muito grande. Barra 1 μ m.

Figura 10. Mastócito do grupo 30T. Apesar da abundância de grânulos, a desgranulação é pequena (Gb). Contudo, o contato com elementos fibrilares da matriz extracelular (M) permanece grande. Barra 1 μ m.

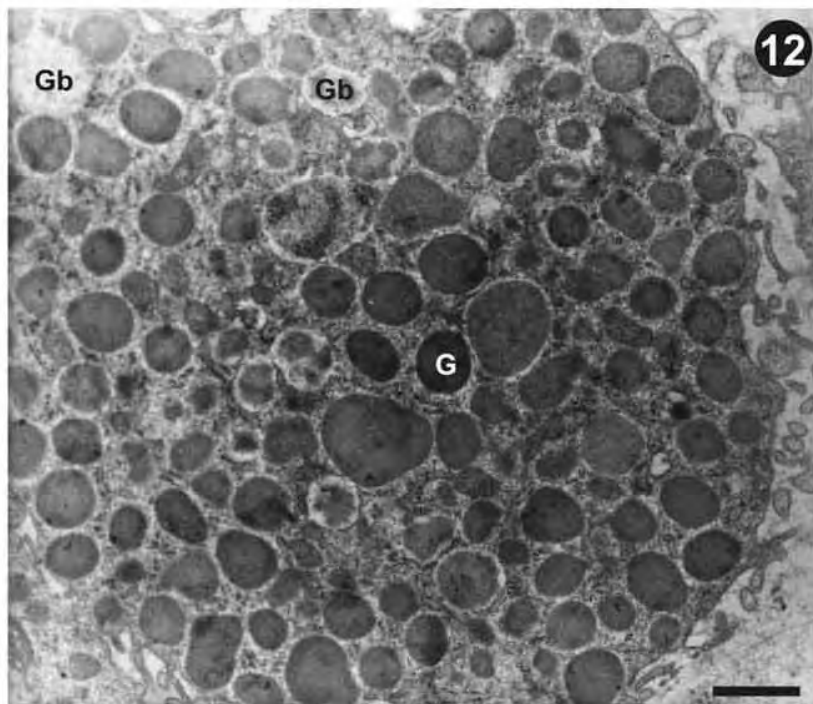
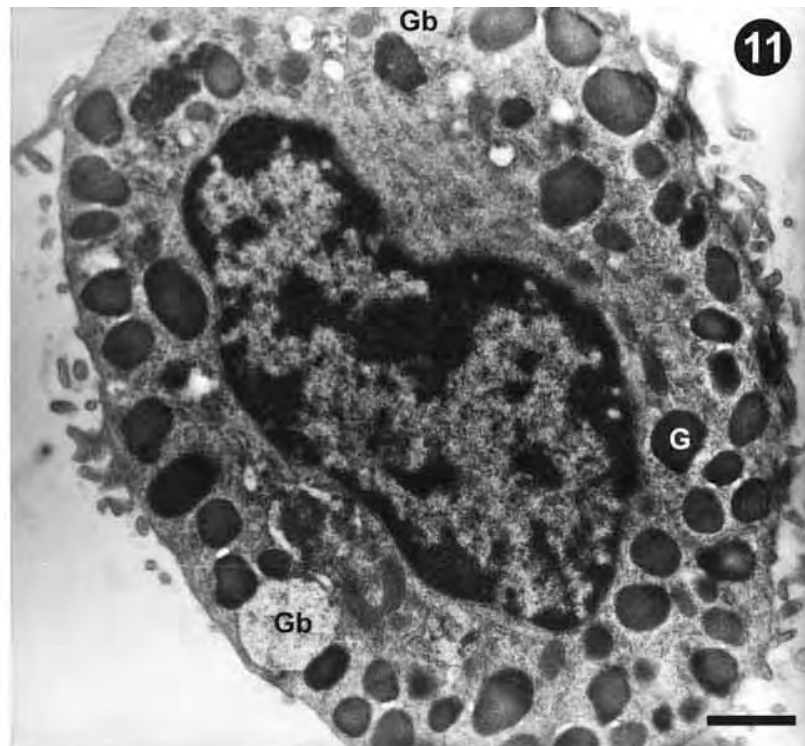


Figura 11. Detalhe de mastócito do grupo 5S. Notar grânulo típico de desgranulação gradual (Gb) com elétron-densidade menor em relação aos demais. Barra 1 μ m.

Figura 12. Detalhe de mastócito do grupo 5T. Note a quantidade maior de grânulos em relação à célula da figura 11. Alguns deles também com menor elétron densidade (Gb), típicos de DG. Barra 1 μ m.

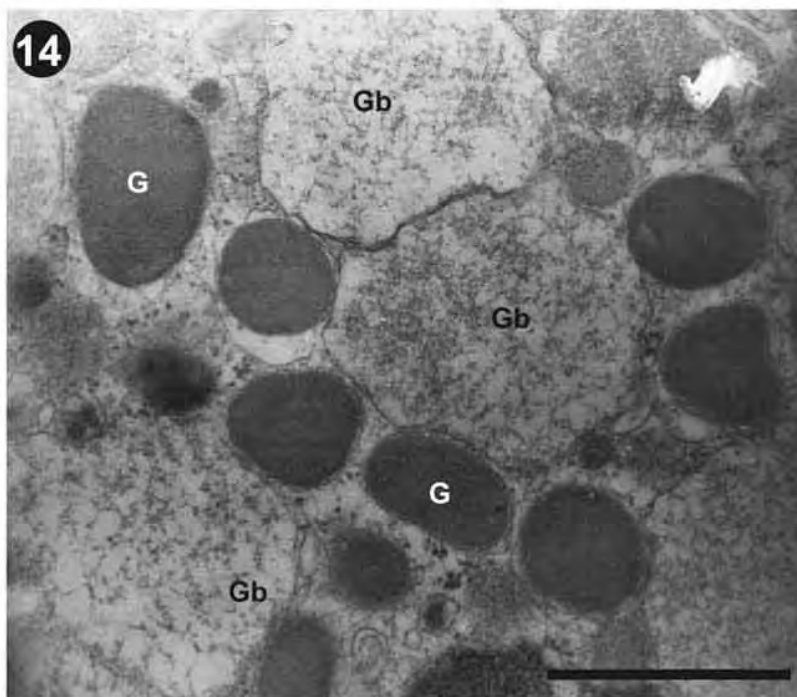
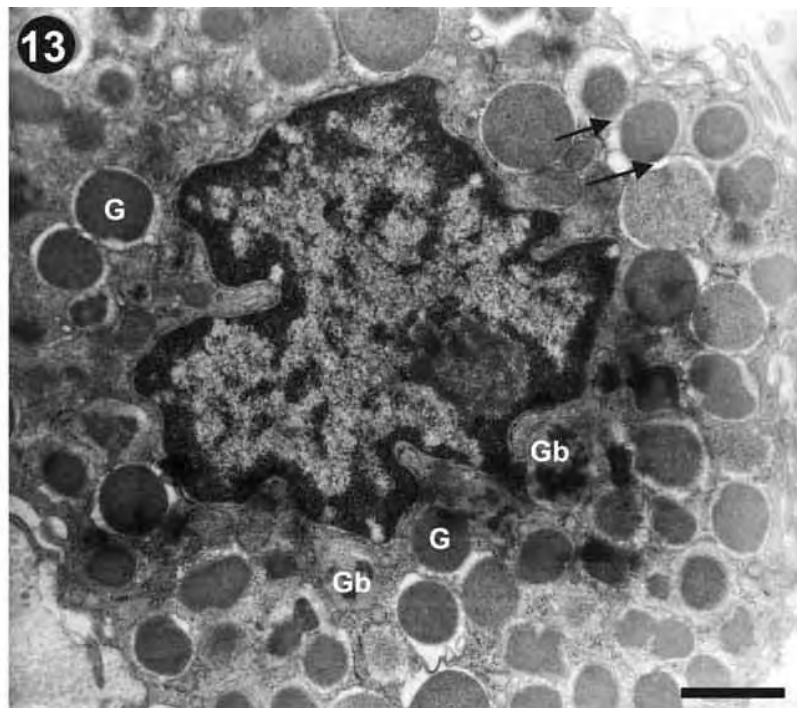


Figura 13. Detalhe de mastócito do grupo 10S. A célula apresenta aspecto muito semelhante ao da figura 12, com diversos grânulos apresentando diferentes elétrons-densidades, com características típicas de DG (Gb). Contudo algumas vesículas apresentam sinal de fusão (seta), característico de DA. Barra 1 μ m.

Figura 14. Detalhe de mastócito do grupo 10T. Detalhe de vesículas típicas de DG (Gb). Note que apesar da baixa elétrons-densidade não há fusão de vesículas. Barra 1 μ m.

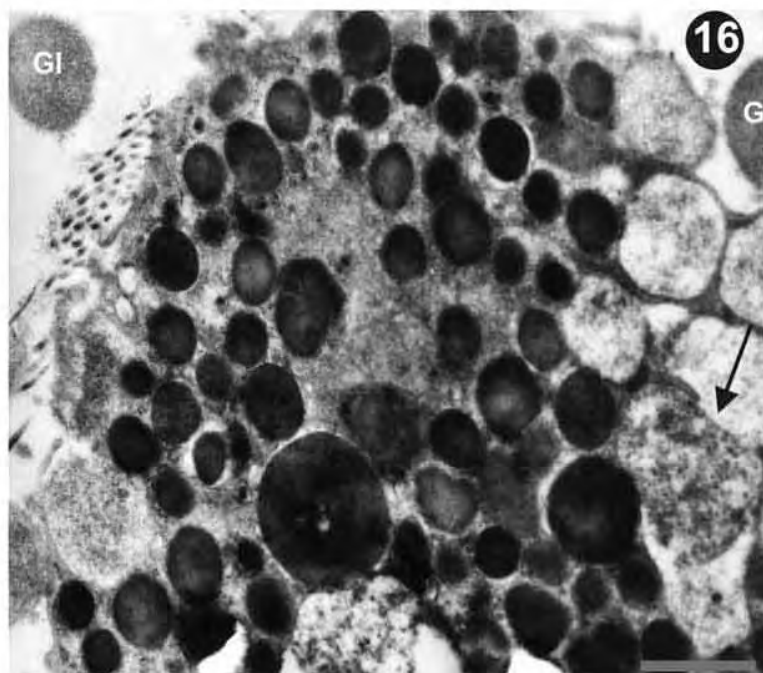
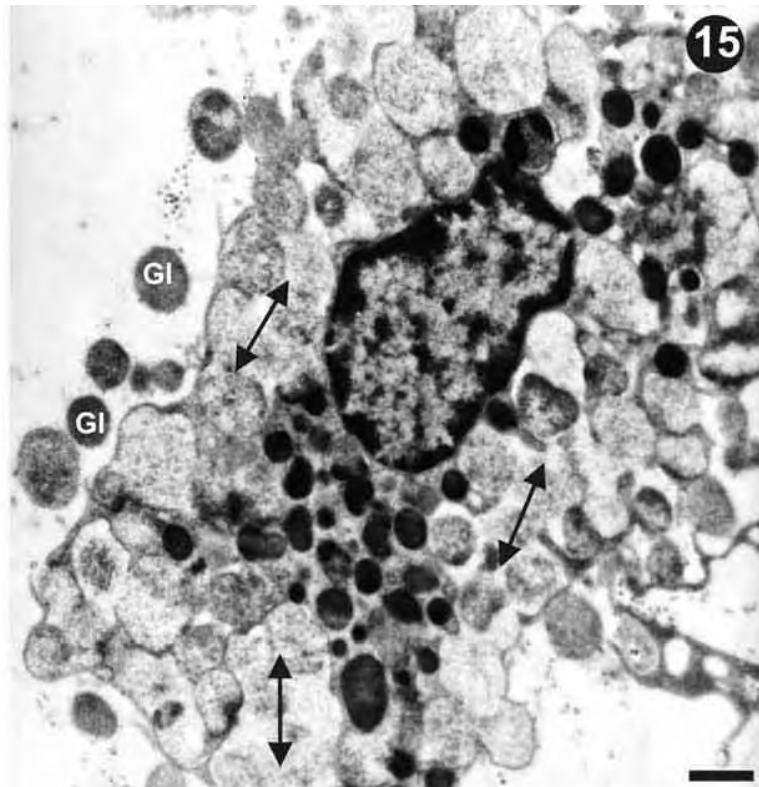


Figura 15. Detalhe de mastócito do grupo 30S. Observa-se nesta célula a massiva DA, com a formação de canais intracitoplasmáticos (seta de 2 cabeças) e extrusão de grânulos livre de membrana (GI). Barra 1 μ m.

Figura 16. Detalhe de mastócito do grupo 30S. Esta célula caracteriza a DA, com grânulos de diferente elétron-densidades fundindo-se (seta) e outros já no meio extracelular (GI). Barra 1 μ m.

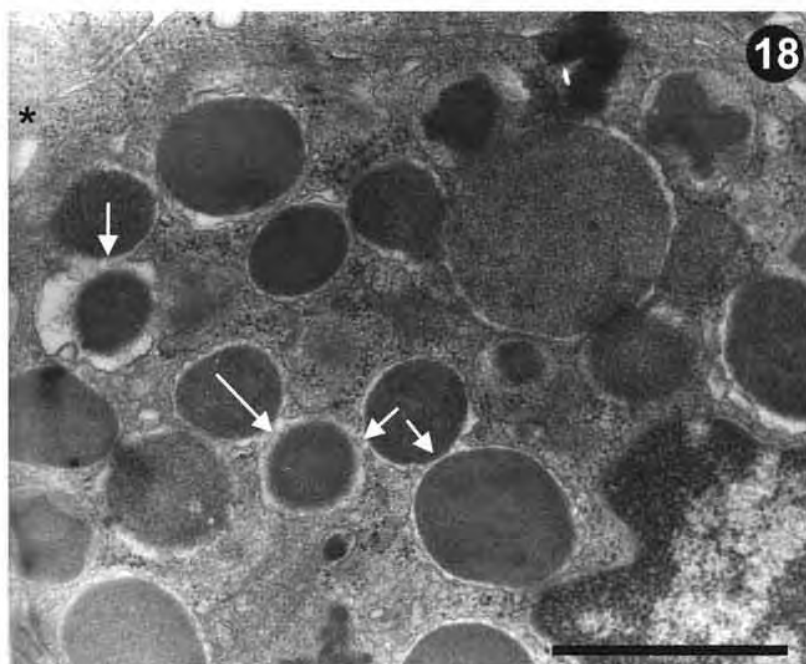
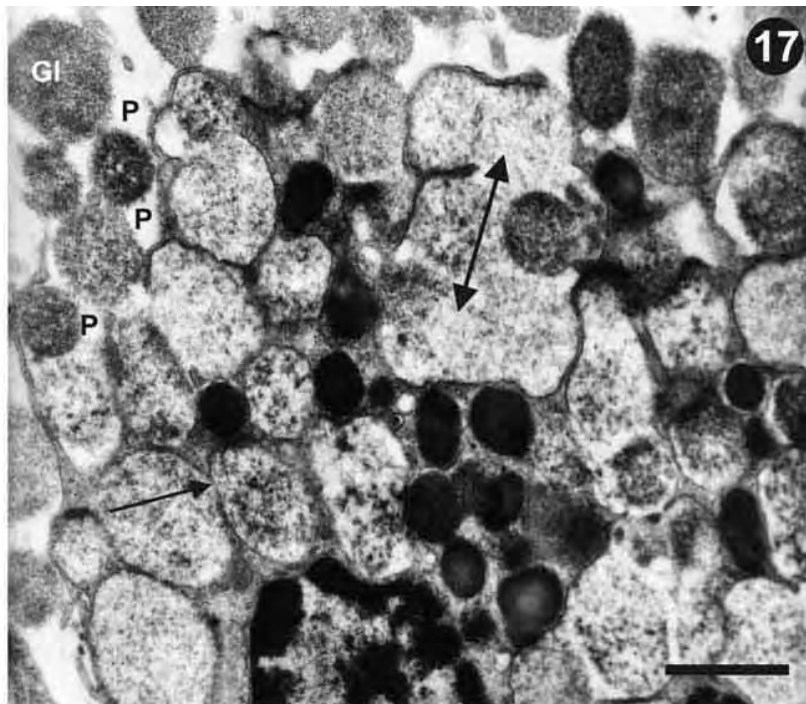


Figura 17. Detalhe de mastócito do grupo 30S. Esta figura ilustra ricamente os aspectos da DA: repare que há grânulos na iminência de fusão (seta), muitos já fundidos formando canais intracitoplasmáticos (setas de 2 cabeças) e ainda um grande poro (P) na membrana plasmática por onde muitos grânulos livres de membranas (G) são extrudados. Barra 1 μ m.

Figura 18. Detalhe de mastócito do grupo 15T. Detalhe de vesículas típicas de DA. Observe que há fusão dos grânulos uns aos outros (seta), posteriormente originam-se os canais intracitoplasmáticos. Um detalhe curioso desta imagem é o contato, por meio de fusão de membranas citoplasmáticas, que a célula estabelece com uma outra (asterisco). Barra 1 μ m.

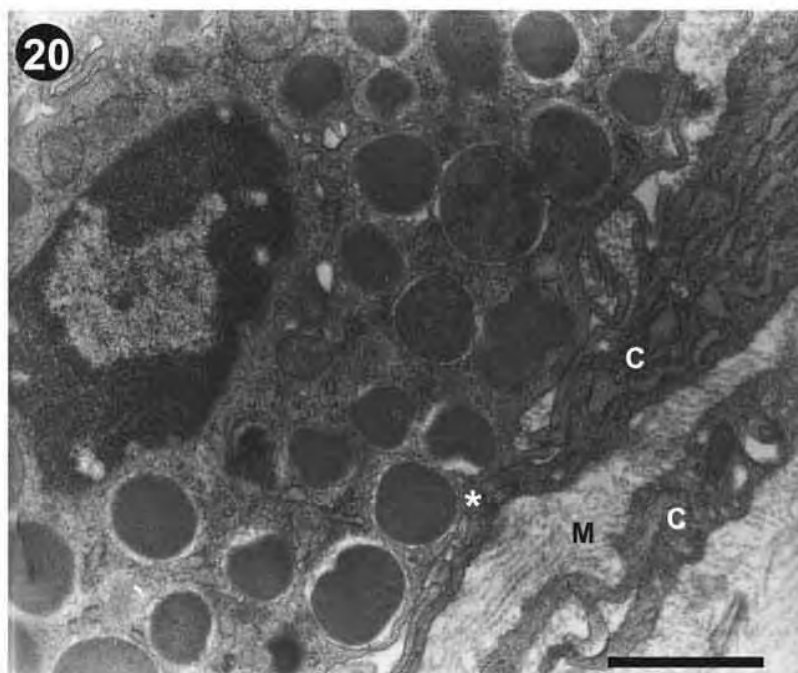
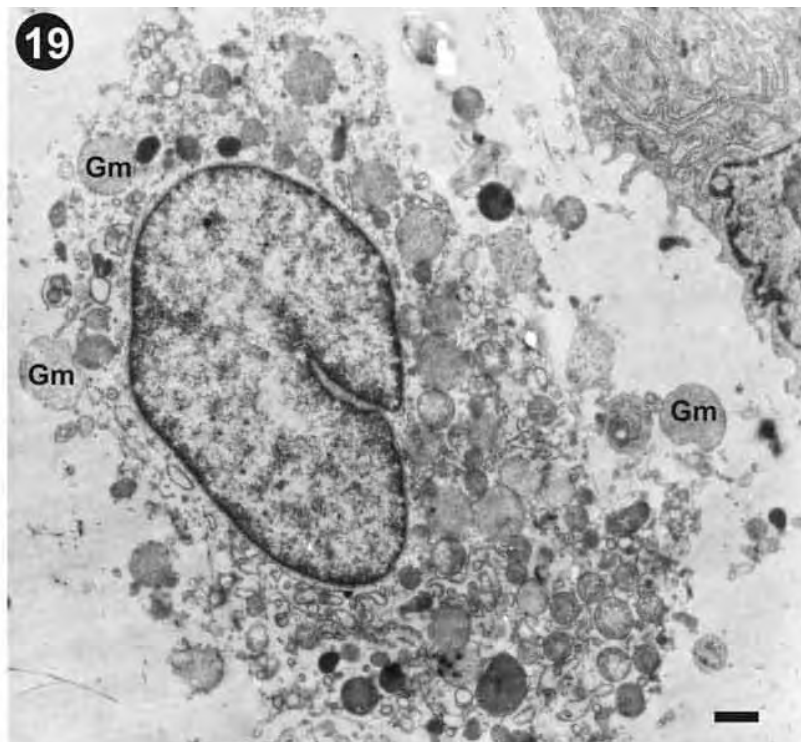


Figura 19. Detalhe de mastócito do grupo 20S. Aspecto bastante diferenciado dos padrões conhecidos. Os grânulos encontram-se extrudados com membrana (Gm). Barra 1 μ m.

Figura 20. Detalhe de mastócito do grupo 15T. Contatos (asterisco) entre os prolongamentos citoplasmáticos do mastócito e da célula adjacente (C), provavelmente um fibroblasto, e elementos da matriz extracelular (M). Barra 1 μ m.

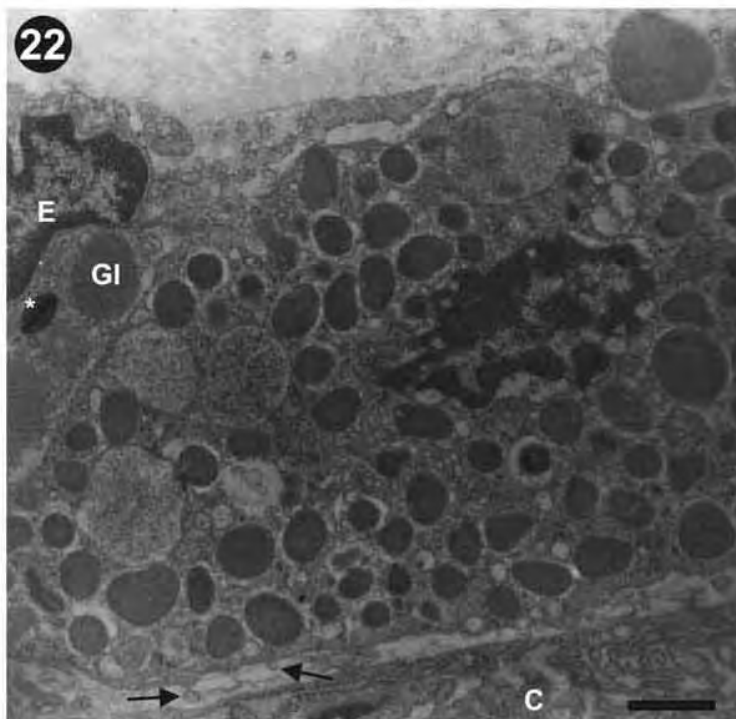
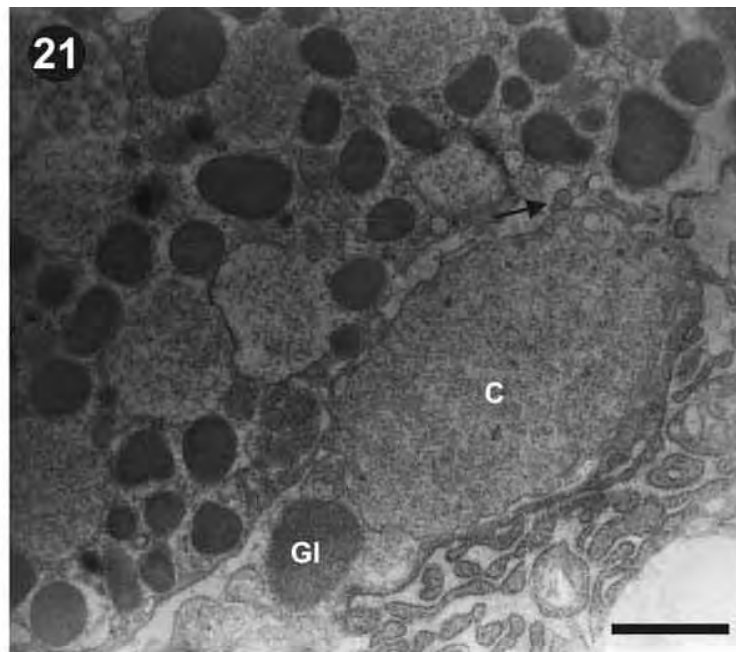


Figura 21. Detalhe de contato. Grupo 10T. Contato entre mastócito e um provável fibroblasto (C). Atente para a proximidade das células em alguns pontos e a existência de pequenas vesículas (seta) onde o espaço entre elas é maior. Barra 1 μ m.

Figura 22. Contato. Grupo 10T. Abaixo com um provável fibroblasto (C), note novamente alguns pontos de contato e outros de maior espaço onde existe o trânsito de vesículas (seta). À esquerda, com um eosinófilo (E), note que em seu citoplasma é possível observar grânulos típicos desta célula (asterisco) e grânulos de mastócitos (GI). Barra 1 μ m.

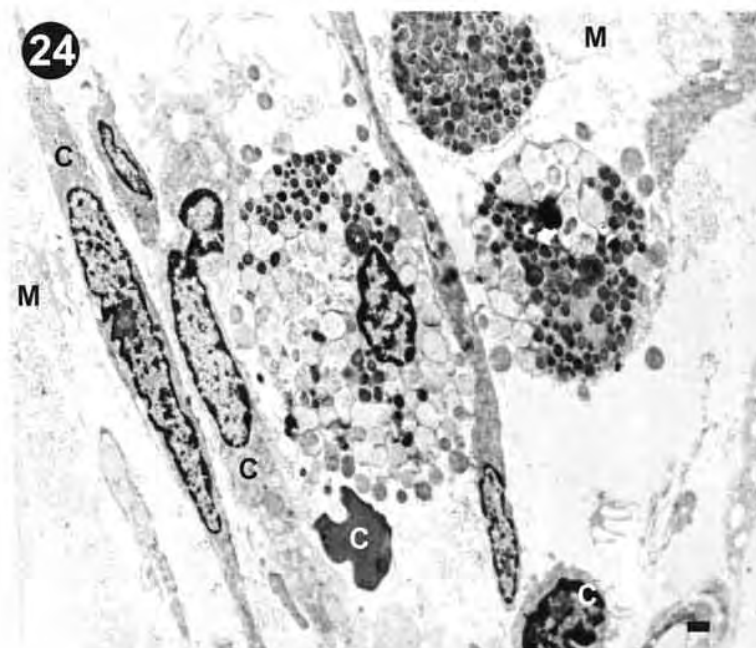
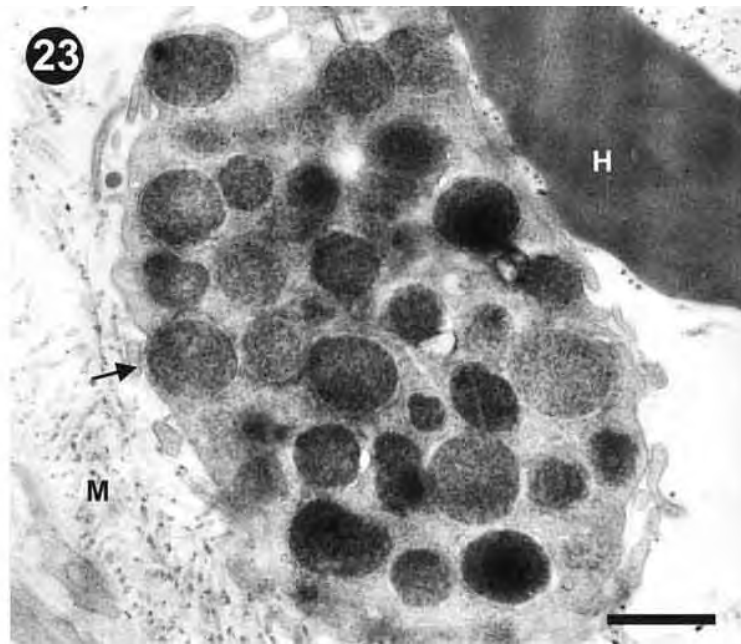


Figura 23. Contatos. Grupo 15T. Contato entre mastócito e elementos fibrilares da matriz extracelular, à esquerda. Note ainda que existem pequenas porções de processos citoplasmáticos de outra célula. À direita, o mastócito faz contato com elementos fibrilares da matriz extracelular (M) e com uma hemácia (H). Repare que alguns grânulos estão prestes a serem lançados ao meio extracelular através de poros na membrana plasmática (seta), característica de DA. Barra 1 μ m.

Figura 24. Mastócitos do grupo 30S. Note a abundância de grânulos, muitos já alcançando o meio extracelular, e suas diferentes elétrondensidades, o íntimo contato e proximidade com diversos tipos celulares (C) e com elementos fibrilares da matriz extracelular (M). Barra 1 μ m.

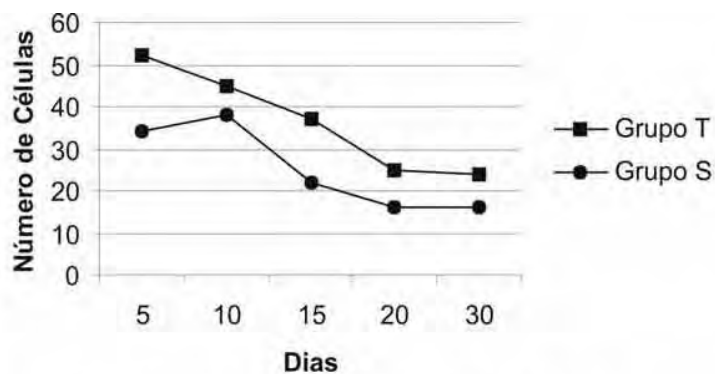


Figura 25. O gráfico compara o número total de mastócitos para cada subgrupo.

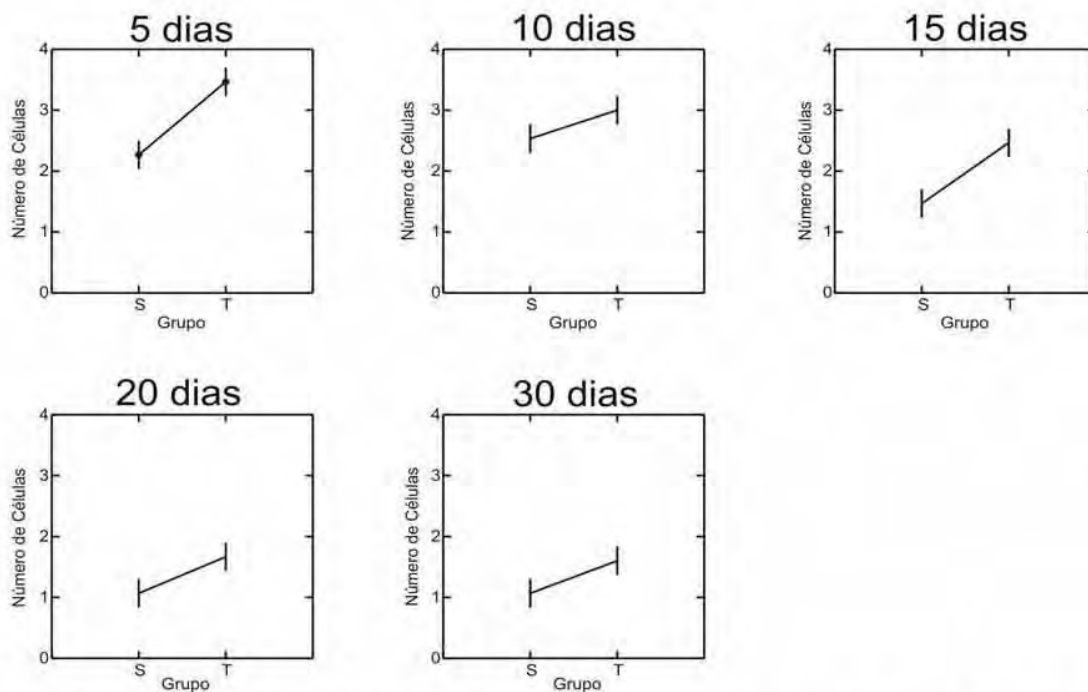


Figura 26. A figura ilustra a diferença de média do número de mastócitos, por campo de contagem, dentro de cada nível de análise. Note como o número de macrófagos do grupo T é maior durante todo o experimento.

Análise de Variância

Fator	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Razão F	Probabilidade (P)
G	21.660	1	21.660	30.734	0.000
T	65.027	4	16.257	23.067	0.000
G*T	3.107	4	0.777	1.102	0.358
Error	98.667	140	0.705		

Tabela 1. Tabela da Análise de Variância do número de mastócitos.

**FIBROBLASTOS E ATIVIDADE FÍSICA MODERADA
NA REPARAÇÃO TECIDUAL**

CAPÍTULO 2

2.1 RESUMO

Há evidências de que os produtos derivados da prática de atividade física moderada melhoram as defesas do organismo, incluindo o desempenho de muitos tipos celulares no combate a inflamações. Os fibroblastos constituem uma população celular bastante versátil e heterogênea que participa das reações de inflamação modulando o micro-ambiente tecidual e as células do sistema imune.

Este trabalho compara numericamente e ultra-estruturalmente fibroblastos com e sem influência de atividade física moderada com o objetivo de investigar que efeitos esta é capaz de produzir.

Ratos Wistar machos foram randomizados em dois grupos, 10 sedentários (S) e 10 treinados (T), os quais receberam implantes de esponja de PVC na região dorsal. Os animais T foram submetidos à atividade física moderada com natação diária. Após 5, 10, 15, 20 e 30 dias os animais foram mortos, os implantes

removidos e submetidos à preparações para microscopia eletrônica de transmissão.

Apesar de não haver significativa diferença morfológica entre os fibroblastos dos grupos S e T, a diferença no número de células nos vários estágios deste estudo é bastante expressiva.

2.2 INTRODUÇÃO

A inflamação é fundamentalmente uma resposta protetora cujo objetivo final é livrar o organismo da causa inicial da lesão (p.ex., micróbios, toxinas) e das conseqüências desta lesão (p.ex., células e tecidos necróticos). Sem inflamação, as infecções prosseguiriam desimpedidas, as feridas jamais cicatrizariam e os órgãos danificados poderiam tornar-se chagas permanentes. A resposta inflamatória está estreitamente interligada ao processo de reparo tecidual. Deste modo, serve para destruir, diluir ou encerrar o agente lesivo e põe em movimento uma série de eventos que, tanto quanto possível, cicatrizam e reconstituem o tecido danificado. Entretanto esta resposta protetora, sendo potencialmente lesiva, tem um custo para o organismo. A reparação por fibrose produz faixas fibrosas que podem interferir com a atividade orgânica normal, limitando a mobilidade das articulações e obstruindo órgãos como o intestino, por exemplo. As drogas inflamatórias encontradas no mercado visam aumentar os efeitos saudáveis da inflamação e controlar os efeitos nocivos (RICHERS, 1996; CABRERO et al., 2002; BAUGH e DONNELLY, 2003; GRIP et al., 2003).

A inflamação pode ser dividida em padrões agudos e crônicos. Enquanto a fase aguda caracteriza-se por respostas exsudativas e formação de edemas, a inflamação crônica caracteriza-se por respostas mais proliferativas que exsudativas, freqüentemente geradas pela permanência do agente infeccioso. Um modelo de inflamação crônica é a induzida por meio do implante de um corpo estranho. Nestas reações granulomatosas a população de leucócitos é predominantemente mononuclear com a mistura de macrófagos, proliferação de

fibroblastos e neovascularização (PEACOCK e VANWINKLE,1985; RICHES, 1996; NORBORG et al., 2000; AKGUL e EDWARDS 2003; WALKER et al.; 2003).

Os macrófagos são apontados, ao lado dos neutrófilos, como a primeira linha de defesa a tomar parte das reações inflamatórias e passam a produzir fatores tais como PDGF (Platelet-Derived Growth Factor) e TGF (Transforming Growth Factor), os quais estimulam tanto a proliferação de fibroblastos, como sua migração e participação na produção da matriz extracelular (KURKINEN et al., 1980; WELCH et al., 1990, CLARK, 1996).

Os fibroblastos são importantes células sentinelas no sistema imune: definem ativamente a estrutura do micro-ambiente tecidual e modulam o comportamento de células do sistema imune, condicionando o micro-ambiente local de modo que a cinética e a natureza do infiltrado inflamatório sejam apropriadas para a causa do dano. É proposto que estas células ocupem um papel crítico na mudança da inflamação aguda para imunidade adaptativa e tecido de reparação e, também, sugere-se que a inflamação crônica ocorra devido ao comportamento desordenado de fibroblastos, no qual falha a desativação de seu programa inflamatório levando a sobrevivência inapropriada e retenção de leucócitos no tecido inflamado (BUCKLEY et al., 2001).

Ao microscópio de luz, os fibroblastos apresentam núcleo volumoso e elíptico, de cromatina frouxa e um ou mais nucléolos evidentes; prolongamentos citoplasmáticos irregulares, de difícil observação e que se insinuam entre as fibras depositadas durante a atividade de síntese de matriz extracelular. A redução gradativa da atividade de síntese faz os fibroblastos adquirirem progressivamente perfis alongados ou fusiformes com menor número de prolongamentos citoplasmáticos, núcleos condensados e citoplasma acidófilo, típicos das células identificadas morfológicamente como fibrócitos.

Ultra-estruturalmente, os núcleos destas células apresentam cromatina frouxa enquanto o citoplasma possui polissomos livres, embora sua maior porção seja ocupada pelo retículo endoplasmático granular, seguido pelo complexo de Golgi. Estas são características típicas de células que sintetizam, exportam e não

acumulam proteínas. Em geral, os fibroblastos jovens possuem maior número de mitocôndrias e não têm grânulos de secreção, pois seus produtos de síntese são liberados por meio de vesículas e integram as macromoléculas da matriz extracelular. As variações de atividade funcional dos fibroblastos fazem com que eles apresentem maiores ou menores volumes nucleares e de compartimentos citoplasmáticos (MORAES e JOAZEIRO, 2005).

Contudo, os fibroblastos são muito versáteis e não são homogêneos, sua biologia é muito complexa e podem ser distinguidas diversas classes (ou subtipos populacionais) deste tipo celular dependendo do papel que desempenham.

Durante a reparação tecidual, um fenótipo particular foi descrito que, além daquelas características comuns aos fibroblastos, expressa conjuntos de microfilamentos com densidade similar àqueles encontrados em células da musculatura lisa. Como tais características sugerem que estas células participam do fechamento (contração) da ferida, foram nomeadas miofibroblastos e sua origem pode estar ligada aos próprios fibroblastos, às células musculares lisas e aos pericitos (DESMOULIÈRE e GABBIANI, 1996; BUCKLEY et al., 2001).

Entre os componentes da matriz extracelular produzidos pelos fibroblastos, o colágeno certamente é um dos mais importantes, e é responsável pela integridade tecidual e provisão de uma área física para importantes processos celulares (EYDEN e TZAPHILDOU, 2001). Além do colágeno, outras moléculas como a laminina e a fibronectina promovem a sobrevivência, crescimento e migração de células endoteliais, bem como a formação de tubo, possuindo assim propriedades angiogênicas (SOTTILE, 2004).

Como os fibroblastos são células relativamente longevas, um rígido mecanismo de controle precisa existir para evitar a superestimulação do sistema imune, o que poderia conduzir a inflamação persistente. Há evidências de que fibroblastos vindos de tecidos doentes têm fenótipos diferentes daqueles vindos de tecidos saudáveis. A proliferação de fibroblastos pode ser promovida também por ativação IgE dependente de mastócitos (BUCKLEY et al., 2001). No caso dos miofibroblastos, é aceitável que possam retornar ao fenótipo inativo quando o

processo de cura da ferida termina ou que desapareçam seletivamente por meio da apoptose (DESMOULIÈRE e GABBIANI, 1996).

Considerando estas situações patológicas, evidências epidemiológicas têm mostrado que exercícios físicos moderados, realizados regularmente, são benéficos na proteção do organismo às doenças infecciosas (NIEMAN, 1994, LOWDER et al., 2005), câncer (STERNFELD, 1992) e na aceleração dos processos de reparo e controle da inflamação (NIEMAN, 1998, ROBERTS et al., 2006) e na manutenção do sistema imune (WOODS et al., 2003). Estudos com animais de laboratório têm demonstrado a complexidade da interação exercício-sistema imune e confirmam que o exercício moderado melhora algumas respostas inflamatórias, enquanto o exercício exaustivo afeta negativamente a capacidade imunológica (WOODS et al., 1997; PEIJIE et al., 2003). Os possíveis mecanismos de imuno-modulação induzidos pelos exercícios podem incluir mudanças hormonais, metabólicas e fisiológicas (FIELD, 1991; SMITH, 1997). A atividade física moderada, realizada regularmente, pode atenuar as respostas de estresse do organismo reduzindo a produção dos hormônios imunossupressores e também levando a liberação do hormônio de crescimento (GH), do peptídeo natriurético atrial (ANP) (MAACK, 1992) e da glutamina sérica (KOYAMA et al., 1998; CURI et al., 2005), acelerando a recuperação dos tecidos inflamados.

Nos últimos anos, as investigações têm focado nas reações de fase tardia, que possuem similaridade as manifestações de doenças crônicas, porque se percebe que estas reações inflamatórias não só envolvem mediadores, mas também mobilizam vários tipos celulares e refletem as condições clínicas mais acuradamente que respostas agudas menos complexas (NAGAI et al., 2000).

Modelos de inflamação crônica induzida por meio de um corpo estranho mimetizam situações clínicas importantes como, por exemplo, implantes de marcapasso, ou de materiais para recuperação de fraturas ósseas e até mesmo em implantes de silicone. A reação e reparação que são processadas nestas situações clínicas em muito se assemelham às que ocorrem após implante subcutâneo de esponjas de PVC (AMEMIYA e DAKE, 1994; RONDO et al. 1996; YANAGIHARA et al., 2000; RAULIN, et al., 2000).

Desta forma, devido à participação e influência que os fibroblastos exercem nas reações e nos processos de inflamação e reparação e a potencialidade moduladora da atividade física moderada, é interessante e necessário realizar experimentos que reúnam estes elementos e estender a análise ao nível ultra-estrutural, dada a relação direta existente entre a morfologia e a atividade dos componentes celulares, e realizar a quantificação das células, como mais uma forma de agregar conhecimentos, dado que poucos pesquisas têm levado em conta análises quantitativas em implantes *in vivo* (THOMSEN e GRETZER, 2001).

2.3 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é comparar, por meio de análises ultra-estruturais e quantitativas, fibroblastos de ratos Wistar que receberam implantes subcutâneos de esponjas de PVC e foram submetidos a realização de atividade física moderada com os daqueles que também receberam tais implantes mas não praticaram a referida atividade.

2.4 MATERIAL E MÉTODOS

2.4.1 Animais e *treinamento*

Foram utilizados 20 ratos machos adultos Wistar com aproximadamente 70 dias de idade no início do experimento, alimentados com ração balanceada padrão Purina, água *ad libitum* e mantidos em gaiolas coletivas a temperatura ambiente de 25°C e fotoperíodo de 12C:12E.

Os ratos foram distribuídos randomicamente nos seguintes grupos: sedentário (S), ratos que não realizaram exercícios físicos (n=10); treinado (T), ratos que realizaram exercícios físicos moderados (n=10). Aos 10 dias do início do treinamento (período de adaptação progressiva), os ratos sedentários e treinados foram submetidos à cirurgia de implante de esponja de PVC (polivinilcloro) e

recolocados nas gaiolas. O grupo T retornou ao esquema de exercício dois dias após o implante. Aos 5, 10, 15, 20 e 30 dias depois da realização da cirurgia, respectivamente, 2 ratos de cada grupo permaneceram em repouso por 24h e foram mortos.

Para o implante da esponja de PVC, os ratos foram anestesiados por inalação com éter etílico e tricotomizados na região mediana dorsal, onde foi realizada uma incisão cirúrgica perpendicular ao eixo da coluna vertebral. Após a divulsão dos tecidos subcutâneos foram implantadas esponjas de PVC, com 7,0 mm³ previamente autoclavadas, distando 4,0 mm da incisão para evitar interferência dos processos de cicatrização. Em seguida foi feita a sutura da incisão. Todos os procedimentos foram realizados em condições estéreis.

Os animais do grupo T realizaram natação com carga equivalente a 3% do peso corporal acoplada ao tórax, por 60 minutos diários, 5 dias por semana, por 30 dias. As sessões de natação foram iniciadas às 8:00h em recipiente de amianto (100cm x 70cm x 60cm) com coluna d'água de 40 cm, para evitar que os ratos apoiassem a cauda no fundo do recipiente. A temperatura da água foi mantida em $32 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Após o término das sessões de natação, os ratos foram enxutos e retornados às suas respectivas gaiolas em sala com temperatura de 25°C. Os animais S foram colocados na água, nas mesmas condições anteriores, aproximadamente 2 minutos por dia, para simular a manipulação dos animais T.

2.4.2 Análise Ultra-estrutural

Após a morte, os implantes de PVC foram removidos e fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,3 por 24h e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, seguindo desidratação em série graduada de acetona. O material foi incluído em resina Epon-Araldite e cortado em ultramicrótomo Sorvall Porter Blum MT2. Foi então contrastado com acetato de uranila e citrato de chumbo. O material foi analisado sob microscopia eletrônica de transmissão com microscópio eletrônico Phillips CM 100.

2.4.3 Análise Quantitativa

Os fibroblastos foram quantificados em cortes de 0.5 μm corados com Azul de Toluidina. Foram analisados e quantificados 15 campos para cada subgrupo (5S, 10S, 15S, 20S, 30S, 5T, 10T, 15T, 20T, 30T) através de um microscópio de luz Zeiss. Os resultados obtidos foram estatisticamente analisados pelo teste de ANOVA Two Way (análise de variância para dados amostrais independentes), com os fatores grupo (treinado e sedentário) e tempo (5, 10, 15, 20 e 30 dias), para $p < 0,01$.

2.5 RESULTADOS

2.5.1 Análise Ultra-estrutural

Os fibroblastos observados ao longo do experimento apresentam morfologias variadas, mas mantêm a característica típica deste tipo celular, com muitos prolongamentos citoplasmáticos e algumas organelas abundantemente desenvolvidas como, por exemplo, retículo endoplasmático rugoso, complexo de Golgi e mitocôndrias. O núcleo ocupa grande parte do volume celular, apresenta muitos poros e os nucléolos são facilmente observados. Uma rápida leitura das figuras 1 a 11 o ajudará a ter um painel ilustrativo do biotipo destas células, neste estudo.

Desde nossas primeiras observações, foram notados fibroblastos exibindo características de miofibroblastos - ainda com abundante retículo endoplasmático rugoso, mas expressando conjuntos de microfilamentos com elétrons-densidade similar àquela daqueles encontrados em células musculares lisas e núcleo apresentando indentações - que são observados com maior frequência até os 10 dias no grupo T e 15 dias no grupo S. Nas primeiras fases são também observadas pequenas vesículas de exocitose principalmente nas primeiras fases e sobretudo nos grupos S, enquanto que o grupo T apresenta depressões na membrana plasmática que lembram poros, que aparecem mais tardiamente no

grupo S (Figuras 1 e 2). Contudo, vale destacar, que ambos os processos são observados nos dois grupos.

As células tendem a ser mais volumosas no início da reparação e mais elípticas ao final do processo, contudo há presença de ambas as formas em todos os grupos (Figuras 3, 4, 5, 6, 7 e 8). Pode-se notar, no entanto, que as células do grupo T parecem ligeiramente precoces em relação ao grupo S. As figuras 7 e 8 ilustram esta situação.

Nas últimas fases estudadas, alguns fibroblastos foram observados reunindo-se em grupos de algumas células, ou pelo menos tornando os contatos entre si muito mais estreitos. Além disso, nestes mesmos períodos, fibroblastos que se encontram inseridos em densos depósitos de matriz extracelular apresentam-se com fenótipo característico de inatividade (Figuras 9, 10 e 11). Em contrapartida, foram observados, entre os 10 e 15 dias, principalmente no grupo treinado, alguns fibroblastos com características morfológicas de apoptose (figura 12).

Aparentemente, não há diferença identificável em nível ultra-estrutural no arranjo molecular das fibras colágenas depositadas por tais células. A acurácia da ultra-análise nos permite identificar a abundância de colágeno tipo I, seguido pelo tipo III. Entretanto, o arranjo de tais fibras na matriz extracelular difere grandemente entre o grupo T (organizado e orientado) e o grupo S (irregular), principalmente nos estágios finais de observação. Em cortes transversais, é possível observar que as fibras de colágeno tipo III dispõem-se paralelamente e em meio as fibras do tipo I no grupo T. No grupo S não observamos este arranjo. (Figuras 13, 14 e 15)

Apesar de não ter sido realizada uma mensuração específica, a contagem dos fibroblastos permitiu-nos observar que há um número maior de capilares no grupo T. Resolveu-se registrar tal fenômeno devido ao potencial efetivo na inflamação e reparação tecidual agora reconhecido nos pericitos, células que circundam estes vasos sanguíneos, e devido ao potencial angiogênico dos elementos da matriz extracelular (Veja as figuras 16, 17 e 18).

2.5.2 Análise quantitativa

O maior número de fibroblastos no grupo T foi observado aos 15 dias e no grupo S aos 20 dias (figura 19).

A análise de variância *ANOVA two-way*, cujas fontes de variabilidade na variável dependente (número de fibroblastos) são tempo (com 5 níveis: 5, 10, 15, 20, 30 dias) e o grupo (sedentário e treinado), detectou que não há interação significativa entre os fatores (T e G) e seus efeitos isolados são altamente significativos (tabela 1).

Dentro de cada intervalo as médias do grupo S foram consistentemente menores que as do grupo T (figura 20).

2.6 DISCUSSÃO

Nossas análises dos fibroblastos produziram um perfil destas células que está de acordo com aquele descrito por Moraes e Joazeiro (2005). A heterogeneidade morfológica relatada por Buckley et al., (2001) também foi verificada. Este autor relaciona ainda as diferenças morfológicas ao fato das células terem sido obtidas a partir de tecidos saudáveis e não saudáveis. No nosso caso, a atividade física não parece influenciar tais populações de fibroblastos e tanto o grupo T quanto o S possuem a mesma heterogeneidade populacional. Maiores diferenças são muitas vezes atribuíveis a diferentes alturas de corte.

Gui-ping et al. (2005) sugerem que os poros na superfície celular estejam relacionados à formação de pseudópodos. Por meio da análise de nossas imagens, consideramos esta inferência plausível. Porém, nos parece também bastante razoável que tais estruturas podem estar ligadas à secreção celular como o próprio autor comenta em seu trabalho.

A organização das células ao redor da esponja de PVC assemelha-se muito àquela descrita por Dolores et al. (2004) em implantes de próteses de silicone, com os fibroblastos constituindo o tipo celular mais abundante, seguido pelos

macrófagos, e confirmando que os processos celulares e até mesmo fisiológicos que são postos em andamento são realmente similares e permitem então fazer inferências úteis no entendimento destes tipos de reações.

A evidente diferença entre a deposição das fibras colágenas entre o grupo T e o grupo S pode ser uma importante evidência dos efeitos benéficos da atividade física moderada, uma vez que numerosos estudos têm mostrado que células podem perceber a organização tridimensional das proteínas fibrilares da matriz extracelular e que o fenótipo celular pode ser alterado por mudanças na composição e/ou organização das fibras da matriz (SOTTILE, 2004). Além disso, quando rodeados por uma rede de colágeno, os fibroblastos silenciam dramaticamente suas funções metabólicas, como divisão celular e síntese protéica (LEFÈVRE, et al., 1998; LEFÈVRE, et al., 2001). Desta forma, a deposição mais orientada e organizada exibida pelo grupo T, constitui um sinal potencial para que a atividade fibrótica dos fibroblastos cesse, possibilitando que a reparação tecidual se dê com maior qualidade. Lefèvre et al. (1998) ainda apontam redução de 45% de regiões organizadoras de nucléolo de fibroblastos cultivados em matrizes tridimensionais de colágeno. Tais observações estão de acordo com aquilo que encontramos, por exemplo, para os fibroblastos do grupo 30T, que estão mergulhados em uma densa matriz extracelular. Contudo, a análise ultra-estrutural não evidencia nenhuma diferença no arranjo molecular das fibras colágenas, como mostram Eyden e Tzaphlidou (2001) ao comparar tecidos sadios e patológicos.

Vários estudos indicam também que os fibroblastos e as moléculas da matriz extracelular por eles produzidas têm capacidade para atuar pró-angiogenicamente (SOTTILE, 2004). Steiner et al. (2005) afirmam que a prática regular de exercícios físicos aumenta o número de células progenitoras endoteliais circulantes. Apesar de não ser um objetivo inicial de análise, foi importante destacar em nossos resultados um maior número de vasos no grupo T, uma vez que com uma rede de capilares mais desenvolvida a oxigenação do tecido pode ser melhorada, e segundo Desmoulière e Gabbiani (1996) a hipoxia estimula a proliferação dos fibroblastos, o que pode levar a danos teciduais caso a atividade

fibrogênica seja continuamente estimulada. Desta forma, a prática da atividade física moderada, contribuindo por meio das vias descritas, para a melhor oxigenação do tecido, pode contribuir também para a regulação da população de fibroblastos e melhorar o processo da reparação tecidual.

Além do mais, com maior número de capilares no grupo T, tem-se um maior número de pericitos que podem participar ativamente do processo de reparação tecidual sintetizando também componentes da matriz extracelular ou diferenciando-se em outros tipos celulares sob a ação de fatores de crescimento. Atualmente, os pericitos vêm sendo considerados células oligopotentes com capacidade de se diferenciar em adipócitos, células fagocíticas e participam também da angiogênese e apresentação de antígenos, além de atuar no controle do movimento de fluidos, solutos, hormônios e outras moléculas através do endotélio microvascular e demonstrarem sintetizar proteínas da matriz extracelular, como fibronectina, laminina, colágeno e glicosaminoglicanos (HIRSCHI e D'AMORES, 1996; CHAKRAVARTHY e GARDINER, 1998; CHANTRAIN et al., 2006). Toda essa potencialidade pode, certamente, contribuir para a resolução da condição inflamatória.

Além da contribuição dos pericitos, é bastante importante a interação existente entre fibroblastos e mastócitos tanto no início do processo quanto ao final dele, auxiliando a condução do processo de inflamação e reparação tecidual desde a interação e recrutamento das células até a remodelação das fibras colágenas (BERTON et al., 2000; IBA et al., 2004).

Não há muitas fontes que mencionam o número de fibroblastos nas reações inflamatórias. Chang et al (2000) descreve o perfil clássico da cura de feridas, em um modelo de cicatrização ocular, e aponta o maior número de fibroblastos ao terceiro dia; Bleiberg (1985) de 10 a 14 dias, em um modelo de implante de matriz óssea desmineralizada e Tsirogianni et al (2006) de 7 a 14 dias, ao analisar aspectos gerais da participação do sistema imune durante as fases inicial e adaptativa, de regeneração e de reparação na cura de feridas. Em todos os modelos, a população de fibroblastos cresce continuamente até atingir o número máximo de células e decresce continuamente daí em diante.

Em nosso trabalho, o perfil populacional das células é bastante parecido. Mas nosso modelo reproduz uma situação de inflamação crônica, onde o agente inflamatório, a esponja de PVC, persiste. Tal situação possivelmente contribui para que o número de fibroblastos seja crescente por mais tempo. O pico dos fibroblastos ocorre aos 15 dias no grupo T e depois regride progressivamente. Isso deve refletir o auge da participação deste tipo celular na resposta inflamatória até a contração da lesão, com fenótipo miofibroblástico, e daí em diante o declínio celular, possivelmente com contribuição da apoptose, para uma população fibroblástica comprometida com a formação e remodelação da matriz e seria um indício da atividade benéfica da atividade física moderada, tornando o processo de recuperação mais ágil, uma vez que o maior acúmulo populacional no grupo S ocorre aos 20 dias, observado o espectro do nosso delineamento experimental.

Diante disso, o pico numérico dos fibroblastos do grupo T precedente em relação ao do grupo S e a população mais abundante destas células no grupo T, em relação ao grupo S, para todos os níveis de análise contidos em cada grupo são bons indícios de que a atividade física moderada contribui significativamente para o desenvolvimento do processo inflamatório e da reparação tecidual.

O número maior de fibroblastos encontrados no grupo T deve ser decorrente dos efeitos dos produtos metabólicos gerados pela atividade física moderada e pela interação direta com as demais células que tomam parte nesse processo e seus produtos, uma vez que elas também estão em maior número no grupo T. Apesar das análises estatísticas detectarem que os efeitos isolados dos fatores T e G são significativos, o tempo é igual para ambos os grupos e eles diferem quanto a prática ou não de exercícios, ou seja, a diferença numérica existente pode ser atribuída aos efeitos da prática da atividade física moderada.

Muitas são as especulações na literatura sobre que fatores levariam os fibroblastos (miofibroblastos) à apoptose. Desmoulière e Gabbiani (1996) apontam para: (1) as citocinas que estão presentes durante o processo de cura da ferida e que têm seus níveis diminuídos quando a situação se resolve, justificando então a morte celular supondo que ao menos uma parcela dos miofibroblastos seja citocina-dependente; (2) fatores que são liberados após a epitelização ser

completada e causariam a morte de fibroblastos seletivamente; (3) subpopulações de fibroblastos não comprometidas com a diferenciação em miofibroblastos, mas sim com o controle celular, induziriam propiciamente a morte dos miofibroblastos. Vigo et al (2006) reforçam o papel importante que a remodelação da matriz extracelular teria na apoptose. Uma vez que a ferida tenha sido fechada, segue-se a remodelação da matriz extracelular, que envolve a secreção de proteases por outra subpopulação de fibroblastos. Os fragmentos peptídicos produzidos podem então induzir os miofibroblastos a apoptose ligando-se e ativando a caspase-3 no interior da célula. Pela situação apresentada em nossas análises, nos parece possível que haja interação entre essas propostas (a ausência de sinalizadores para sobrevivência aliada à presença de fatores que induzem a morte) levando ao desencadeamento da apoptose.

Na literatura consultada são poucas as referências à fusão de fibroblastos. Driesen et al. (2005) relatam a fusão parcial de fibroblastos a cardiomiócitos, *in vitro*, e atribuem a este fenômeno a função de comunicação celular. Chanson et al. (2005) ressaltam a importância da comunicação celular em quadros de inflamação, onde as junções tipo *gap* desempenham um papel muito importante na transmissão da informação sobre o estado funcional da célula à suas vizinhas, inclusive respondendo adequadamente ao estímulo apoptótico, protegendo-as contra os estímulos inflamatórios. Clark (1996) associa a união dos fibroblastos (miofibroblastos) uns aos outros a um sistema propagador de forças, tornando, assim, a contração e a remodelação da matriz extracelular da lesão mais eficiente e homogênea. No caso em que as células apresentam-se sob uma única massa citoplasmática, como no caso dos fibroblastos do grupo 30T, mais do que comunicação celular e propagação de forças, poderia-se propor que esta é uma via da resolução do processo de inflamação e reparação tecidual, contribuindo para o decréscimo da celularidade no local da injúria e restabelecendo a homeostase tecidual.

2.7 CONCLUSÃO

A partir de nossas análises podemos concluir que o número de fibroblastos é maior no grupo treinado do que no sedentário; a deposição de matriz extracelular é mais organizada no grupo T, no sentido que as fibras colágenas I e III dispõem-se em arranjos e seguem paralelamente; o número de capilares é maior no grupo T e, por consequência, há um número maior de pericitos que podem colaborar efetivamente para a resolução deste processo; e finalmente que a atividade física moderada influencia significativamente o potencial de ação dos fibroblastos nas inflamações crônicas.

2.8 LITERATURA CITADA

AKGUL, C., EDWARDS, S. W. Regulation of neutrophil apoptosis via death receptors. **Cell Mol Life Sci**, v. 60, n. 11, p. 2402-2408. 2003.

AMEMIYA, T.; DAKE, Y. Granuloma after augmentation of the eyelids with liquid silicone: an electron microscopic study. **Ophthal Plast Reconstr Surg**, v.10, n. 1, p. 51-56. 1994.

BAUGH, J. A.; DONNELLY, S. C. Macrophage migration inhibitory factor: a neuroendocrine modulator of chronic inflammation. **J Endocrinol**, v. 179, n.1, p. 15-23. 2003.

BERTON, A.; LEVI-SCHAFFER, F.; EMONARD, H.; GARBUZENKO, E.; GILLERY, P.; MAQUART, F.-X. Activation of Fibroblasts in collagen lattices by mast cell extract: a model of fibrosis. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 30, n. 3, p. 485-492. 2000.

BLEIBERG, I. Colony forming cell-fibroblast development in extracellular matrix-induced bone and bone marrow formation in rat. **Connective Tissue Research**, v. 14, n. 2, p. 121-127. 1985.

BUCKLEY, C. D.; PILLING, D.; LORD, J. M.; AKBAR, A. N.; SCHELL-TOELLNER, D.; SALMON, M. Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. **Trends in Immunology**, v. 22, n. 4, p. 199-203. 2001.

CABRERO, A.; LAGUNA, J. C.; VAZQUEZ, M. Peroxisome proliferator-activated receptors and the control of inflammation. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v.1, n. 3, p. 243-248. 2002.

CHANG, L.; CROWSTON, J. G.; CORDEIRO, M. F.; AKBAR, A. N.; KHAW, P. T. The role of the immune system in conjunctival wound healing after granuloma surgery. **Survey of Ophthalmology**, v. 45, n. 1, p. 49-68.

CHAKRAVARTHY, U.; GARDINER, T. A. Endothelium-derived agents in pericyte function/dysfunction. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 18, n. 4, p. 511-527. 1999.

CHANSON, M.; DEROUETTE, J-P.; ROTH, I.; FOGLIA, B.; SCERRI, I.; DUDEZ, T.; KWAK, B. R. Gap junctional communication in tissue inflammation and repair. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1711, n. 2, p. 197-207. 2005.

CHANTRAIN, C. F.; HENRIET, P.; JODELE, S. EMONARD, H.; FERON, O.; COURTOY, P. J.; DECLERCK, Y. A.; MARBAIX, E. Mechanisms of pericyte recruitment in tumour angiogenesis: A new role for metalloproteinases. **European Journal of Cancer**, v. 42, n. 3, p. 310-318. 2006.

CLARK, R. A. F. Wound Repair: Overview and General Considerations. In: CLARK, R. A. F. (Org.). **The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair**. New York : Plenum Press, 1996. p. 3 – 50.

CURI, R.; LAGRANHA, C. J.; DOI, S. Q.; SELLITTI, D. F.; PROCOPIO, J.; PITÓN-CURI, T. C.; CORLESS, M.; NEWSHOLME, P. Molecular mechanisms of glutamine action. **Journal Of Cellular Physiology**, v. 204, n. 2, p. 392-401. 2005.

DESMOULIÈRE, A.; GABBIANI, G. The role of the myofibroblast in wound healing and fibroconnective diseases. In: CLARK, R. A. F. (Org.). **The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair**. New York : Plenum Press, 1996. p. 391-423.

DOLORES, W.; CHTISTIAN, R.; HARALD, N.; HILDEGUNDE, P.; GEORG, W. Cellular and molecular composition of fibrous capsules formed around silicone breast implants with special focus on local immune reactions. **Journal of Autoimmunity**, v. 23, n. 1, p. 81-91. 2004.

DRIESEN, R.B.; DISPERSYN, G. D.; VERHEYEN, F. K.; VAN DEN EIJNDE, S. M.; HOFSTRA, L.; TONÉ, F.; DIJKSTRA, P.; DEBIE, W.; BORGERS, M.; RAMAEKERS, F. C. S. Partial cell fusion: A newly recognized type of communication between dedifferentiating cardiomyocytes and fibroblasts. **Cardiovascular Research**, v.68, n. 1, p. 37-46. 2005.

EYDEN, B.; TZAPHLIDOU, M. Structural variations of collagen in normal and pathological tissues: role of electron microscopy. **Micron**, v. 32, n. 3, p. 287-300. 2001.

FIELD, C J; GOUGEON, R; MARLISS, E B. Circulating Mononuclear Cell Numbers and Function During Intense Exercise and Recovery. **J Appl Physiol**, v. 71, n. 3, p. 1089-1097, 1991.

GRIP, O.; JANCIAUSKIENE, S.; LINDGREN, S. Macrophages in inflammatory bowel disease. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v. 2, n. 2, p. 155-160. 2003.

GUI-PING, Y; LI-RUI, D.; TAO, X.; XIAN-HUI, H.; HUAN, Q.; LI-HUI, X.; XIAO-DONG, C.; SHENG-QIU, F.; ZAI-QING, Y. One in vitro model for visceral adipose-derived fibroblasts in chronic inflammation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.333, n.3, p.850-857. 2005.

HIRSCHI, K. K.; D'AMORE, P. Pericytes in the microvasculature. **Cardiovascular Research**, v. 32, n. 4, p. 687-698. 1996.

IBA, Y.; SHIBATA, A.; KATO, M.; MASUKAWA, T. Possible involvement of mast cells in collagen remodeling in the late phase of cutaneous wound healing in mice. **International Immunopharmacology**, v. 4, n. 14, p. 1873-1880. 2004.

KOYAMA, K; KAYA, M; TSUJITA, J; HORI, S. Effects of Decreased Plasma Glutamine Concentrations on Peripheral Lymphocyte Proliferation in Rats. **Eur Appl Physiol**, v. 77, n. 1-2, p. 25-31. 1998.

KURKINEN, M. Sequential Appearance Of Fibronectin And Collagen In Experimental Granulation Tissue. **Lab Invest**, v.43, n. 1, p. 47-51. 1980.

LEFÈVRE, F.; LORENZATO, M.; GEORGES, N.; CLAVEL, C.; BIREMBAUT, P.; GILLERY, P. Decreasead number of nucleolar organizing regions in collagen lattice cultered fibroblasts. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie**, v. 321, n. 12, p. 991-997, 1998.

LEFÈVRE, F.; GARNOTEL, R.; GEORGES, N.; GILLERY, P. Modulation of Collagen Metabolism by the Nucleolar Protein Fibrillarin. **Experimental Cell Research**, v. 271, n. 1, p. 84-93. 2001.

LOWDER, T.; PADGETT, D. A.; WOODS, J. A. Moderate exercise protects mice from death due to influenza virus. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 19, n. 5, p. 377-380. 2005.

MAACK, T. Receptor of Atrial Natriuretic Factor. **Annu Rev Physiol**, v. 54, p. 11-27. 1992.

MORAES, S. G.; JOAZEIRO, P.P. Fibroblasto. In: Carvalho, H. F.; Collares-Buzato, C. B. (Org.). **Células: uma abordagem multidisciplinar**. Barueri: Ed. Manole, 2005. p. 22-33.

NAGAI, H.; ABE, T.; YAMAGUCHI, I.; MITO, K.; TSUNEMATSU, M.; KIMATA, M.; INAGAKI, N. Role of mast cells in the onset of IgE-mediated late-phase cutaneous response in mice. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.106, n. 1, sup. 1, p. s 91-s98. 2000.

NIEMAN, D. C. Exercise, Infection and Immunity. **Int J Sports Med**, v. 15, sup. 3, p. s131-141. 1994.

NIEMAN, D. C. Exercises Immunology: integration and regulation. **Int J Sports Med**, v. 19, sup. 3, p. s171. 1998.

NORDBORG, C.; NORDBORG, E.; PETURSDOTTIR, V. The pathogenesis of giant cell arteritis: morphological aspects. **Clin Exp Rheumatol**, v. 18, n. 4, sup. 20, p. S18-21. 2000.

PEACOCK, E. E.; VANWINKLE, W. **Wound Repair**, 3rd ed., WB Saunders, 1985. p. 55-56.

PEIJIE, C.; HONGWU, L.; FENGPENG, X.; JIE, R.; JIE, Z. Heavy load exercise induced dysfunction of immunity and neuroendocrine responses in rats. **Life Sciences**, v. 72, n. 20, p. 2255-2262. 2003.

RAULIN, C.; GREVE, B.; HARTSCHUH, W.; SOEGDING, K. Exudative Granulomatous Reaction to Hyaluronic Acid (Hylaform). **Contact Dermatitis**, v. 43, n. 3, p. 178-179. 2000.

RICHES, D. W. H. Macrophage Involvement in Wound Repair Remodeling and Fibrosis. In: CLARK, R. A. F. (Org.). **The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair**. New York : Plenum Press, 1996. p. 95-141.

ROBERTS, C. K.; WON, D.; PRUTHI, S.; LIN, S. S.; BARNARD, R. J. Effect of a diet and exercise intervention on oxidative stress, inflammation and monocyte adhesion in diabetic men. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.73, n. 3, p. 249–259, 2006.

RONDO, J. W.; VIDARTE, G.; MICHALANY, N. Histologic study of the skin with gold thread implantation. **Plast Reconstr Surg**, v. 97, n.1, p.256-258. 1996.

SMITH, J. A. Exercises Immunology And Neutrophilis. **Int J Sports Med**, v.18, sup.1, p. s46-s55. 1997.

SOTTILE, J. Regulation of angiogenesis by extracellular matrix. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1654, n. 1, p. 13-24. 2004.

STEINER, S.; NIESSNER, A.; ZIEGLER, S.; RICHTER, B.; SEIDINGER, D.; PLEINER, J.; PENKA, M.; WOLZT, M.; HUBER, K.; WOJTA, J.; MINAR, E.; KOPP, C. W. Endurance training increases the number of endothelial progenitor cells in

patients with cardiovascular risk and coronary artery disease. **Atherosclerosis**, v. 181, n. 2, p. 305-310. 2005.

STERNFELD, B. Cancer and the Protective Effect of Physical Activity: The Epidemiological Evidence. **Med Sci Sports Exer**, v. 24, n. 11, p. 1195-1209. 1992.

THOMSEN, P.; GRETZER, C. Macrophage interactions with modified material surfaces. **Current Opinion in Solid State and Material Science**, v. 5, n. 2-3, p. 163-176. 2001.

TSIROGIANNI, A. K.; MOUTSOPOULOS, N. K.; MOUTSOPOULOS, M. H. Wound healing: Immunological aspects. **Injury**, v. 37, n. 1, s. 1, p. S5-S12. 2006.

VIGOR, C.; ROLFE, K. J.; RICHARDSON, J.; BAKER, R.; GROBBELAAR, A.; LINGE, C. The involvement of the ECM and RGD peptides in apoptosis induction during wound healing. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, v. 59, n. 9, p. S4. 2006.

WALKER, A.; WARD, C.; DRANSFIELD, I.; HASLETT, C.; ROSSI, A. G. Regulation of Granulocyte Apoptosis by Hemopoietic Growth Factors, Cytokines and Drugs: Potential Relevance to Allergic Inflammation. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v.2, n. 4, p. 339-347. 2003.

WELCH, M. P.; ODLAND, G. F.; CLARK, R. A. Temporal Relationships Of F-Actin Bundle Formation, Collagen And Fibronectin Matrix Assembly, And Fibronectin Receptor Expression To Wound Contraction. **J Cell Biol**, v. 110, n. 1, p. 133-145. 1990.

WOODS, J A; CEDDIA, M A; KOZAK, C; WOLTERS, B W. Effects Of Exercise On Macrophage MHC II Response to Inflammation. **Int J Sports Med**, v. 18, n. 6, p. 483-488. 1997.

WOODS, J. A.; CEDDIA, M. A.; ZACK, M. D.; LOWDER, T. W.; LU, Q. Exercise training increases the naïve to memory T cell ratio in old mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 17, n. 5, p. 384-392. 2003.

YANAGIHARA, M.; FUJII, T.; WAKAMATU, N.; ISHIZAKI, H.; TAKEHARA, T., NAWATE, K. Silicone Granuloma on the Entry Points of Acupuncture, Venepuncture and Surgical Needles. **J Cutan Pathol**, v. 27, n. 6, p. 301-305. 2000.

2.9 APÊNDICE

figuras, gráficos e tabelas

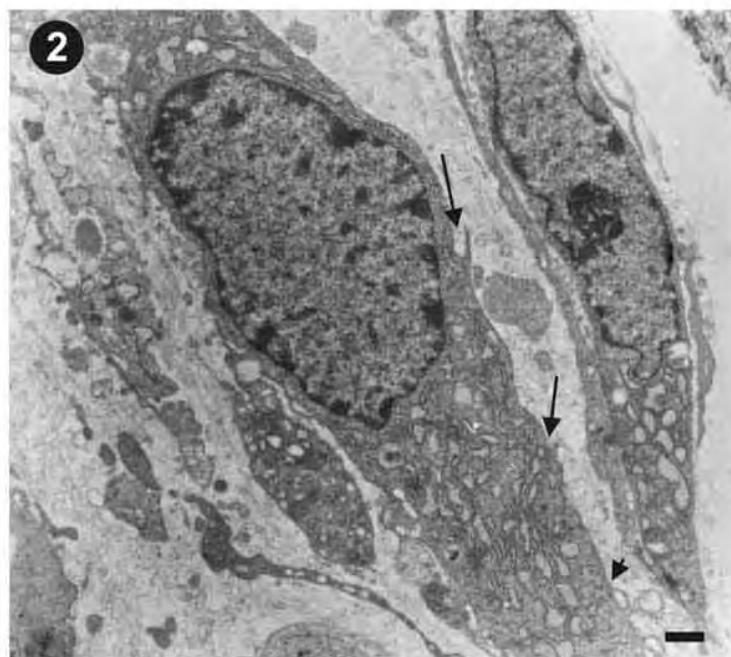
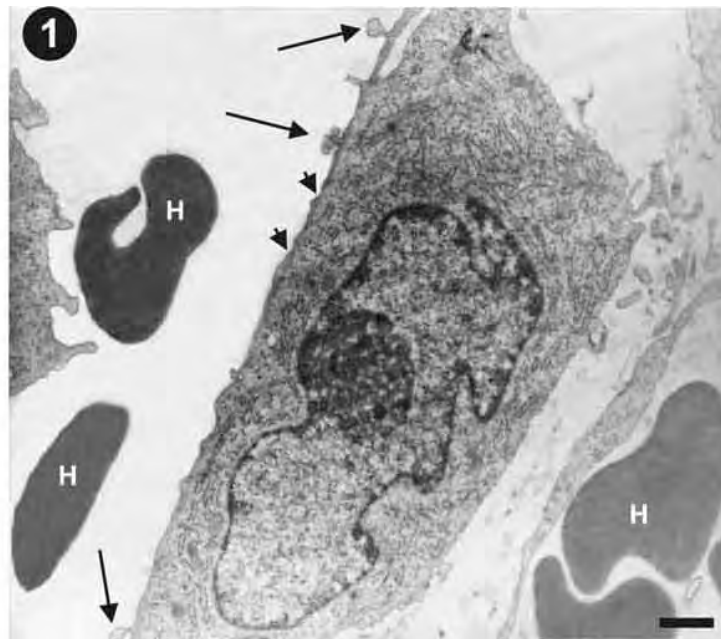


Figura 1. Morfologia típica de um fibroblasto. Esta célula do grupo 5S apresenta um núcleo grande, com proeminente nucléolo, o citoplasma todo tomado pelo retículo endoplasmático rugoso e o brotamento de vesículas (seta). Tais características dão idéia da intensa atividade de síntese protéica em andamento. As cabeças de seta apontam os "pacotes" de microfilamentos, caracterizados por sua elétron-densidade maior. Hemácea (H). Barra 1 μm .

Figura 2. Esta figura apresenta células do grupo 5T. A diferença na morfologia dos fibroblastos pode ser produto da altura de corte. Contudo, as características típicas estão presentes. Ainda assim, pode-se observar que as cisternas do retículo endoplasmático rugoso têm maiores diâmetros e não se notam vesículas de secreção; ao contrário, algumas depressões na membrana plasmática, lembrando poros, são observados (seta). A cabeça de seta aponta os "pacotes" de microfilamentos, caracterizados por sua elétron-densidade maior. Barra 1 μm .

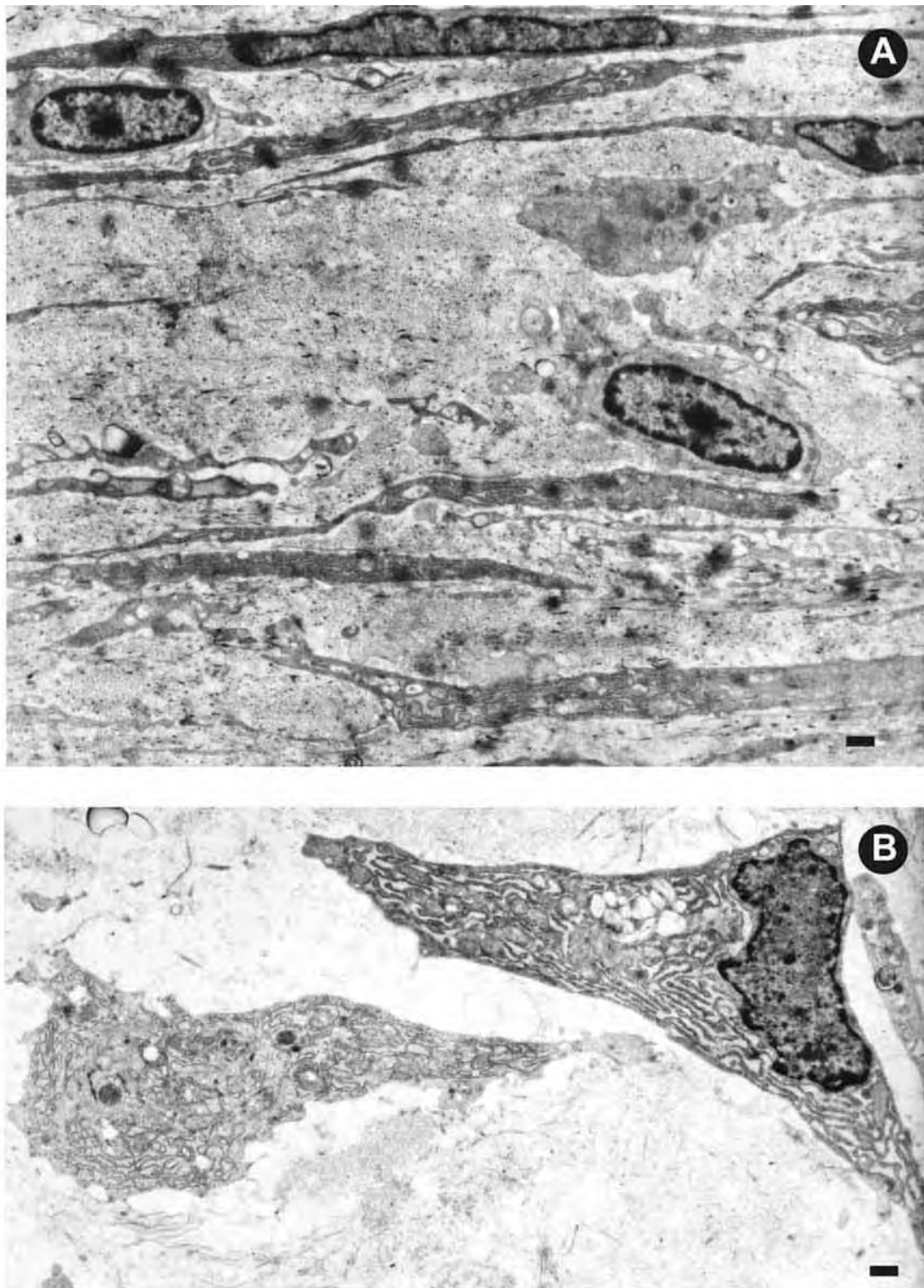


Figura 3. Esta figura ilustra a diversidade morfológica encontrada entre os fibroblastos, ainda que dentro de um mesmo grupo, nesse caso, o 10 S. Em A, os fibroblastos apresentam-se fusiformes e têm menor volume em relação a B, onde o núcleo e o retículo endoplasmático rugoso preenchem grande parte do volume celular. Barra 1 μm .

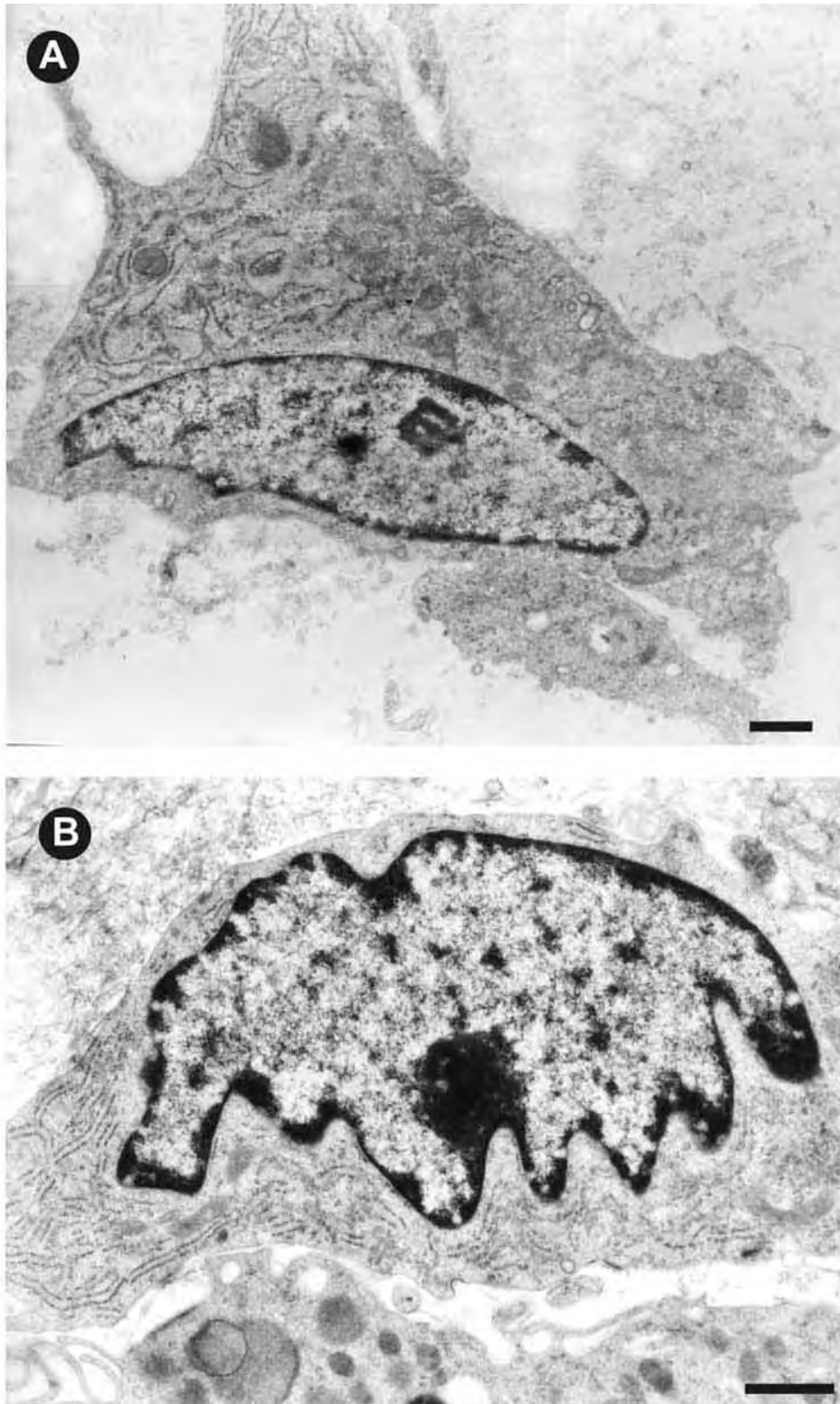


Figura 4. Esta figura também põe em evidência a diversidade de forma dos fibroblastos, agora no grupo 10T. Note a diferença morfológica dos núcleos em A e B e a reciprocidade existente entre a morfologia do núcleo e da célula como um todo. Barra 1 μm .

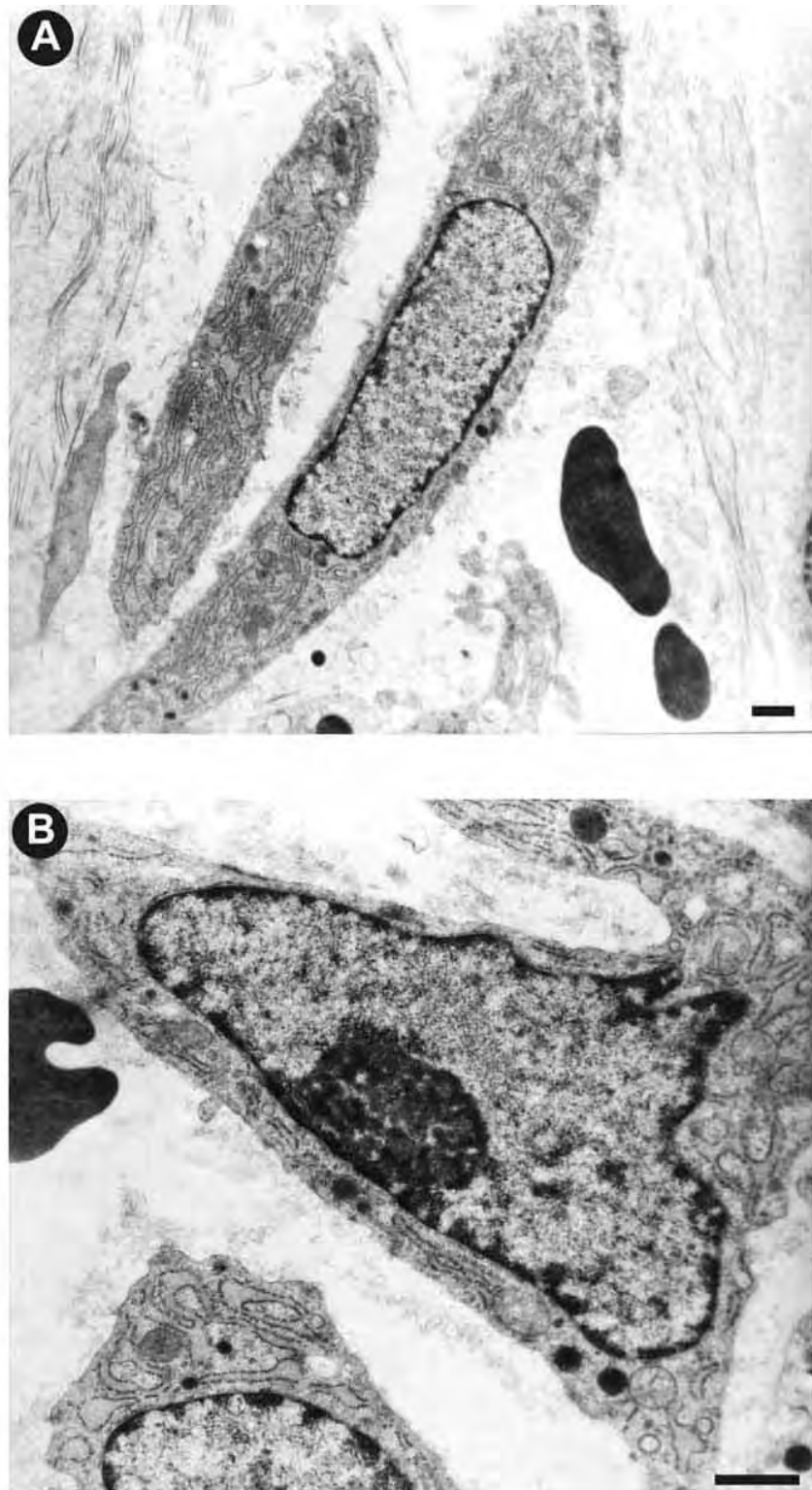


Figura 5. Fibroblastos do grupo 15S: fusiformes em A e cuneiformes em B. Geralmente atribui-se a formologia cuneiforme (ou triangular) à células em alta atividade metabólica. Frequentemente, os fibroblastos que se apresentam cuneiformes possuem um nucléolo desenvolvido e localizado junto à membrana nuclear, como mostrado em B. Barra 1 μm .

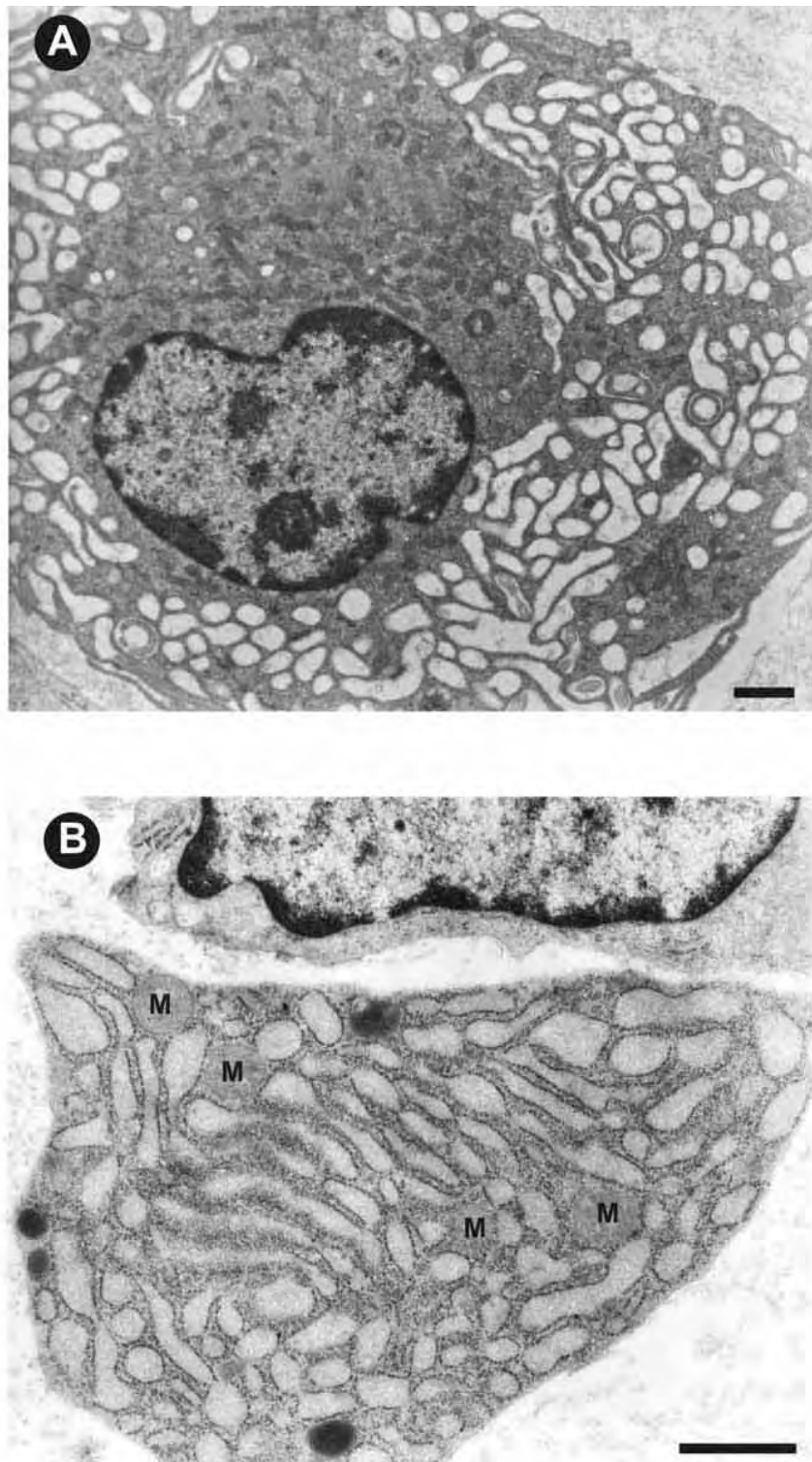


Figura 6. Esta figura ilustra aspectos interessantes de fibroblastos do grupo 15T em intensa atividade. Em A, a rica profusão de prolongamentos citoplasmáticos. Em B, detalhe do grande desenvolvimento e abundância do retículo endoplasmático rugoso dilatado e mitocôndrias por entre eles (M). Barra 1 μ m.

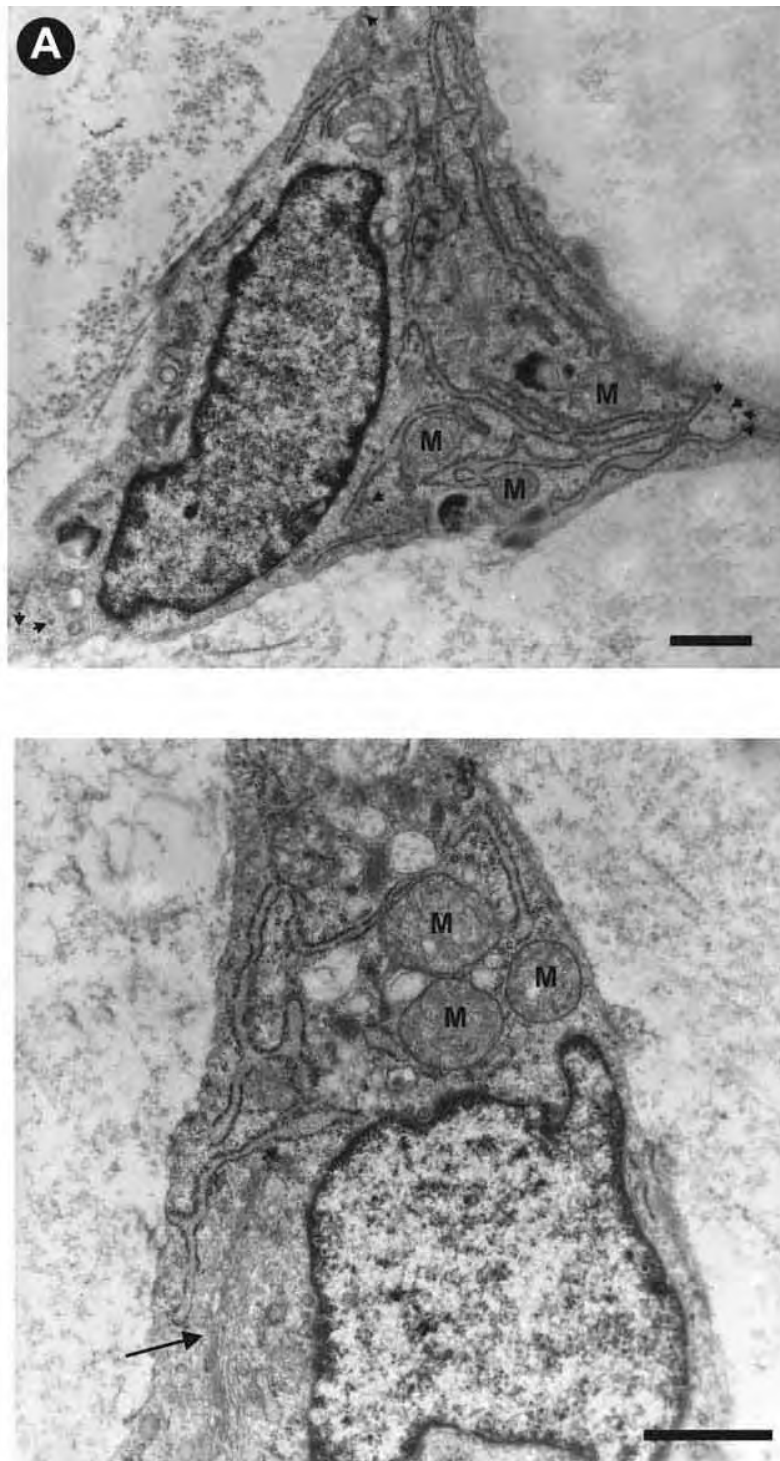


Figura 7. Estes fibroblastos do grupo 20S ilustram a morfologia de células secretoras em intensa atividade de síntese. Os núcleos destes fibroblastos apresentam cromatina frouxa, apenas condensada perinuclearmente. O retículo endoplasmático rugoso é bastante desenvolvido, com cisternas bastante volumosas. Em A, as cabeças de seta apontam polissomos livres. Em B, a seta aponta o Complexo de Golgi amplamente desenvolvido e M identifica grandes mitocôndrias. Barra 1 μm .

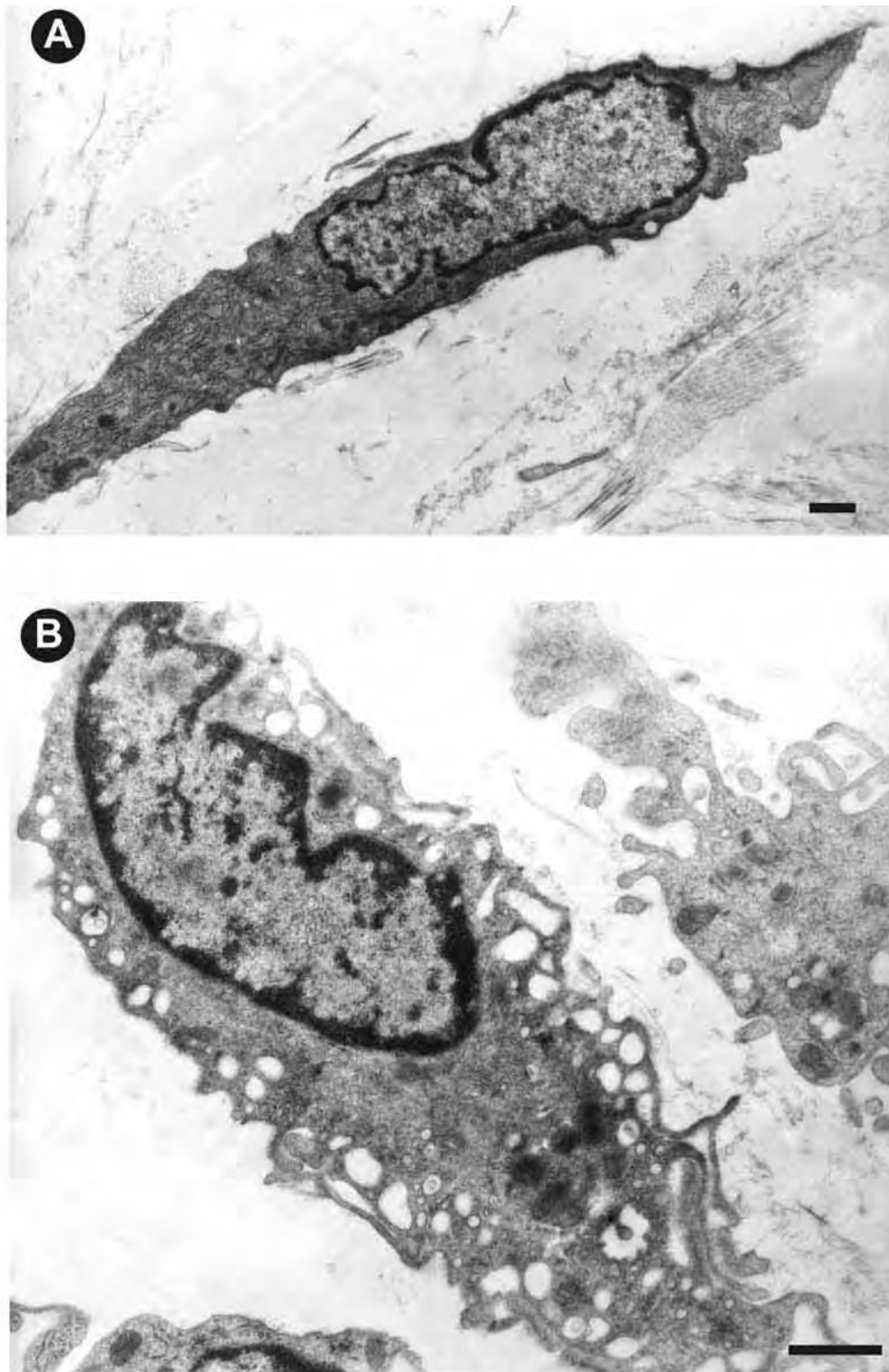


Figura 8. Mesmo em nossas últimas observações, ilustradas aqui pelo grupo 20T, podemos perceber que a variedade morfológica dos fibroblastos persiste. A e B mostram fibroblastos cujos perfis morfológicos já se apresentam consideravelmente fusiformes, as alterações do conteúdo citoplasmático e da organização do núcleo nos dão indícios da senescência deste tipo celular. Barra 1 μm .

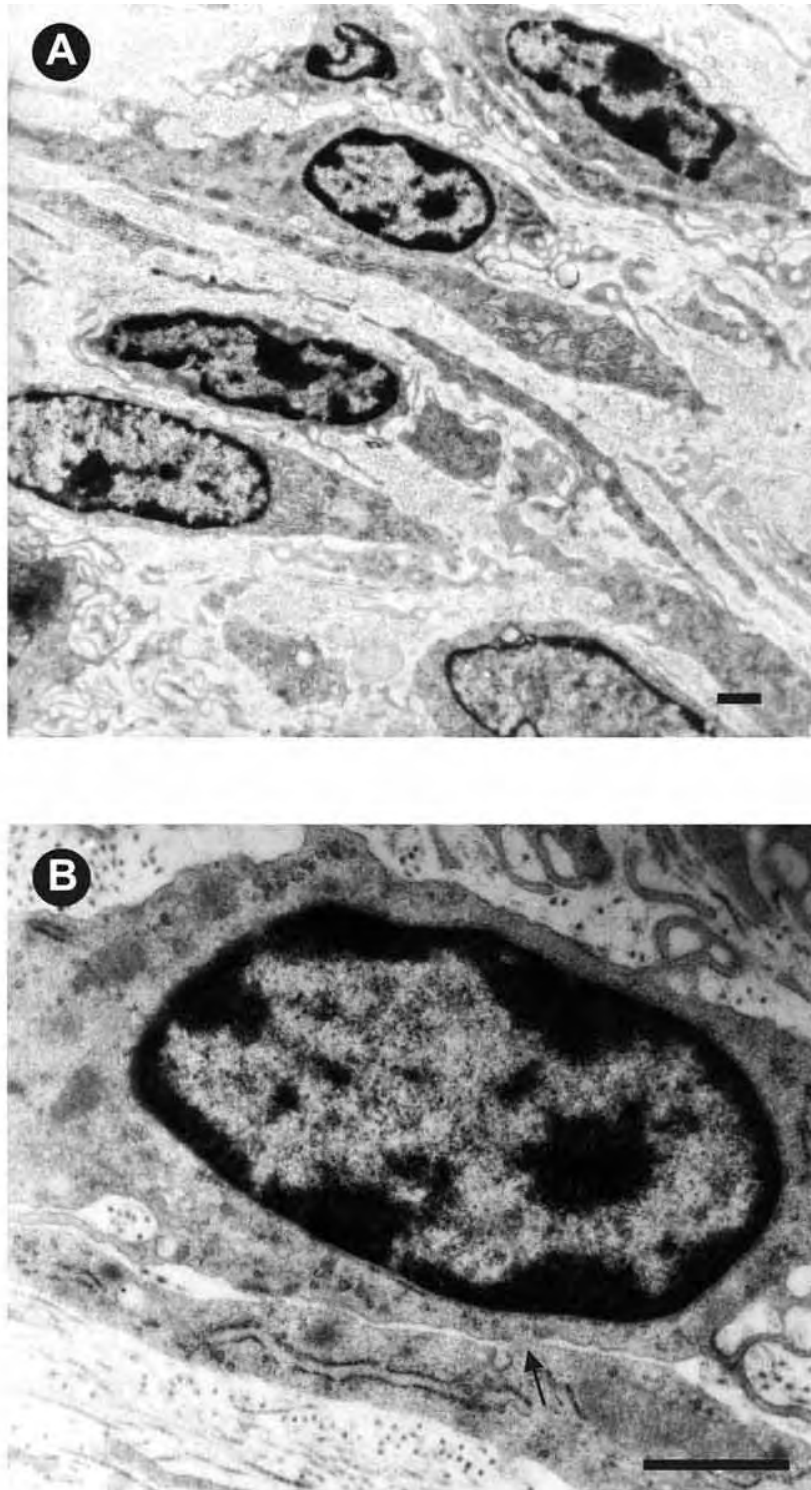


Figura 9. A mostra fibroblastos do grupo 30T.. Note, em B (detalhe de A), o ponto em que as membranas plasmáticas das duas células fundem-se (seta). Barra 1 μm .

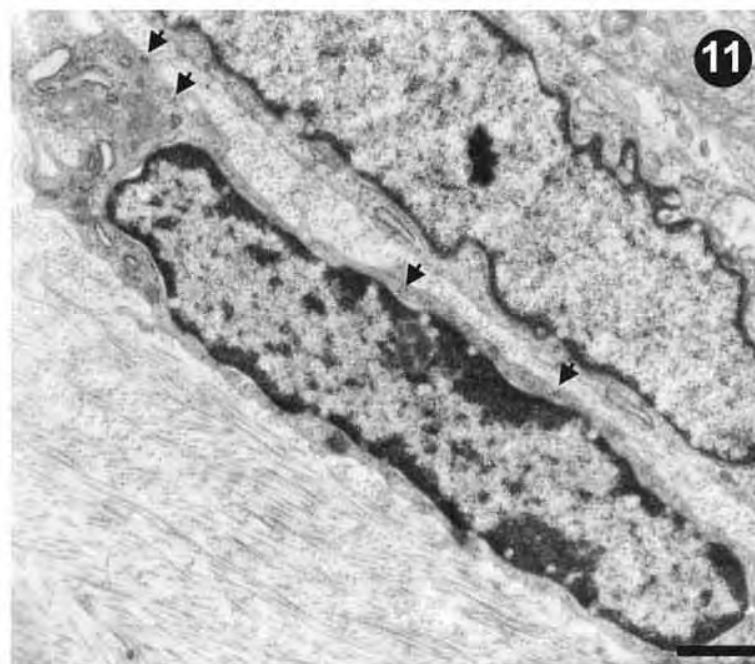
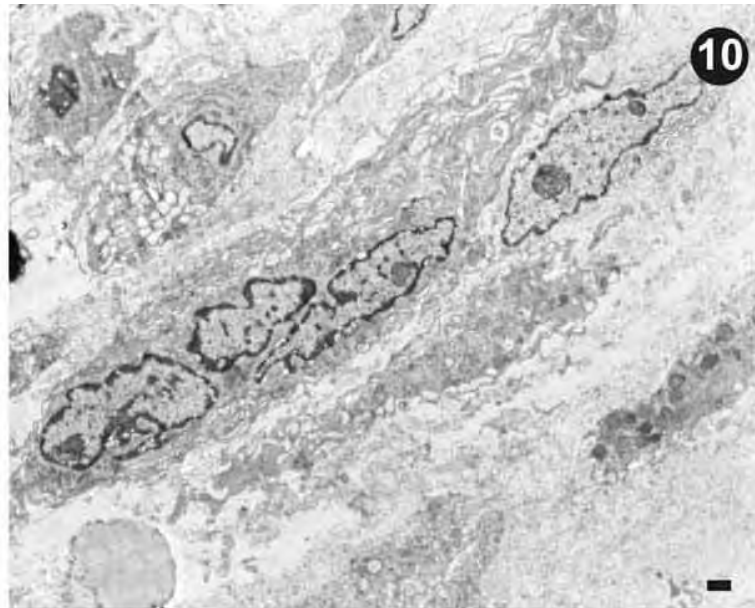


Figura 10. Fibroblastos do grupo 30T. Apesar de podermos distinguir os núcleos, não é possível estabelecer os limites da membrana plasmática, caracterizando a fusão destas células. Note como a morfologia e os componentes citoplasmáticos mostram-se alterados, não correspondendo ao padrão clássico estabelecido para estas células. Barra 1 μm .

Figura 11. Detalhes de fibroblastos do grupo 30T. A morfologia exibida por estas células permitiriam classificá-las como fibrócitos. Note que ao invés de possuir retículo endoplasmático rugoso muito desenvolvido, uma característica de células que secretam proteínas, estas células possuem muitos polissomos livres (cabeças de seta), tendo desta forma sua produção de proteínas destinada muito mais para sua própria demanda que para a exportação. Perceba que estas células sofrem alterações também em seu comprimento, que torna-se menor, e até na organização do nucléolo, além de ter drasticamente diminuída a razão citoplasma/núcleo. Barra 1 μm .

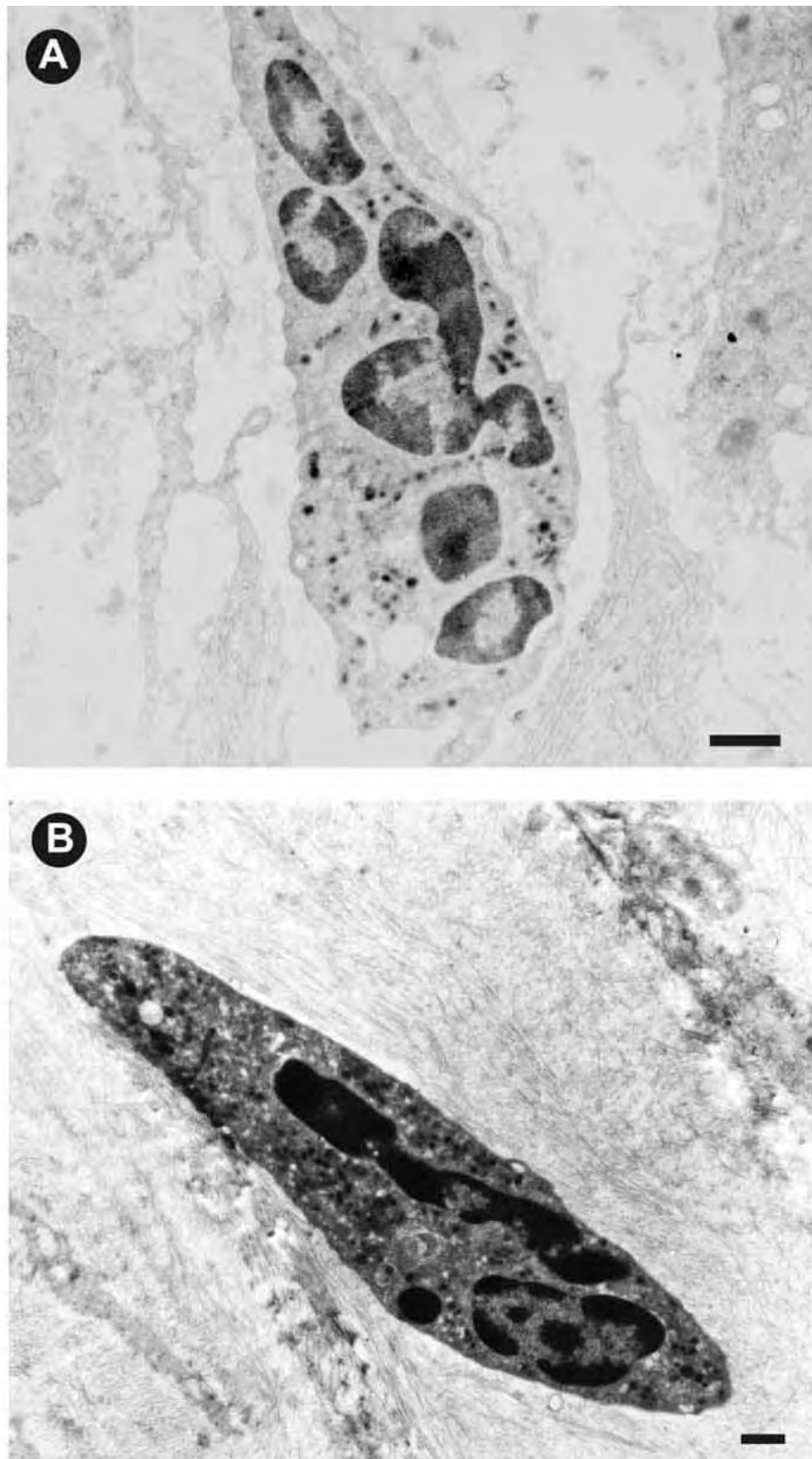


Figura 12. A (10T) e B (15T) mostram fibroblastos em apoptose, ilustrando o fim da fase de contração do tecido e declínio do número de células, principalmente daquelas que exibem o fenótipo de miofibroblastos. Como ilustrado em figuras anteriores, algumas células podem voltar a exibir o fenótipo inativo após o acúmulo de colágeno. Barra 1 μ m.

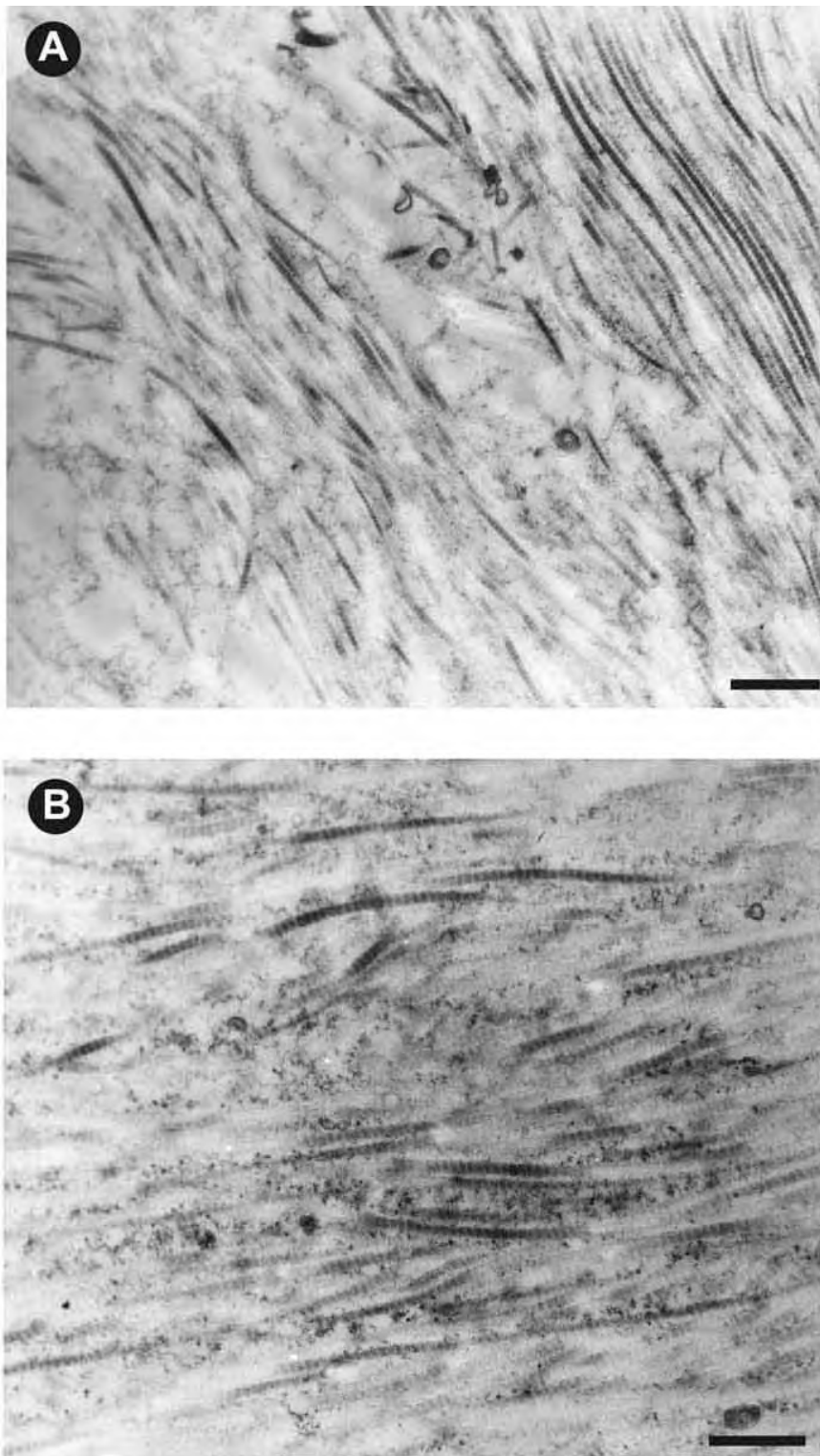


Figura 13. No início do processo praticamente não se observam diferenças do ponto de vista organizacional nos elementos fibrilares da matriz extracelular.. Compare a figura A, do grupo 5S, com a figura B, do grupo 5T. Barra 1 μ m.

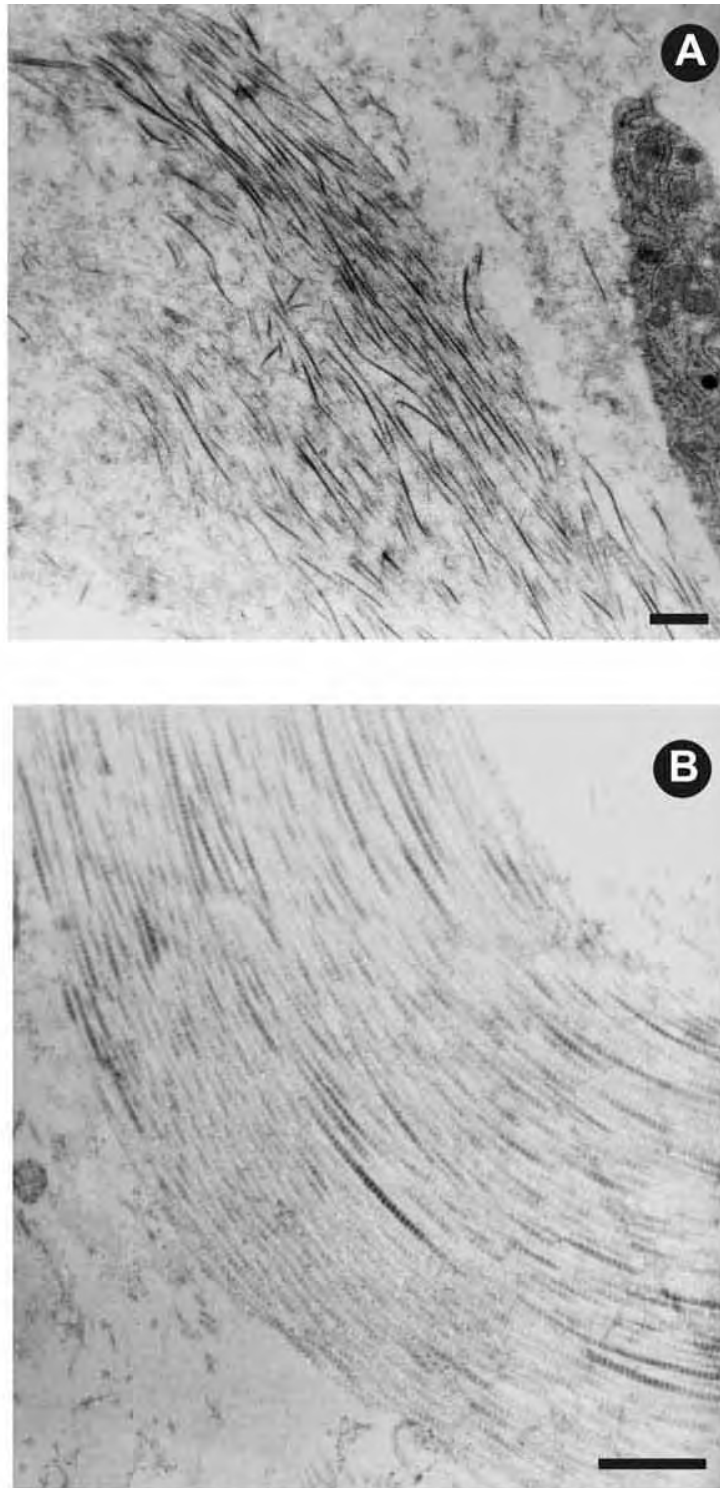


Figura 14. Neste estágio, a diferença organizacional das fibras da matriz extracelular entre os dois grupos já pode ser notada. A figura B, do grupo 15T exibe organização das fibras colágenas paralelas e unidirecionalmente, enquanto o grupo 15S, figura A, apesar da tendência direcional, não possui a mesma homogeneidade na organização. Barra: 1 μm .

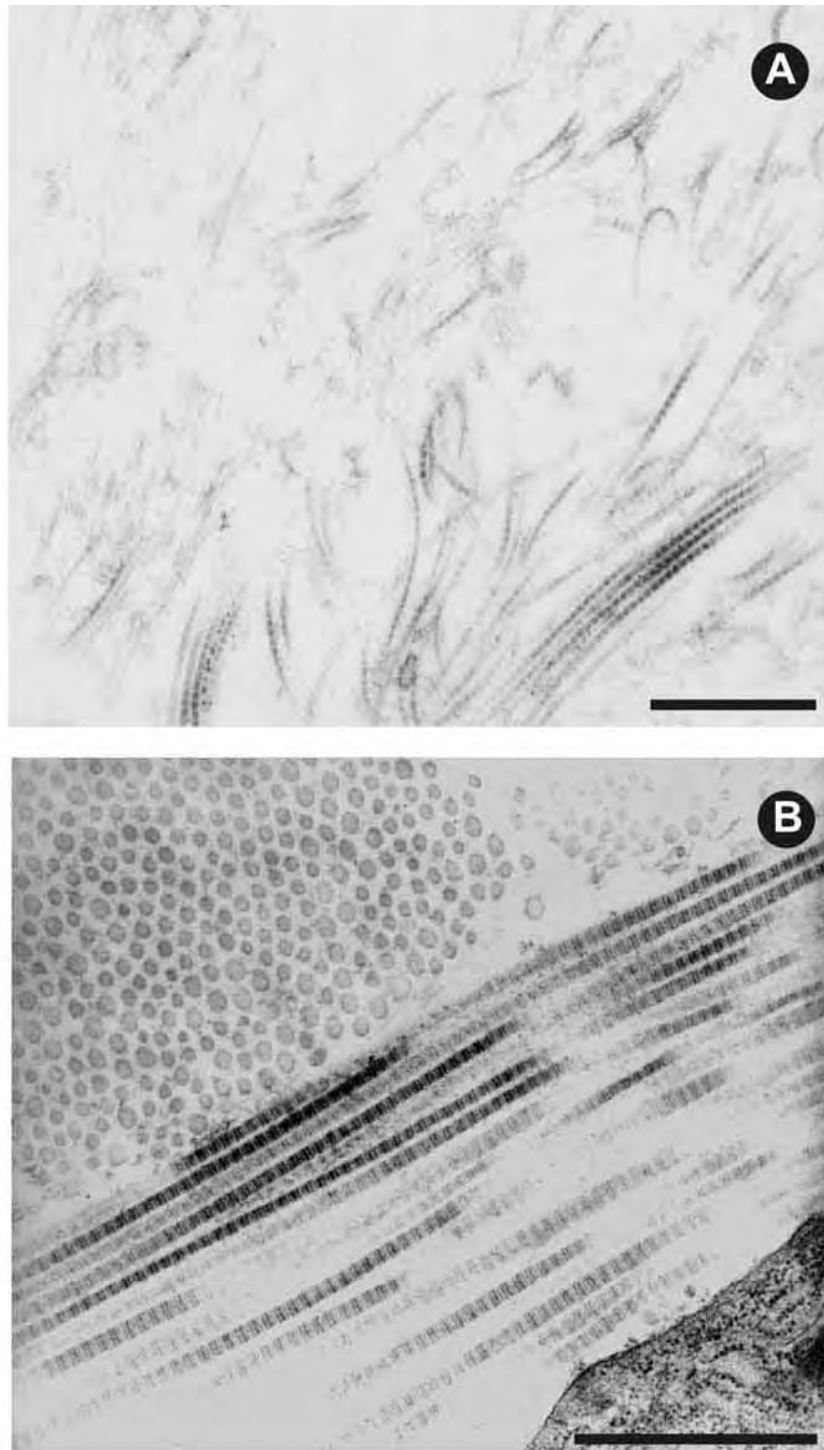


Figura 15. A=20S. B=20T. Aqui se ilustra a maior diferença encontrada, do ponto de vista organizacional dos elementos fibrilares dos grupos. Enquanto na figura A o grupo 20S exibe um aspecto bastante irregular, com fibras colágenas e reticulares desalinhadas, na figura B o grupo 20T exibe um arranjo direcional, paralelo e uniforme, inclusive com as fibras reticulares (pontuais) paralela e homogeneamente dispostas em relação as colágenas (de diâmetro maior), evidenciado pelo corte transversal. Barra: 1 μ m.

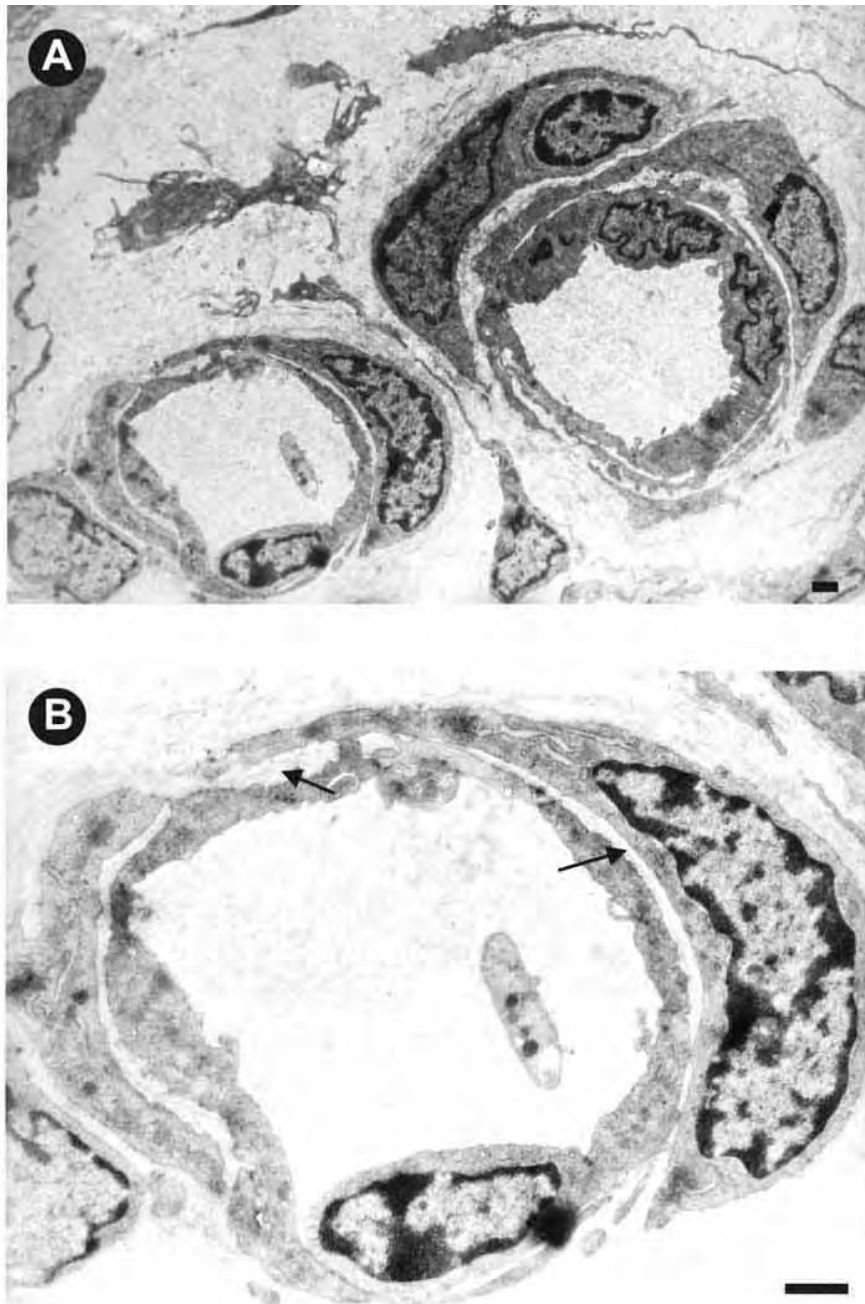


Figura 16. Capilares sanguíneos em corte transversal. A figura A exibe uma visão geral de dois capilares, o maior composto por três células e o menor por pelo menos duas, envolvidos por pericitos. B é um detalhe de um pericito de um dos capilares. Os pericitos possuem o núcleo alongado, acompanhando a extensão celular ao redor do endotélio. O retículo endoplasmático rugoso mostra-se desenvolvido. É possível notar também um nucléolo. Entre o pericito e o endotélio está a lâmina basal (seta). Barra: 1 μm .

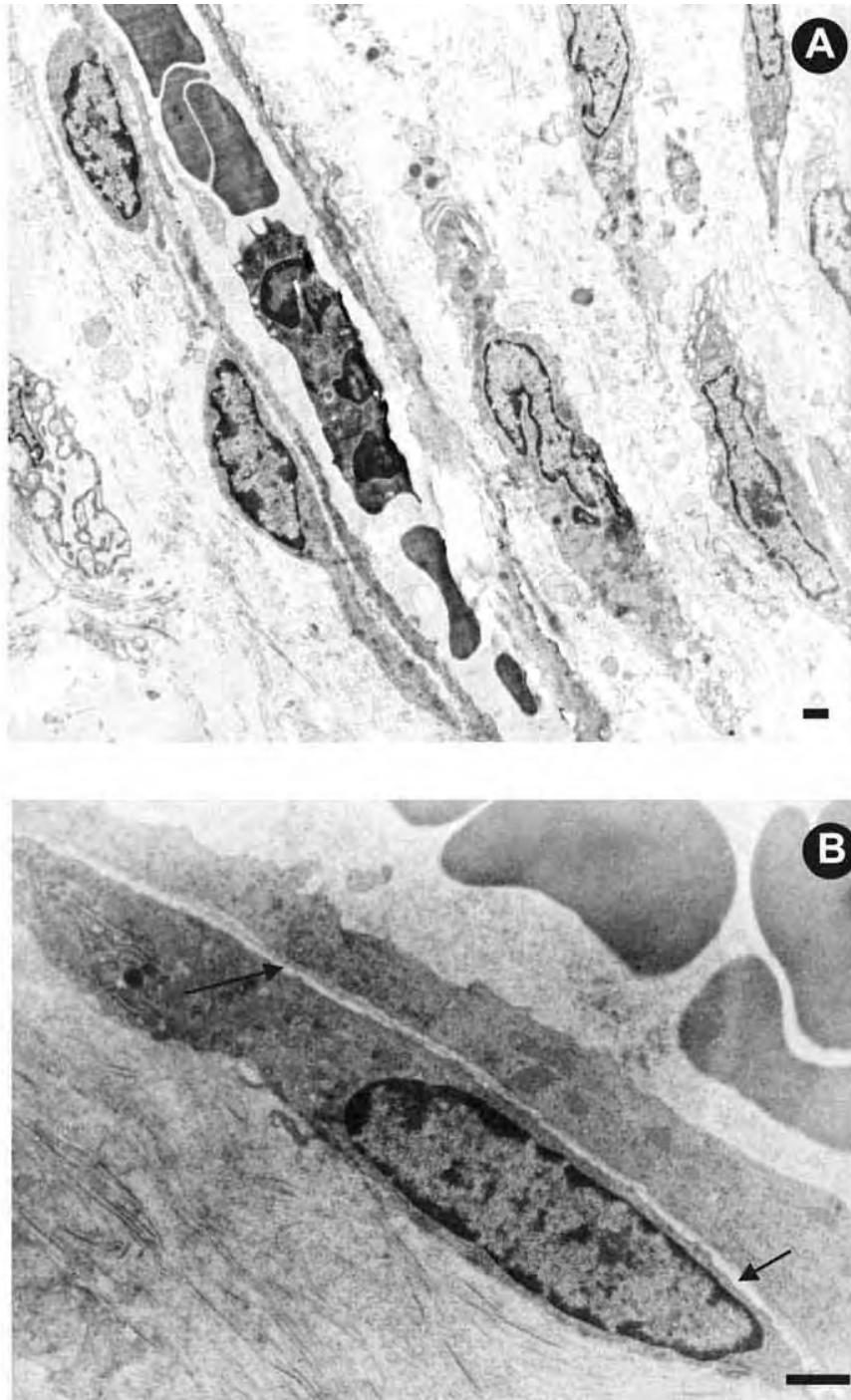


Figura 17. Capilares sanguíneos em corte longitudinal. A figura A exibe uma visão geral de um capilar. Em seu lúmen é possível identificar algumas hemácias e glóbulos brancos. B é um detalhe de um pericito de outro capilar em corte longitudinal. A célula também é alongada no sentido do comprimento endotelial. Assim como descrito na figura 15B, notam-se o retículo endoplasmático rugoso, a evidência de um nucléolo, além da lâmina basal (seta) entre o pericito e o endotélio. Barra: 1 μ m.

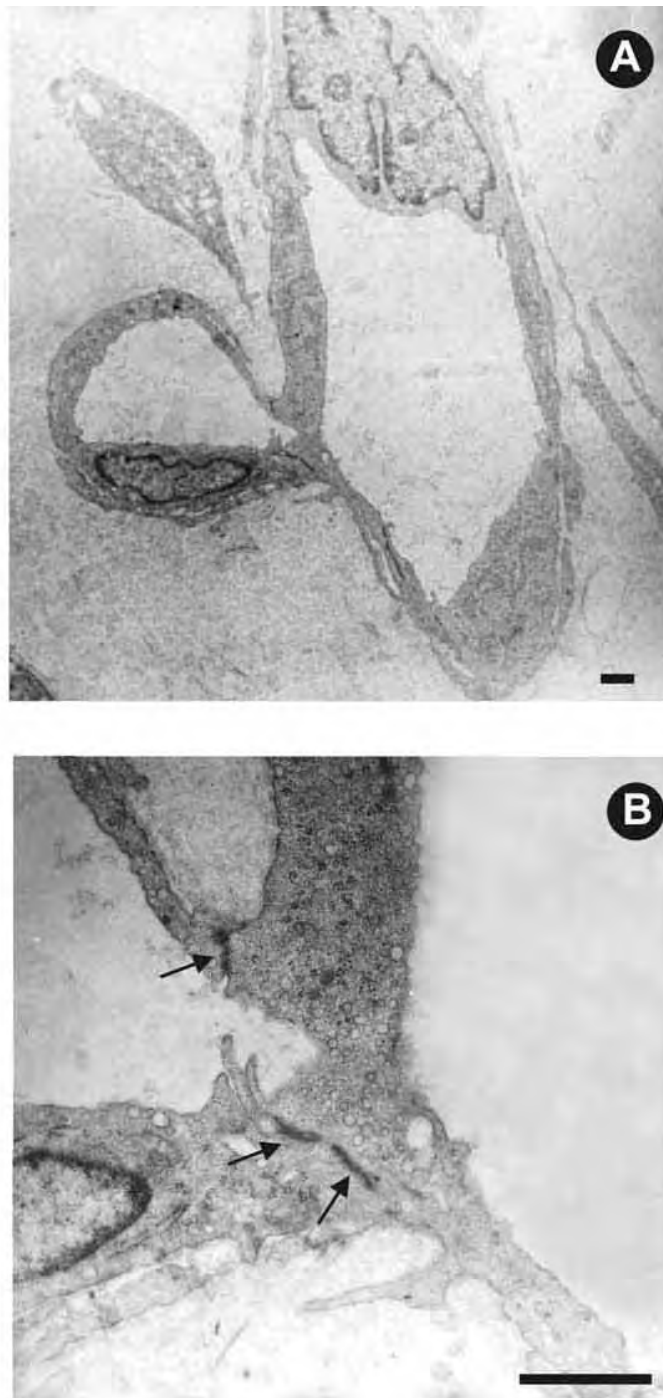


Figura 18. A figura A mostra um pericito aparentemente separando-se do capilar, podendo originar outro tipo celular ou outro capilar (neoangiogênese). B é um detalhe da foto anterior. Note algumas zonas de adesão (seta) entre o pericito e o endotélio. Apesar dos componentes já descritos, a semelhança do conteúdo citoplasmático nas duas células (grande quantidade de vesículas de pinocitose, muitos polissomos livres) sugerem a formação dos mesmos tipos celulares, ou seja, outro vaso sanguíneo, contribuindo no processo de angiogênese. Barra: 1 μ m.

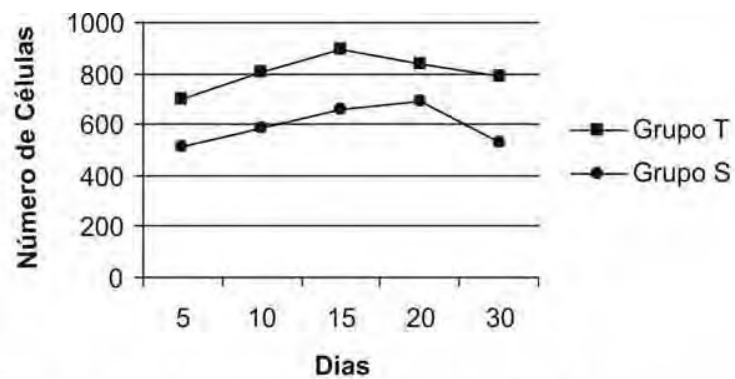


Figura 19. O gráfico compara o número total de fibroblastos para cada subgrupo.

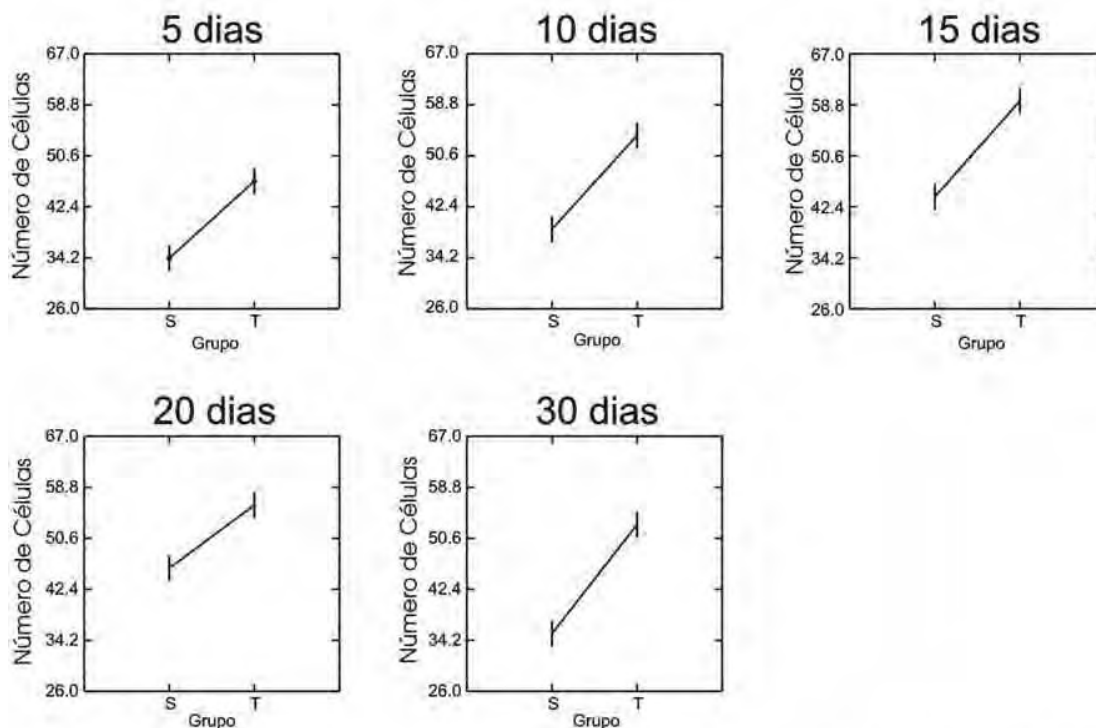


Figura 20. A figura ilustra a diferença de média do número de fibroblastos dentro de cada nível de análise. Note como o número de fibroblastos do grupo T é maior durante todo o experimento.

Análise de Variância

Fator	Soma de Quadrados	Graus de liberdade	Média Quadrática	Razão F	Probabilidade (P)
G	7462.427	1	7462.427	133.772	0.000
T	2703.907	4	675.977	12.118	0.000
G*T	247.773	4	61.943	1.110	0.354
Error	7809.867	140	55.785		

Tabela 1. Tabela da Análise de Variância do número de fibroblastos.

**MACRÓFAGOS E ATIVIDADE FÍSICA MODERADA
NA REPARAÇÃO TECIDUAL**

CAPÍTULO 3

3.1 RESUMO

Os macrófagos são células relativamente grandes e móveis envolvidas em inúmeros processos imunes: fagocitose, pinocitose, apresentação de antígenos, secreção de fatores de crescimento, lise tumoral, rejeição de transplantes, remoção de partículas orgânicas e formação de granuloma para isolar partículas não passíveis de digestão intracelular. Há evidências de que os produtos derivados da prática de atividade física moderada melhoram as defesas do organismo, incluindo o desempenho dos macrófagos no combate a inflamações. Este trabalho compara ultra-estrutural e numericamente macrófagos com e sem influência de atividade física moderada. Ratos Wistar machos foram randomizados em dois grupos, 10 sedentários (S) e 10 treinados (T), os quais receberam implantes de esponja de PVC na região dorsal. Os animais T foram submetidos à atividade física moderada com natação diária. Após 5, 10, 15, 20 e 30 dias os animais foram mortos, os implantes removidos e submetidos à preparações para microscopia eletrônica de transmissão. Apesar de não haver significativa diferença morfológica entre os macrófagos dos grupos S e T, a diferença do número de células é bastante expressiva.

3.2 INTRODUÇÃO

A inflamação é fundamentalmente uma resposta protetora cujo objetivo final é livrar o organismo da causa inicial da lesão (p.ex., micróbios, toxinas) e das conseqüências desta lesão (p.ex., células e tecidos necróticos). Sem inflamação, as infecções prosseguiriam desimpedidas, as feridas jamais cicatrizariam e os órgãos danificados poderiam tornar-se chagas permanentes. A resposta inflamatória está estreitamente interligada ao processo de reparo tecidual, e, deste modo, serve para destruir, diluir ou encerrar o agente lesivo e põe em movimento uma série de eventos que, tanto quanto possível, cicatrizam e reconstituem o tecido danificado. Entretanto esta resposta protetora, sendo potencialmente lesiva, tem um custo para o organismo, pois a reparação por fibrose produz faixas fibrosas que podem interferir com a atividade orgânica normal, limitando a mobilidade das articulações e obstruindo órgãos como o intestino, por exemplo. Assim, as drogas inflamatórias encontradas no mercado visam aumentar os efeitos saudáveis da inflamação e controlar os efeitos nocivos (RICHES, 1996; CABRERO et al., 2002; BAUGH e DONNELLY, 2003; GRIP et al., 2003).

A inflamação pode ser dividida em padrões agudos e crônicos. Enquanto a fase aguda caracteriza-se por respostas exsudativas e formação de edemas, a inflamação crônica caracteriza-se por respostas mais proliferativas que exsudativas, freqüentemente geradas pela permanência do agente infeccioso. Um modelo de inflamação crônica é a induzida por meio do implante de um corpo estranho. Nestas reações granulomatosas a população de leucócitos é predominantemente mononuclear com a mistura de macrófagos, proliferação de fibroblastos e neovascularização (PEACOCK e VANWINKLE, 1985; RICHES, 1996; NORBORG et al., 2000; AKGUL e EDWARDS 2003; WALKER et al., 2003).

As células pluripotentes da medula óssea dão origem aos monócitos que, quando deixam a circulação sanguínea e entram nos tecidos, amadurecem e

passam a se chamar macrófagos. Podem também ser formados da divisão de macrófagos *in situ*, mas a maioria provém dos monócitos (ORDOVÁS e SCROFERNEKER, 1998).

Tanto os macrófagos dos tecidos quanto os monócitos são células relativamente grandes, móveis e com tendência a aderir em superfícies de plástico ou de vidro, quando cultivados em laboratório.

O monócito é a maior de todas as células brancas encontradas no sangue, e seu diâmetro varia de 12 a 15 μm . O núcleo é grande e localizado centralmente, apresentando-se sob a forma de rim ou bilobado. O citoplasma é abundante e há um número variável de vesículas delimitadas por membranas. Os macrófagos dos tecidos são relativamente semelhantes em aparência, porém maiores, com 25 a 50 μm de diâmetro e podem conter mais vacúolos citoplasmáticos do que os monócitos (GIORGIO, 2005). Nair et al. (2003) chamam atenção para a plasticidade e grande variedade de fenótipos que os macrófagos podem expressar, dependendo das citocinas presentes, da localização tecidual e da etapa do processo de inflamação, o que torna complexo definir as funções dos macrófagos *in vivo*. Segundo Sporn e Roberts (1986) podem ser identificados por sua morfologia, pela expressão de certos antígenos e receptores de superfície e pela presença de enzimas características no citoplasma.

Estudos ultra-estruturais demonstraram que o núcleo dos macrófagos possui cromatina frouxa com pequenos grumos dispersos pelo núcleo. O citoplasma contém complexo de Golgi desenvolvido e inúmeras vesículas pinocíticas, lisossomos e vacúolos. Podem ser vistas também vesículas em processo de fusão com fagossomos, formando fagolisossomos. A superfície da célula é ondulada e os microtúbulos e microfilamentos formam um citoesqueleto tridimensional bem organizado. Os filamentos de actina localizados abaixo da membrana celular são responsáveis pela locomoção, formação de pseudópodes e influenciam os eventos fagocíticos da célula (GIORGIO, 2005).

Essas células podem participar da imunidade inata como a primeira linha de defesa do organismo, realizar fagocitose, pinocitose, servir como célula apresentadora de antígeno e secretar citocinas - produtos polipeptídicos que com

sua atividade quimiotática, mitogênica e modulatória influenciam o comportamento de muitas células, incluindo os fibroblastos para a formação da fibroplasia. A fibroplasia é uma das etapas da formação do tecido de granulação que consiste em dinâmica reciprocidade dos fibroblastos, citocinas e matriz extracelular (MEC). Fatores de crescimento também estimulam a fibroplasia (SPORN e ROBERTS, 1986). Outras atividades importantes dessa linhagem celular são ingerir e matar parasitas intracelulares, suprimir infecções virais, participar do processo de lise tumoral e rejeição de transplantes e remover partículas inorgânicas (ORDOVÁS e SCROFERNEKER, 1998).

De fato, adesão e distribuição celular na MEC são condições necessárias para diferenciação dos macrófagos. Além de induzir a diferenciação, a MEC tem profundos efeitos em outros aspectos da biologia dos monócitos/macrófagos. A aderência a proteínas da MEC, como fibronectina, também promove migração celular e fagocitose, e induz rápida expressão de ARNm de genes importantes no recrutamento, ativação, sobrevivência e diferenciação de monócitos e também está intimamente implicada na patogenia de doenças inflamatória que envolvem monócitos (FOUGEROLLES e KOTELIANSKY, 2002).

Um dos principais eventos da fase inicial da resposta imune é a ativação dos macrófagos. O macrófago ativado adquire uma série de propriedades: aumenta de tamanho, desenvolve suas organelas, aumenta sua capacidade de aderência, aumenta a formação de pseudópodos e a resposta a fatores quimiotáticos, melhora a capacidade de fagocitose e digestão intracelular, aprimora a função de célula apresentadora de antígeno e a capacidade de produzir citocinas, além de produzir ao menos seis fatores de crescimento que a ele conferem participação essencial na eliminação de antígenos, modulação da proliferação de fibroblastos e produção de MEC (ORDOVÁS e SCROFERNEKER, 1998; THOMSEN e GRETZER, 2001). Além das relações estabelecidas com as células tradicionalmente elencadas no processo de inflamação e reparo tecidual, alguns autores têm recentemente chamado a atenção para a importância das interações entre macrófagos e adipócitos (NAWROCKI e SCHERER, 2005; FANTUZZI, 2005).

Contudo, algumas vezes o agente infeccioso pode ser pobremente digerido ou relativamente inerte e persiste. Nestas condições, os macrófagos ativados não são capazes de digeri-los e podem sofrer modificações e fundir-se em células gigantes, formando os granulomas que visam impedir a progressão do processo infeccioso. Essas células gigantes podem chegar a 40-50mm e possuem uma grande massa de citoplasma contendo muitos núcleos pequenos, arranjados tanto periféricamente ou desordenadamente (BUSNELLO et al., 1998). Há muitas idéias para a função das células gigantes nos granulomas, incluindo modular a ação dos macrófagos e funções específicas na fagocitose de patógenos envolvidos na formação de granuloma (OKAMOTO et al., 2003).

Além de ser uma das primeiras células a participar deste processo, a apoptose de macrófagos em granulomas tem sido reconhecida como um significativo mecanismo responsável para a resolução da inflamação. Estudos de microscopia eletrônica mostram padrões de apoptose como cromatina perinuclear condensada e fragmentação nuclear. Além disso, células apoptóticas são mais freqüentes em granulomas do que em outros tipos de inflamação e são responsáveis pela renovação celular em granulomas promovendo sua indução, manutenção e resolução (MATSUNAGA e ITO, 2000).

Considerando estas situações patológicas, evidências epidemiológicas têm mostrado que exercícios físicos moderados, realizados regularmente, são benéficos na proteção do organismo às doenças infecciosas (NIEMAN, 1994, LOWDER et al., 2005), câncer (STERNFELD, 1992), na aceleração dos processos de reparo e controle da inflamação (NIEMAN, 1998, ROBERTS et al., 2006) e na manutenção do sistema imune (WOODS et al., 2003). Estudos com animais de laboratório têm demonstrado a complexidade da interação exercício-sistema imune e confirmam que o exercício moderado melhora algumas respostas inflamatórias, enquanto o exercício exaustivo afeta negativamente a capacidade imunológica (WOODS et al., 1997; PEIJIE et al., 2003). Os possíveis mecanismos de imuno-modulação induzidos pelos exercícios podem incluir mudanças hormonais, metabólicas e fisiológicas (FIELD, 1991; SMITH, 1997). A atividade física moderada, realizada regularmente, pode atenuar as respostas de estresse

do organismo reduzindo a produção dos hormônios imunossupressores e também levando a liberação do hormônio de crescimento (GH), do peptídeo natriurético atrial (ANP) (MAACK, 1992) e da glutamina sérica (KOYAMA et al., 1998; CURI et al., 2005), acelerando a recuperação dos tecidos inflamados. A importância da manutenção da saúde física tem sido reiterada por estudos recentes que colocam os adipócitos em um patamar de células que não somente têm funções no metabolismo energético, mas que também influenciam por meio de citocinas (adipocinas) condições patológicas, como inflamações crônicas, interagindo com outros tipos celulares, como os macrófagos.

Nos últimos anos, as investigações têm focado nas reações de fase tardia, que são similares as manifestações de doenças crônicas, porque se percebe que estas reações inflamatórias não só envolvem mediadores, mas também mobilizam vários tipos celulares e refletem as condições clínicas mais acuradamente que respostas agudas menos complexas (NAGAI et al., 2000).

Modelos de inflamação crônica induzida por meio de um corpo estranho mimetizam situações clínicas importantes como, por exemplo, implantes de marcapasso e implantes de silicone. A reação e reparação que são processadas nestas situações clínicas em muito se assemelham às que ocorrem após implante subcutâneo de esponjas de PVC (AMEMIYA e DAKE, 1994; RONDO et al., 1996; YANAGIHARA et al., 2000; RAULIN, et al., 2000).

Desta forma, devido à participação e influência que os macrófagos exercem nas reações e nos processos de inflamação e reparação e a potencialidade moduladora da atividade física moderada, é interessante e necessário realizar experimentos que reúnam estes elementos e estender a análise ao nível ultra-estrutural, dada a relação direta existente entre a morfologia e a atividade dos componentes celulares, e realizar a quantificação das células, como mais uma forma de agregar conhecimentos, dado que poucas pesquisas têm levado em conta análises quantitativas em implantes *in vivo* (THOMSEN e GRETZER, 2001).

3.3 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho é comparar, por meio de análises ultra-estruturais e quantitativas, macrófagos de ratos Wistar que receberam implantes subcutâneos de esponjas de PVC e foram submetidos a realização de atividade física moderada com os daqueles que também receberam tais implantes mas não praticaram a referida atividade.

3.4 MATERIAL E MÉTODOS

3.4.1 Animais e treinamento

Foram utilizados 20 ratos machos adultos Wistar com aproximadamente 70 dias de idade no início do experimento, alimentados com ração balanceada padrão Purina, água *ad libitum* e mantidos em gaiolas coletivas a temperatura ambiente de 25°C e fotoperíodo de 12C:12E.

Os ratos foram distribuídos randomicamente nos seguintes grupos: sedentário (S), ratos que não realizaram exercícios físicos (n=10); treinado (T), ratos que realizaram exercícios físicos moderados (n=10). Aos 10 dias do início do treinamento (período de adaptação progressiva), os ratos sedentários e treinados foram submetidos à cirurgia de implante de esponja de PVC (polivinilcloro) e recolocados nas gaiolas. O grupo T retornou ao esquema de exercício dois dias após o implante. Aos 5, 10, 15, 20 e 30 dias depois da realização da cirurgia, respectivamente, 2 ratos de cada grupo permaneceram em repouso por 24h e foram mortos.

Para o implante da esponja de PVC, os ratos foram anestesiados por inalação com éter etílico e tricotomizados na região mediana dorsal, onde foi realizada uma incisão cirúrgica perpendicular ao eixo da coluna vertebral. Após a divulsão dos tecidos subcutâneos foram implantadas esponjas de PVC, com 7,0 mm³ previamente autoclavadas, distando 4,0 mm da incisão para evitar

interferência dos processos de cicatrização. Em seguida foi feita a sutura da incisão. Todos os procedimentos foram realizados em condições estéreis.

Os animais do grupo T realizaram natação com carga equivalente a 3% do peso corporal acoplada ao tórax, por 60 minutos diários, 5 dias por semana, por 30 dias. As sessões de natação foram iniciadas às 8:00h em recipiente de amianto (100cmx70cmx60cm) com coluna d'água de 40 cm, para evitar que os ratos apoiassem a cauda no fundo do recipiente. A temperatura da água foi mantida em $32 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Após o término das sessões de natação, os ratos foram enxutos e retornados às suas respectivas gaiolas em sala com temperatura de 25°C . Os animais S foram colocados na água, nas mesmas condições anteriores, aproximadamente 2 minutos por dia, para simular a manipulação dos animais T.

3.4.2 Análise Ultra-estrutural

Após a morte, os implantes de PVC foram removidos e fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,3 por 24h e pós-fixados em tetróxido de ósmio 1% em tampão cacodilato de sódio 0,1M, seguindo desidratação em série graduada de acetona. O material foi incluído em resina Epon-Araldite e cortado em ultramicrótomo Sorvall Porter Blum MT2. Foi então contrastado com acetato de uranila e citrato de chumbo. O material foi analisado sob microscopia eletrônica de transmissão com microscópio eletrônico Phillips CM 100.

3.4.3 Análise Quantitativa

Os macrófagos foram quantificados em cortes de 0.5 μm corados com Azul de Toluidina. Foram analisados e quantificados 15 campos para cada subgrupo (5S, 10S, 15S, 20S, 30S, 5T, 10T, 15T, 20T, 30T) através de um microscópio de luz Zeiss. Os resultados obtidos foram estatisticamente analisados pelo teste de ANOVA Two Way (análise de variância para dados amostrais independentes) com os fatores grupo (treinado e sedentário) e tempo (5, 10, 15, 20 e 30 dias), para $p < 0,01$.

3.5 RESULTADOS

3.5.1 *Análise Ultra-estrutural*

Ultra-estruturalmente, a morfologia dos macrófagos neste trabalho está de acordo com aquela descrita na literatura. O núcleo toma grande parte da célula, é preenchido, sobretudo, por eucromatina. A heterocromatina fica restrita à periferia e há alguns grumos dispersos na matriz nuclear. Em algumas células é possível distinguir um nucléolo. O citoplasma é muito rico em vesículas e organelas como complexo de Golgi e mitocôndrias.

Principalmente nos grupos de 5 dias, observam-se células com características que ainda lembram monócitos, redondas e com poucos prolongamentos citoplasmáticos. Porém já apresentam muitas vesículas e organelas desenvolvidas (figuras 1 e 2), mais abundantes em T do que em S. Observam-se, ainda no grupo 5T, células que já apresentam muitos prolongamentos citoplasmáticos e com o citoplasma repleto de vesículas e organelas, indicando alta atividade celular (figuras 3 e 4). No mesmo grupo, nota-se o aspecto típico de macrófagos em processo de fagocitose (figuras 5 e 6). Os mesmos fenômenos não foram vistos em 5S.

No grupo 10 S, as células apresentam maior número de prolongamentos citoplasmáticos, vesículas, e organelas desenvolvidas em relação à 5S e se equiparam ao grupo 5T (fig. 7 e 8). No grupo 10T o conteúdo citoplasmático, organelas e vesículas, parece ainda mais abundante que em 10S (figura 9). Quando encontram superfícies do implante de PVC os macrófagos aderem-se à ela. É interessante comparar a diferença morfológica entre macrófagos que aderiram a superfície do PVC e outros que não o fizeram (figura 10).

No grupo 15S, os macrófagos são maiores em relação àqueles do grupo 10S, com abundância de organelas e muitos prolongamentos citoplasmáticos, mantendo estreito contato com outras células (figuras 11 e 12). O perfil das células do grupo 15T é semelhante ao do grupo 15S (figuras 13 e 14).

O grupo 20S mantém aquelas características apresentadas no grupo 15S (figuras 15 e 16). O mesmo se dá em relação ao grupo 20T, que se assemelha muito ao 15T (figura 17). Contudo, no grupo 20T é notável o número de macrófagos que encontram-se fundidos ou em processo de fusão (figura 18).

No grupo 30S são observados muitos macrófagos fundindo-se, tal qual foi observado no grupo 20T (figura 19), além de podermos encontrar também aquela morfologia que vem sendo observada desde o grupo 15S (figura 20). No grupo 30T os macrófagos continuam tendendo a aglomerarem-se (figura 21). Esta tendência estende-se até mesmo às células que ainda possuem considerável número de organelas e prolongamentos citoplasmáticos, sendo rodeadas por outros tipos celulares (figura 22).

Há grande ocorrência de granulomas com a formação de células gigantes em torno das cápsulas de PVC, principalmente nos últimos grupos. A partir dos grupos de 20 dias é possível notá-las em maior quantidade e bem estabelecidas, com uma grande quantidade de núcleos presentes (figuras 23, 24, 25 e 26). É perceptível a ocorrência de um estágio de transição dos grupos de 20 para 30 dias, onde os núcleos destas células, até então alongados e regulares, com predomínio de eucromatina e pequena quantidade de heterocromatina perinuclear, passam a exibir aspectos diferentes, que culminarão no grupo 30T (figuras 27, 28, 29A e 29B). Neste grupo, os núcleos tornam-se bastante irregulares, com grande quantidade de cromatina condensada, e fragmentam-se em segmentos menores. Quando é possível observar nucléolos, verifica-se que estes se tornam perinucleares e possuem em sua constituição segmentos de diferente elétrondensidades (figuras 29C, 29D, 30A, 30B, 30C e 30D).

Durante nossas análises, foi possível notar que o grupo S possui adipócitos maiores e em maior número em relação ao grupo T e optou-se por registrar este fenômeno, dada ao papel importante que vem sendo atribuído a estas células em diversas patologias (figuras 31A, 31B, 32A e 32B).

3.5.2 Análise numérica

A população de macrófagos cresce continuamente até os 10 dias no grupo T e decresce continuamente a partir daí. O mesmo se dá em relação ao grupo S, porém o maior número de células é registrado aos 15 dias (figura 33).

A análise de variância *ANOVA two-way*, cujas fontes de variabilidade na variável dependente (número de macrófagos) são tempo (com 5 níveis: 5, 10, 15, 20, 30 dias) e o grupo (sedentário e treinado), detectou que há interação significativa entre os fatores T e G (tabela 1).

Dentro de cada intervalo (subgrupos) as médias do grupo S foram consistentemente menores que as do grupo T (figura 34).

3.6 DISCUSSÃO

A descrição morfológica dos macrófagos do nosso trabalho é muito semelhante à descrição feita por Giorgio (2005), incluindo a tendência destas células a aderir a superfícies plásticas, uma vez que entram em contato direto com o PVC. Contudo esta autora não faz referência a nucléolos, os quais podemos identificar em nossas análises. O citoplasma está repleto de vacúolos e vesículas relacionadas ao processo de digestão intracelular.

A diferença existente entre alguns macrófagos dos grupos de 5 dias e os demais deve ser decorrente do processo de ativação e nos dá a impressão de que os macrófagos do grupo T, pelo menos até os 15 dias, desenvolvem-se mais precocemente que os do grupo S. Busnello et al. (1998) descrevem aumento no tamanho da célula, de suas organelas, de vesículas e das atividades funcionais da célula após a ativação. É exatamente este aspecto que observamos em nossas análises. Kurkinen et al. (1980) e Welch (1990) afirmam que a adesão dos monócitos na matriz extracelular e certas citocinas, por exemplo a IL-1, cuja produção pode ser estimulada por toxinas, complexos imunes e agressão física, ativam o monócito para que se torne um macrófago fibrogênico, o qual passa a

produzir fatores tais como PDGF (*Platelet-Derived Growth Factor*) e TGF (*Transforming Growth Factor*), que estimulam tanto a proliferação de fibroblastos, como a sua migração e a sua participação na produção da matriz extracelular. De fato, quando associados a elementos da matriz extracelular, ou aos próprios fibroblastos, os macrófagos exibem aspectos de células em plena atividade. Além disso, muitas vezes são observados eosinófilos, principalmente próximo aos granulomas, que possivelmente contribuem para a ativação dos macrófagos.

Para os propósitos deste trabalho é interessante acrescentar que Noël et al. (2004) e Song et al. (2000) relatam as diferenças existentes entre dois subtipos de macrófagos chamados de 'classicamente ativados' e 'alternativamente ativados'. Resumidamente, pode-se dizer que os macrófagos ativados classicamente inibem a fibrogênese pela redução da síntese e aumento da degradação da matriz extracelular e são mais populosos nas primeiras fases das reações inflamatórias e na renovação dos granulomas, enquanto os alternativamente ativados promovem a atividade fibrogênica dos fibroblastos pela produção de uma série de fatores de crescimento fibrogênicos e são mais populosos na cura de feridas e inflamação crônica. Contudo, não são citadas diferenças morfológicas entre os subgrupos, o que nos impede de afirmar se algum deles predomina em relação aos grupos em estudo, apesar de podermos inferir que ambos têm sua participação no processo inflamatório em estudo, observada a descrição de suas atividades feita acima. Ainda assim, seriam, interessantes estudos mais aprofundados que unam aspectos moleculares e morfológicos para detectar se existem evidências visuais capazes de identificar tais populações celulares.

Por outro lado, Riches (1996) distingue 3 fenótipos de macrófagos: citotóxico, inflamatório e de reparação. Tais fenótipos, segundo o autor, não provêm de subpopulações distintas e previamente comprometidas, mas diferenciam-se conforme as características do ambiente onde se encontram, que os levam a expressar diferentes e restritos padrões de expressão gênica.

Em nosso trabalho, a variação destes fenótipos pôde ser observada entre os grupos. Chama atenção que enquanto os macrófagos dos grupos 15S e 20S apresentam fenótipo com características de atividade citotóxica –com a célula e

seu núcleo alongados e citoplasma repleto de organelas e vesículas além de abundantes e pronunciados prolongamentos citoplasmáticos, os correspondentes do grupo 15T e 20T apresentam fenótipos com características que se relacionam muito mais às atividades que envolvem a reparação da matriz extracelular do que à citotoxicidade – com a célula e seu núcleo mais arredondados que alongados, prolongamentos citoplasmáticos mais discretos e menor número de vesículas e organelas citoplasmáticas. Tal fenômeno deve ser decorrente dos efeitos da atividade física moderada na reparação tecidual.

Numericamente, os resultados indicam que os macrófagos são significativamente mais abundantes no grupo T que no grupo S, sugerindo que a atividade física moderada pode realmente melhorar a resposta imune a inflamações (WOODS et al., 1997; NIEMAN, 1998;) ou, ao menos, aumentar o potencial do sistema imune para resolver este tipo de situação. As análises estatísticas detectaram interação entre os fatores T e G. Porém, como o tempo é igual para ambos os grupos e eles diferem quanto a prática ou não de exercícios, a diferença numérica detectada foi, assim, atribuída aos efeitos da prática da atividade física moderada.

O maior número de macrófagos no grupo S, dentro do espectro do nosso delineamento experimental, é registrado aos 15 dias, enquanto para o grupo T isto se dá aos 10 dias. Isto demonstra certa precocidade no processo de inflamação e reparo tecidual devido à atividade física moderada. Contudo, poucas referências literárias dão conta do acúmulo de macrófagos, sobretudo em situações de inflamação crônica. Chang et al (2000) descreve o perfil clássico da cura de feridas, em um modelo de cicatrização ocular, e aponta o maior número de macrófagos ao terceiro dia; Graves et al (2002) aos 9 dias, em um modelo de reabsorção óssea dentária e Schilling et al (2003) aos 7 dias, em um modelo de isquemia cerebral. Em todos os modelos, a população de macrófagos cresce continuamente até atingir o número máximo de células e decresce continuamente daí em diante.

Em nosso trabalho, o perfil populacional das células é bastante parecido. Contudo, nosso modelo reproduz uma situação de inflamação crônica, onde o

agente inflamatório, a esponja de PVC, persiste. Tal situação possivelmente contribui para que o número de macrófagos seja crescente por mais tempo. Sem dúvida, o pico numérico dos macrófagos do grupo T precedente em relação ao do grupo S e a população mais abundante destas células no grupo T, em relação ao grupo S, para todos os níveis de análise contidos em cada grupo são bons indícios de que a atividade física moderada contribui significativamente para o desenvolvimento do processo inflamatório e da reparação tecidual, uma vez que a diminuição do número de macrófagos deve ser decorrente da morte destas células e/ou da formação de células gigantes. A apoptose de macrófagos tem sido reconhecida como um mecanismo crucial para a resolução da inflamação. Estudos de microscopia eletrônica mostram padrões de apoptose como cromatina perinuclear condensada e fragmentação nuclear e, como já citado, as células apoptóticas muito contribuem para renovação celular em granulomas promovendo sua indução, manutenção e resolução (MATSUNAGA; ITO, 2000). Assim, a presença de células gigantes com características de células em morte celular no grupo 30 T torna-se mais um indício de que a atividade física moderada, por meio de seus produtos, colabora para a aceleração da resolução da inflamação ou, pelo menos, a torna mais precoce em relação aos animais sedentários.

Um outro aspecto interessante reside na relação entre os macrófagos e os adipócitos. Gui-ping et al. (2005) afirmam que a deposição excessiva de gordura estabelece um novo nicho para macrófagos, o que acaba por alterar o balanço hormonal, resultando finalmente em desordens de metabolismo. Ambos os grupos apresentam adipócitos. Contudo, no grupo T eles estão mais dispersos e em menor número em relação ao grupo S ou ainda possuem menores dimensões. É possível afirmar com razoável segurança que o menor número de adipócitos no grupo T é resultado da atividade física moderada, permitindo assim o re-estabelecimento da condição homeostática, poupando o tecido de um desequilíbrio físico-químico que retardaria ou impediria a resolução do processo inflamatório, uma vez que os adipócitos estão envolvidos na secreção de citocinas capazes de atrair monócitos e estão envolvidos numa série de processos

patológicos como inflamações crônicas e sistêmicas (NAWROCKI e SCHERER, 2005; FANTUZZI, 2005). Pode estar aí mais um fator que atesta o benefício da atividade física e esclarece porque o processo de recuperação no grupo T tende a se resolver mais precocemente.

3.7 CONCLUSÃO

Nosso experimento mostra que a atividade física moderada não produz alterações significativas na morfologia das células nem em seus componentes, apesar de colaborar na resolução da inflamação e no processo de reparação tecidual. Por exemplo, as células gigantes do grupo T exibem características de apoptose antes que as do grupo S.

O número de células do grupo treinado é significativamente maior que o sedentário, indicando que as interações entre as células e os produtos de suas atividades são aumentadas. Além disso, o número de adipócitos que permanece menor no grupo T, o que pode ser considerado uma vantagem adicional para o restabelecimento da condição homeostática no tecido.

3.8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O delineamento desta pesquisa compreende do quinto ao trigésimo dia de um modelo de inflamação crônica induzida pelo implante subcutâneo de uma esponja de PVC.

Contudo, e principalmente para o caso dos macrófagos, aos 30 dias nota-se a ocorrência de fenômenos muito interessantes, como as características de apoptose dos núcleos das células gigantes, sobretudo no grupo T.

Portanto, a realização de um trabalho que contemplasse tal situação a partir do trigésimo dia seria muito interessante, haja visto que poderia fornecer significativas informações a respeito do desenvolvimento do processo apoptótico, do desenvolvimento ou resolução do granuloma e do perfil que se formaria a partir da contagem do número celular deste período em diante.

3.9 LITERATURA CITADA

AKGUL, C., EDWARDS, S. W. Regulation of neutrophil apoptosis via death receptors. **Cell Mol Life Sci**, v. 60, n. 11, p. 2402-2408. 2003.

AMEMIYA, T.; DAKE, Y. Granuloma after augmentation of the eyelids with liquid silicone: an electron microscopic study. **Ophthal Plast Reconstr Surg**, v.10, n. 1, p. 51-56. 1994.

BAUGH, J. A.; DONNELLY, S. C. Macrophage migration inhibitory factor: a neuroendocrine modulator of chronic inflammation. **J Endocrinol**, v. 179, n.1, p. 15-23. 2003.

BUCKLEY, C. D.; PILLING, D.; LORD, J. M.; AKBAR, A. N.; SCHELL-TOELLNER, D.; SALMON, M. Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. **Trends in Immunology**, v. 22, n. 4, p. 199-203. 2001.

BUSNELLO, R. G.; OSOWSKI, F.L.; SCROFERNEKER, M. L., Hipersensibilidade do Tipo IV. In SCROFERNEKER, M. L.; POHLMANN, P. R. (Org.). **Imunologia Básica e Aplicada**. Porto Alegre: Sagra Luzzato, 1998. p. 305-315.

CABRERO, A.; LAGUNA, J. C.; VAZQUEZ, M. Peroxisome proliferator-activated receptors and the control of inflammation. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v.1, n. 3, p. 243-248. 2002.

CHANG, L.; CROWSTON, J. G.; CORDEIRO, M. F.; AKBAR, A. N.; KHAW, P. T. The role of the immune system in conjunctival wound healing after granuloma surgery. **Survey of Ophthalmology**, v. 45, n. 1, p. 49-68.

CURI, R.; LAGRANHA, C. J.; DOI, S. Q.; SELLITTI, D. F.; PROCOPIO, J.; PITÓN-CURI, T. C.; CORLESS, M.; NEWSHOLME, P. Molecular mechanisms of glutamine action. **Journal Of Cellular Physiology**, v. 204, n. 2, p. 392-401. 2005.

FANTUZZI, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 115, n. 5, p. 911-919. 2005.

FIELD, C J; GOUGEON, R; MARLISS, E B. Circulating Mononuclear Cell Numbers and Function During Intense Exercise and Recovery. **J Appl Physiol**, v. 71, n. 3, p. 1089-1097. 1991.

FOUGEROLLES, A. R.; KOTELIANSKY, V. E. Regulation of monocyte gene expression at the extracellular matrix and its functional implications. **Immunological Reviews**, v. 186, p. 208-220, n. 2. 2002.

GIORGIO, S. Macrófagos. In: Carvalho, H. F.; Collares-Buzato, C. B. (Org.). **Células: uma abordagem multidisciplinar**. Barueri: Ed. Manole, 2005, p. 372-381.

GRAVES, D. T.; ALSULAIMANI, F.; DING, Y.; MARKS, S. C. Jr. Developmentally regulated monocyte recruitment and bone resorption are modulated by functional deletion of the monocytic chemoattractant protein-1 gene. **Bone**, v. 31, n. 2, p. 282-287. 2002

GRIP, O.; JANCIAUSKIENE, S.; LINDGREN, S. Macrophages in inflammatory bowel disease. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v. 2, n. 2, p. 155-160. 2003.

GUI-PING, Y; LI-RUI, D.; TAO, X.; XIAN-HUI, H.; HUAN, Q.; LI-HUI, X.; XIAO-DONG, C.; SHENG-QIU, F.; ZAI-QING, Y. One in vitro model for visceral adipose-derived fibroblasts in chronic inflammation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.333, n.3, p.850-857. 2005.

JUNG, Y. YASOSHIMA, A.; SAEGUSA, J.; NAKAYAMA, H.; DOI, K. Ultrastructural features of mast cells in picryl chloride (PCL)-induced contact dermatitis in IQI/Jic mice. **Exp Toxic Pathol**, v. 54, n. 4, p. 265-271. 2003.

KOYAMA, K; KAYA, M; TSUJITA, J; HORI, S. Effects of Decreased Plasma Glutamine Concentrations on Peripheral Lymphocyte Proliferation in Rats. **Eur Appl Physiol**, v. 77, n. 1-2, p. 25-31. 1998.

KURKINEN, M. Sequential Appearance Of Fibronectin And Collagen In Experimental Granulation Tissue. **Lab Invest**, v.43, n. 1, p. 47-51. 1980.

LOWDER, T.; PADGETT, D. A.; WOODS, J. A. Moderate exercise protects mice from death due to influenza virus. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 19, n. 5, p. 377-380. 2005.

MAACK, T. Receptor of Atrial Natriuretic Factor. **Annu Rev Physiol**, v. 54, p. 11-27. 1992.

MATSUNAGA, K.; ITO, M. Quantitative analysis of apoptotic cell death in granulomatous inflammation induced by intravenous challenge with *Cryptococcus neoformans* and bacillus Calmette-Guérin vaccine. **Pathology International**, v. 50, n. 3 p. 206-218. 2000.

NAIR, M. G.; COCHRANE, D. W.; ALLEN, E. J. Macrophages in chronic type 2 inflammation have a novel phenotype characterized by the abundant expression of *Ym1* and *Fizz1* that can be partly replicated in vitro. **Immunology Letters**, v. 85, n. 2, p. 173-180. 2003.

NAWROCKI, A. R.; SCHERER, P. E. The adipocyte as a drug discovery target. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 18, p. 1219-1230. 2005.

NIEMAN, D. C. Exercise, Infection and Immunity. **Int J Sports Med**, v. 15, sup. 3, p. s131-141. 1994.

NIEMAN, D. C. Exercises Immunology: integration and regulation. **Int J Sports Med**, v. 19, sup. 3, p. s171. 1998.

NOËL, W.; RAES, G.; GHASSABEH, G. H.; BAETSELIER, P.; BESCHIN, A. Alternativly activated macrophages during parasite infections. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 3, p. 126-133. 2004.

NORDBORG, C.; NORDBORG, E.; PETURSDOTTIR, V. The pathogenesis of giant cell arteritis: morphological aspects. **Clin Exp Rheumatol**, v. 18, n. 4, sup. 20, p. S18-21. 2000.

OKAMOTO, H.; MIZUNO, K.; HORIO, T. Monocyte-derived multinucleated giant cells and sarcoidosis. **Journal of Dermatological Science**, v. 31, n. 2, p. 119-128. 2003.

ORDOVÁS, K.; SCROFERNEKER, M. L., Imunidade Celular. In SCROFERNEKER, M. L. e POHLMANN, P. R. (Org.) **Imunologia Básica e Aplicada**, Porto Alegre: Sagra Luzzato, p. 169-171, 1998.

PEACOCK, E. E.; VANWINKLE, W. **Wound Repair**, 3rd ed., WB Saunders, 1985. p. 55-56.

PEIJIE, C.; HONGWU, L.; FENGPENG, X.; JIE, R.; JIE, Z. Heavy load exercise induced dysfunction of immunity and neuroendocrine responses in rats. **Life Sciences**, v. 72, n. 20, p. 2255-2262. 2003.

RAULIN, C.; GREVE, B.; HARTSCHUH, W.; SOEGDING, K. Exudative Granulomatous Reaction to Hyaluronic Acid (Hylaform). **Contact Dermatitis**, v. 43, n. 3, p. 178-179. 2000.

RICHES, D. W. H. Macrophage Involvement in Wound Repair Remodeling and Fibrosis. In: CLARK, R. A. F. (Org.). **The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair**. New York : Plenum Press, 1996. p. 95 – 141.

RONDO, J. W.; VIDARTE, G.; MICHALANY, N. Histologic study of the skin with gold thread implantation. **Plast Reconstr Surg**, v. 97, n.1, p.256-258. 1996.

SCHILLING, M.; BESSELMANN, M.; LEONHARD, C.; MUELLER, M.; RINGELSTEIN, E. B.; KIEFER, R. Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. **Experimental Neurology**, v. 183, n. 1, p. 25-33. 2003.

SMITH, J. A. Exercises Immunology And Neutrophilis. **Int J Sports Med**, v.18, sup.1, p. s46-s55. 1997.

SONG, E.; OUYANG, N.; HÖBERLT, M.; ANTUS, B.; WANG, M.; EXTON, M. S. Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts. **Cellular Immunology**, v. 204, n. 1, p. 19-28. 2000.

SPORN, M. B.; ROBERTS, A. B. Peptide Growth Factors And Inflammation, Tissue Repair, And Cancer. **J Clin Invest**, v. 78, n. 2, p. 329-332. 1986.

STERNFELD, B. Cancer and teh Protective Effect of Physical Activit: The Epidemiological Evidence. **Med Sci Sports Exer**, v. 24, n. 11, p. 1195-1209. 1992.

THOMSEN, P.; GRETZER, C. Macrophage interactions with modified material surfaces. **Current Opinion in Solid State and Material Science**, v. 5, n. 2-3, p. 163-176. 2001.

WALKER, A.; WARD, C.; DRANSFIELD, I.; HASLETT, C.; ROSSI, A. G. Regulation of Granulocyte Apoptosis by Hemopoietic Growth Factors, Cytokines and Drugs: Potential Relevance to Allergic Inflammation. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v.2, n. 4, p. 339-347. 2003.

WELCH, M. P.; ODLAND, G. F.; CLARK, R. A. Temporal Relationships Of F-Actin Bundle Formation, Collagen And Fibronectin Matrix Assembly, And Fibronectin Receptor Expression To Wound Contration. **J Cell Biol**, v. 110, n. 1, p. 133-145. 1990.

WOODS, J A; CEDDIA, M A; KOZAK, C; WOLTERS, B W. Effects Of Exercise On Macrophage MHC II Response to Inflammation. **Int J Sports Med**, v. 18, n. 6, p. 483-488. 1997.

WOODS, J. A.; CEDDIA, M. A.; ZACK, M. D.; LOWDER, T. W.; LU, Q. Exercise training increases the naïve to memory T cell ratio in old mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 17, n. 5, p. 384-392. 2003.

YANAGIHARA, M.; FUJII, T.; WAKAMATU, N.; ISHIZAKI, H.; TAKEHARA, T., NAWATE, K. Silicone Granuloma on the Entry Points of Acupuncture, Venepuncture and Surgical Needles. **J Cutan Pathol**, v. 27, n. 6, p. 301-305. 2000.

3.10 APÊNDICE

figuras, gráficos e tabelas

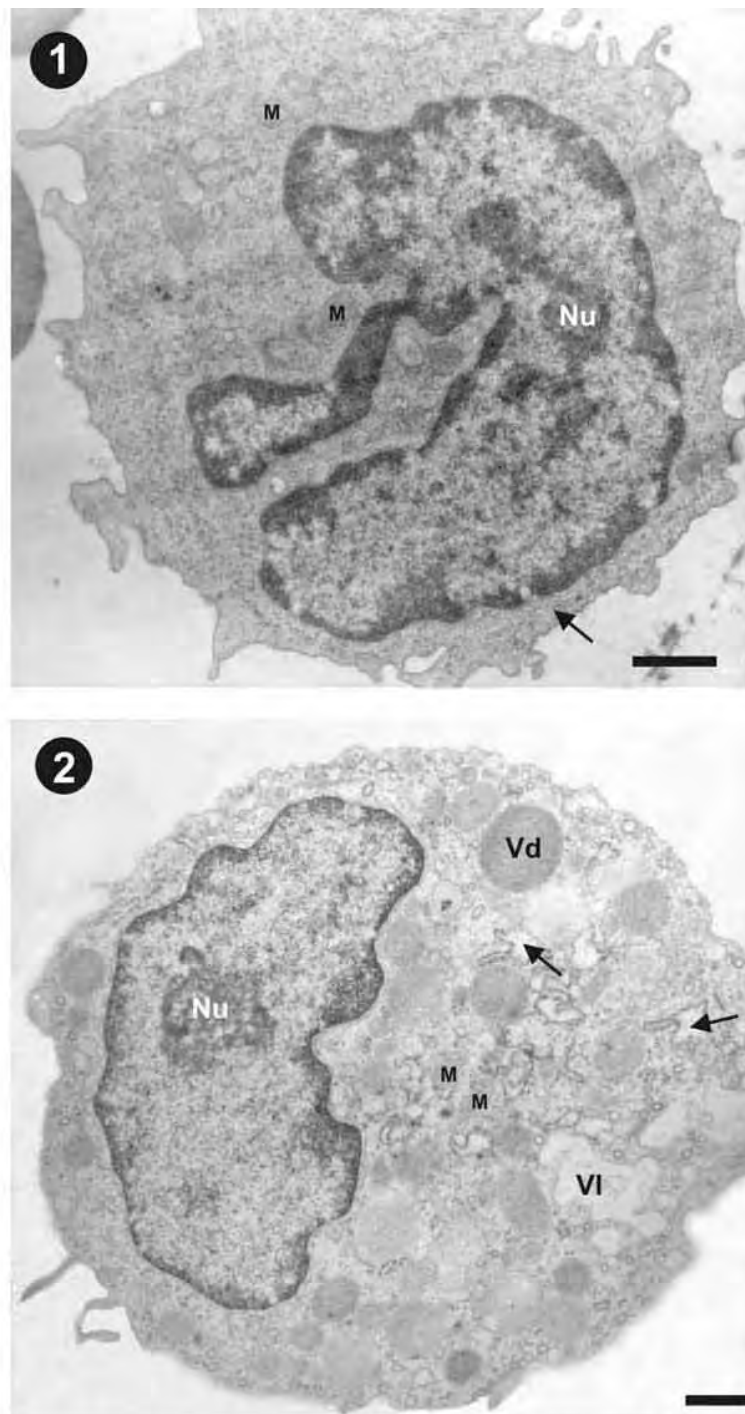


Figura 1. Macrófago do grupo 5S. Macrófago recém ativado. Núcleo bastante grande e preenchido por eucromatina. Há alguns grumos de heterocromatina dispersos e na periferia e um grande nucléolo (Nu). O citoplasma contém muitas vesículas e organelas, como retículo endoplasmático granular (seta) e mitocôndrias (M). A membrana plasmática possui tímidos prolongamentos citoplasmáticos. Barra 1 μm .

Figura 2. Macrófago do grupo 5T. Esta célula é muito semelhante a da figura 1, porém suas vesículas e organelas são mais abundantes e desenvolvidas e o núcleo possui um nucléolo grande (Nu). Mitocôndria (M). Retículo endoplasmático granular (seta). Vesícula elétron-densa (Vd). Vesícula elétron-lúcida (VI). Barra 1 μm .

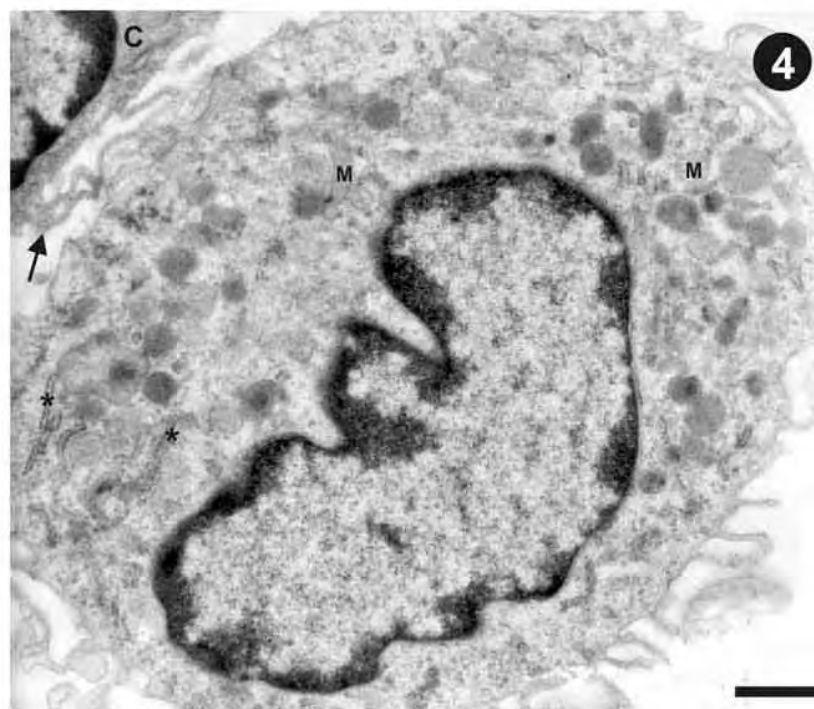
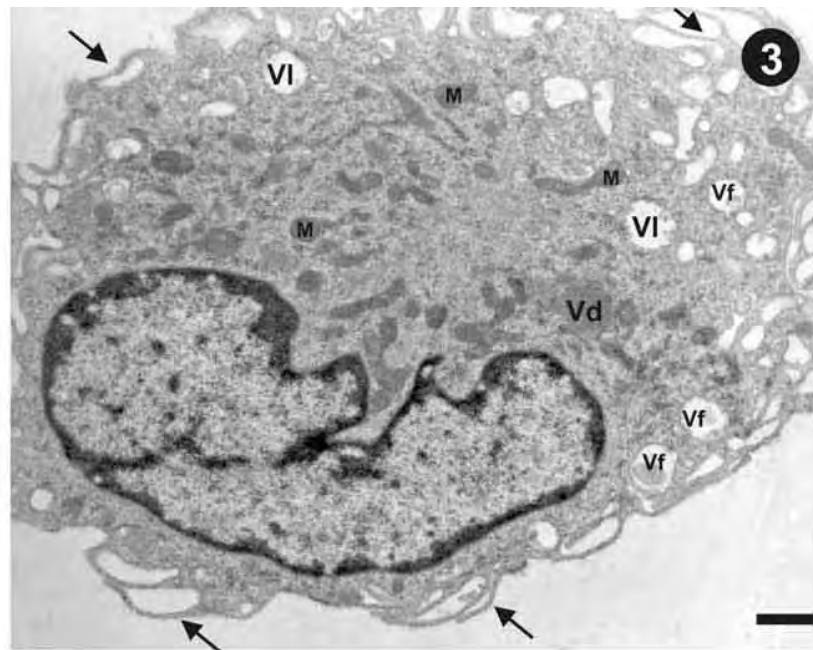


Figura 3. Macrófago do grupo 5T. Macrófago ativado. Note que os prolongamentos da membrana plasmática são mais numerosos (seta) e desenvolvidos em relação às células das figuras 1 e 2. Há maior abundância também de organelas e vesículas com diferentes elétrons densidades. Vesícula elétron-densa (Vd). Vesícula elétron-lúcida (VI). Vesícula fagocítica (Vf). Barra 1 μm .

Figura 4. Macrófago do grupo 5T. Além dos aspectos já ressaltados na figura 7, note o contato (seta) já estabelecido com outra célula (C). Mitocôndria (M). Retículo endoplasmático granular (*). Barra 1 μm .

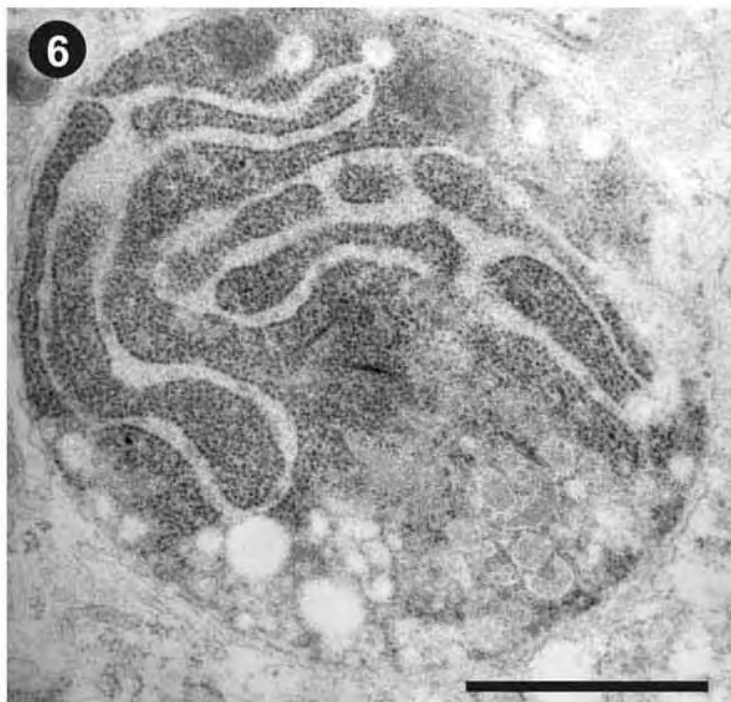
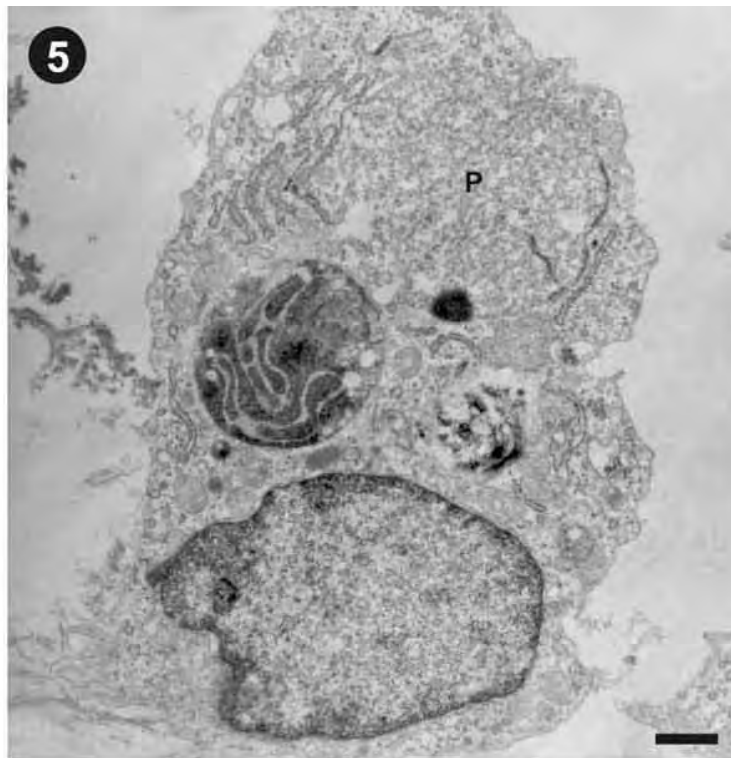


Figura 5. Macrófago do grupo 5T. Macrófago com grandes vesículas em seu interior e um grande peroxissomo (P). O fenótipo da célula indica fagocitose. Barra 1 μm .

Figura 6. Macrófago do grupo 5T. Detalhe de uma vesícula. Barra 1 μm .

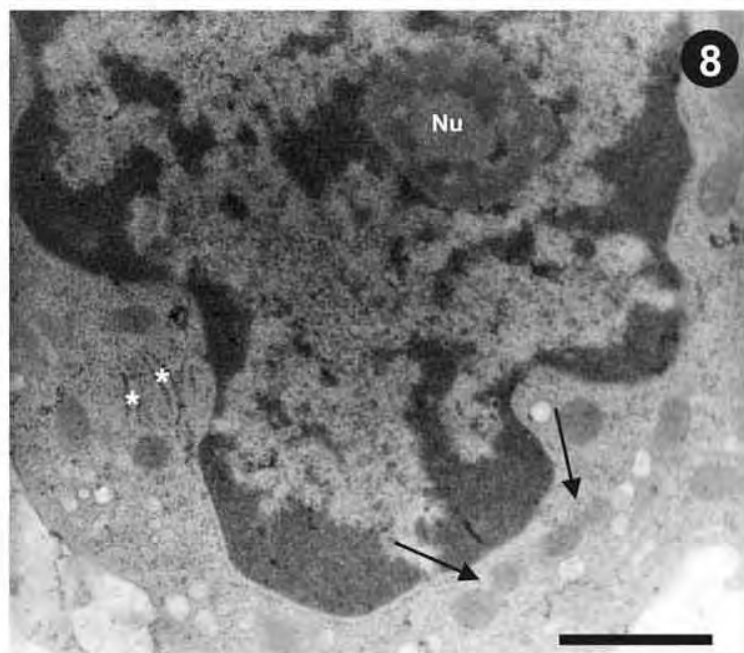
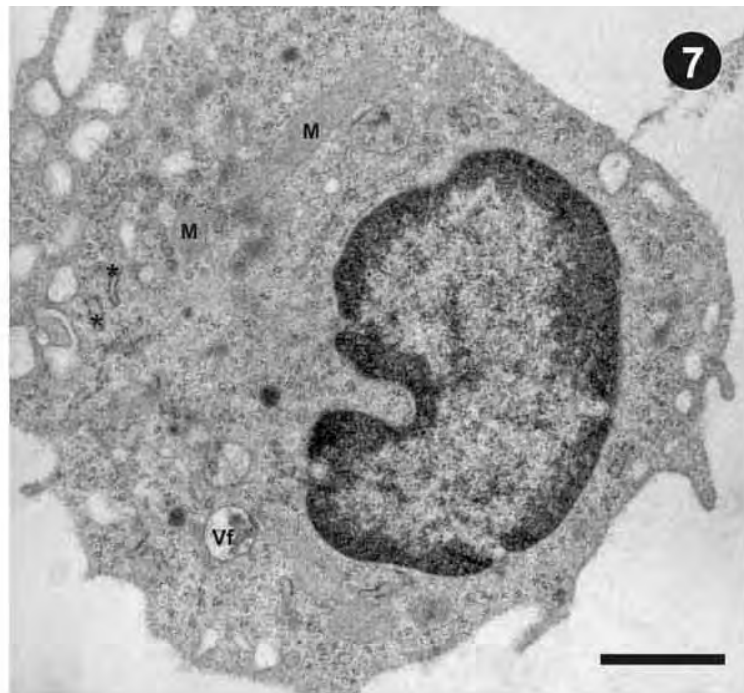


Figura 7. Macrófago do grupo 10S. Note como aumenta o número de prolongamentos citoplasmáticos, vesículas e organelas em relação ao grupo 5S. Mitocôndria (M). Retículo endoplasmático granular (*). Vesícula fagocítica (Vf) Barra 1 μm .

Figura 8. Macrófago do grupo 10S. Um detalhe de outra célula evidenciando o nucléolo, visículas e organelas do citoplasma. A seta aponta mitocôndrias em divisão, indicando alta atividade celular. Nucléolo (Nu). Retículo endoplasmático granular (*). Barra 1 μm .

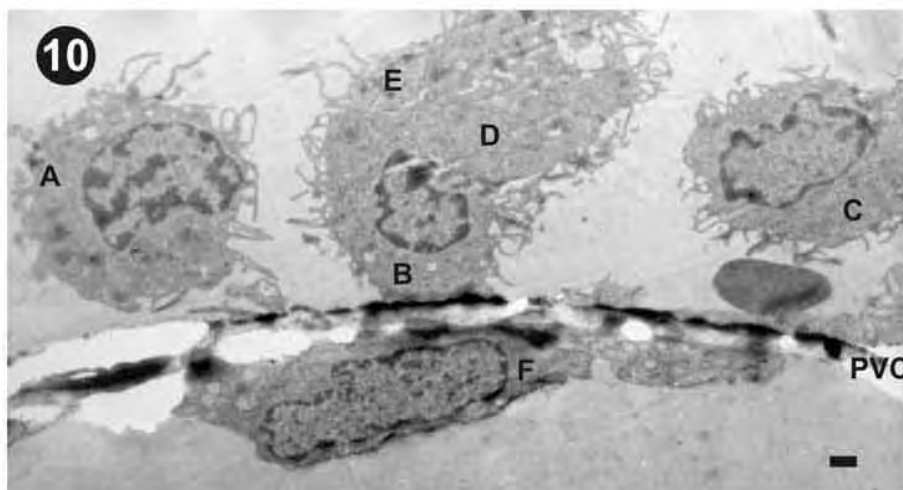
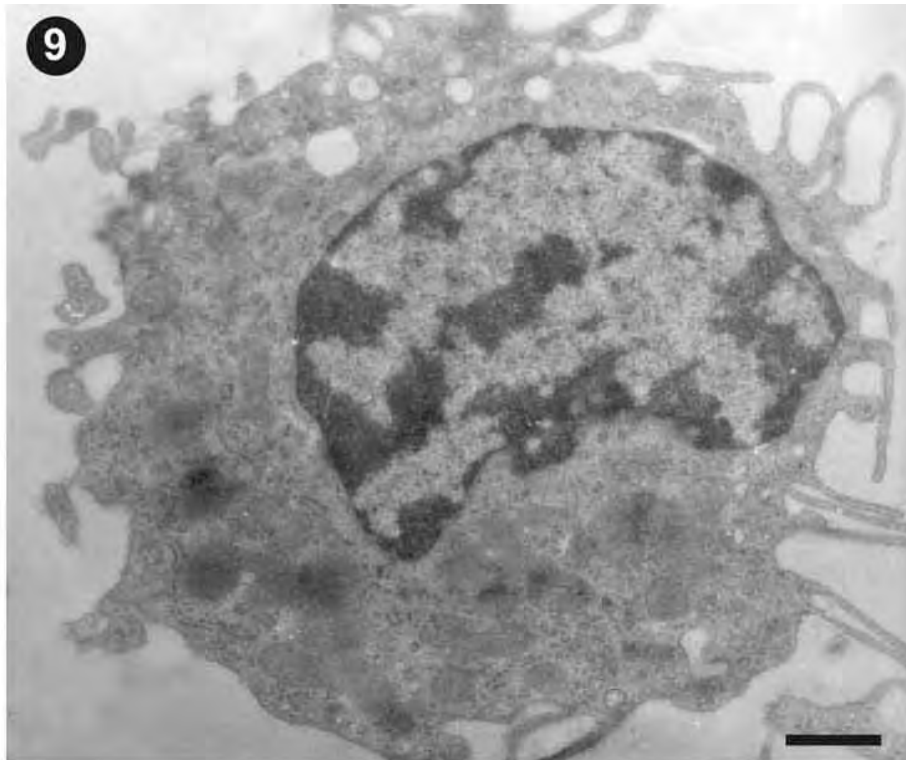


Figura 9. Macrófago do grupo 10T, 5400x. Ampliação do macrófago A da figura abaixo, com citoplasma repleto de organelas e vesículas, característico de macrófagos ativados e aptos à fagocitose. Barra 1 μm .

Figura 10. Macrófagos do grupo 10T, 810x. Células muito próximas a um fragmento de PVC. A, B e C são macrófagos. Pelas características observáveis, D e E também o são. F é um fibroblasto. Essa foto ilustra a aglomeração dos macrófagos já aos 10 dias no grupo T perante materiais estranhos e grandes demais para serem fagocitados. Barra 1 μm .

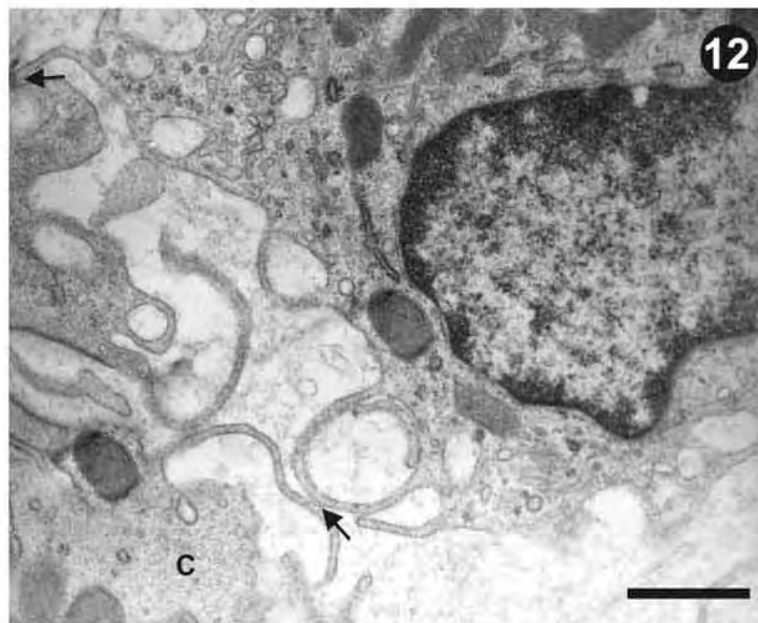
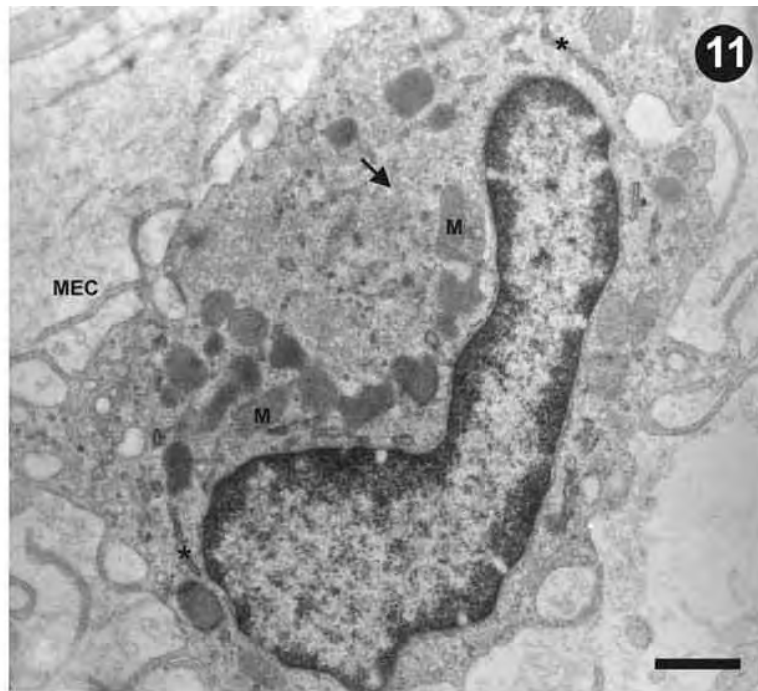


Figura 11. Macrófago do grupo 15S. Esta célula apresenta ainda perfil típico de células fagocitárias: possui abundantes prolongamentos citoplasmáticos, vesículas de diferentes elétrons-densidades, muitas mitocôndrias (M) alguns polissomos livres, retículo endoplasmático granular (*) e complexo de Golgi (seta). Importante notar o contato estabelecido com elementos da matriz extracelular (MEC). Barra 1 μm .

Figura 12. Macrófago do grupo 15S. Detalhe da figura 16, no qual pode-se notar ainda o contato (seta) com outra célula (C), possivelmente um outro macrófago. Barra 1 μm .

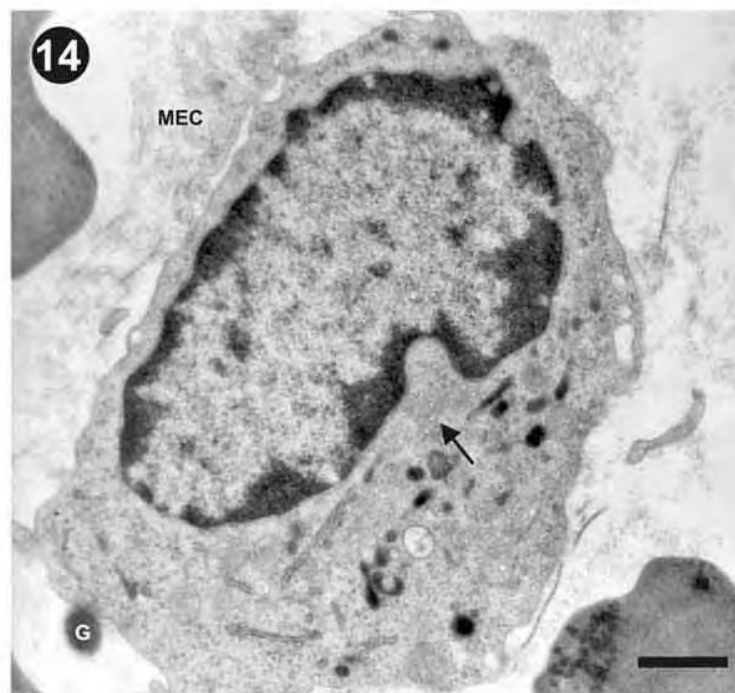
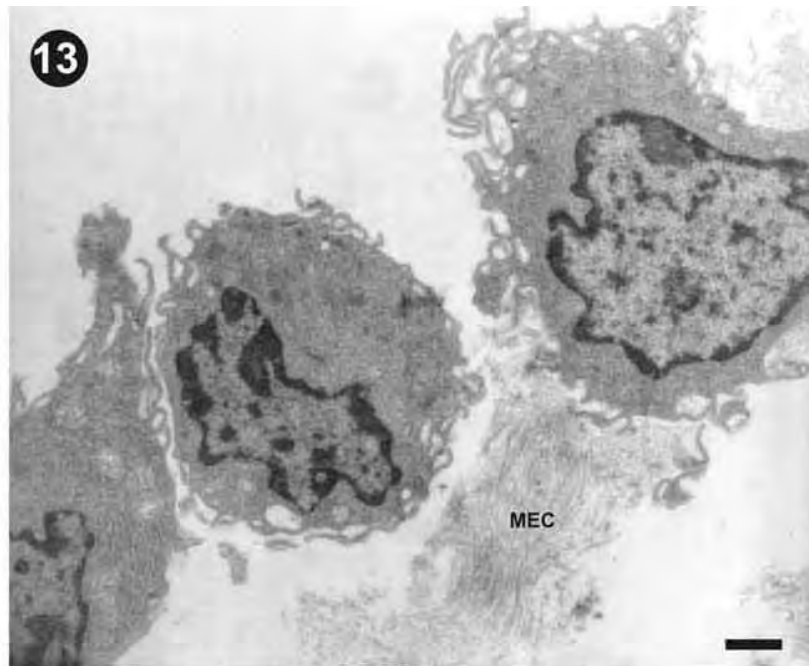


Figura 13. Macrófagos do grupo 15T. Note a proximidade entre os macrófagos e a relação estabelecida com elementos fibrilares da matriz extracelular (MEC), fatores importantes para as atividades destas células. Barra 1 μm .

Figura 14. Macrófago do grupo 15T. Citoplasma muito rico em organelas: mitocôndrias, retículo endoplasmático granular, complexo de Golgi bem desenvolvido (seta), e vesículas de diferentes elétrondensidades. Há ainda contato com elementos fibrilares da matriz extracelular (MEC), e com grânulos (G) que muito se assemelham àqueles liberados por macrófagos na desgranulação anafilática. Barra 1 μm .

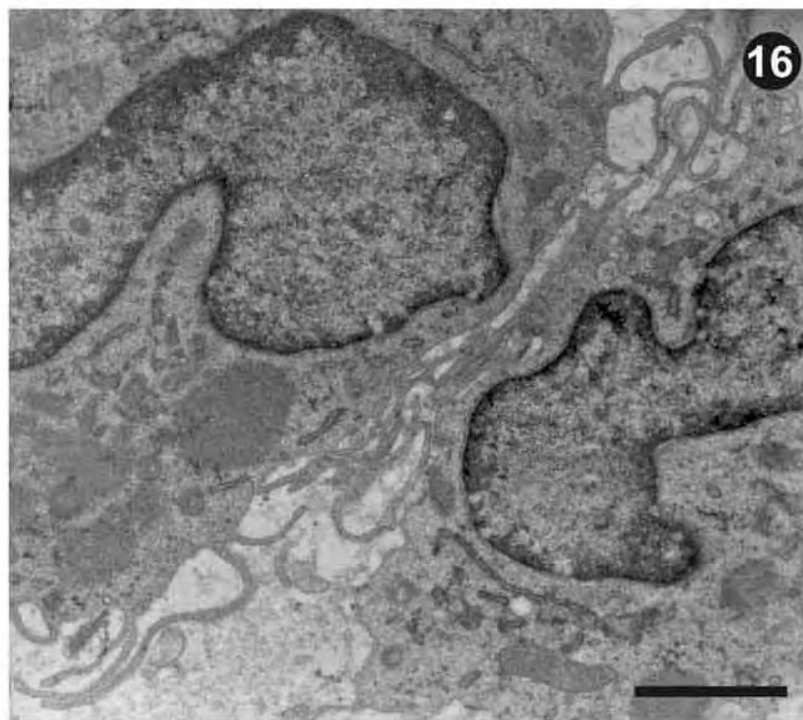
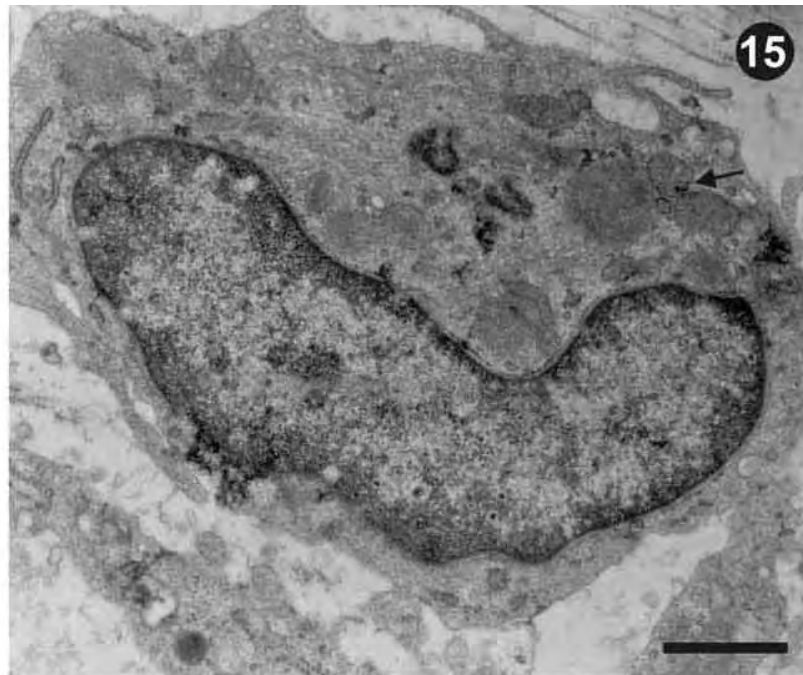


Figura 15. Macrófago do grupo 20S. Os macrófagos de 20 dias do grupo S estão em intensa atividade, caracterizada por seu citoplasma densamente preenchido por vesículas e organelas, inclusive com mitocôndrias (seta) em divisão. Barra 1 μm .

Figura 16. Macrófagos do grupo 20S. Detalhe de células do grupo 20S, mostrando como se processa o contato entre as células e como o mesmo é intenso. Barra 1 μm .

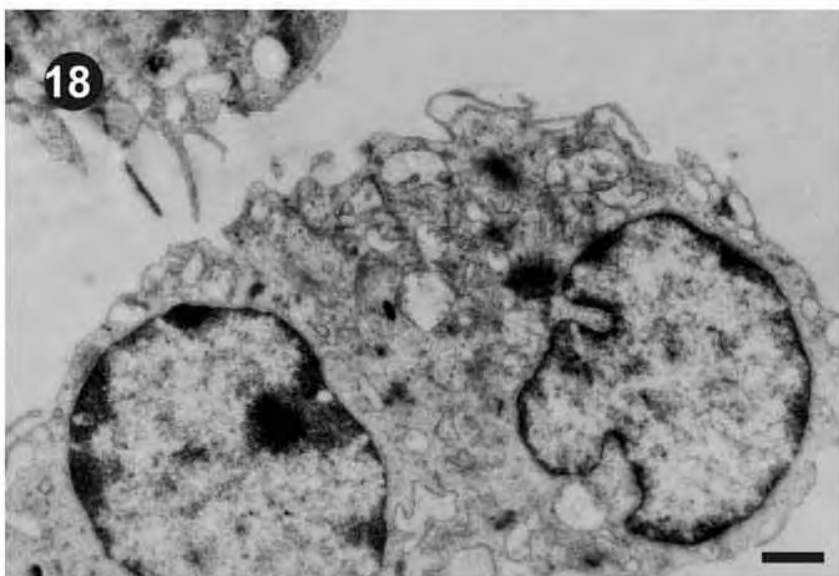
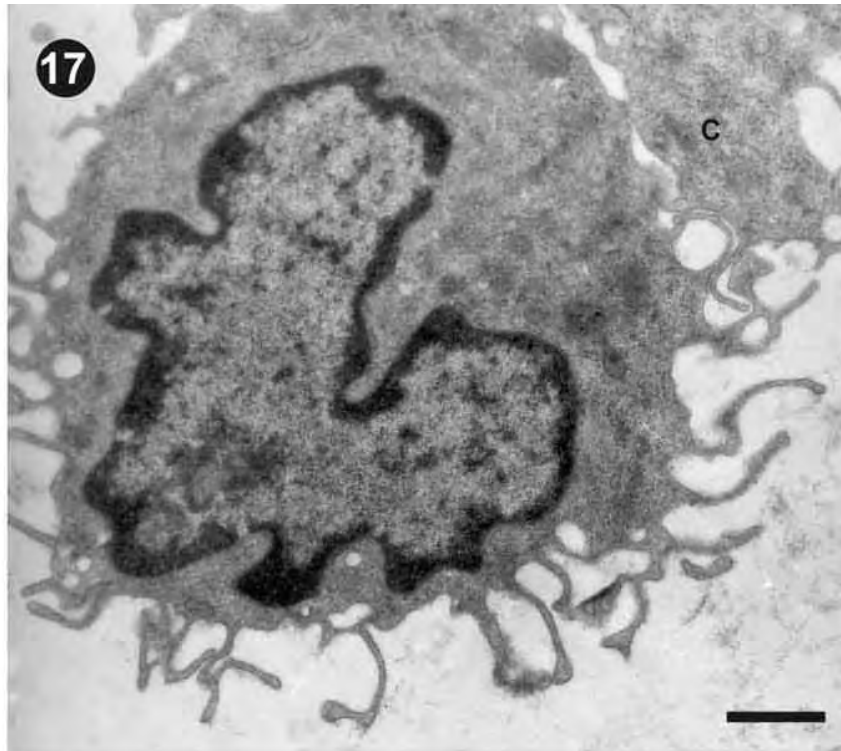


Figura 17. Macrófago do grupo 20T. As células ainda estão bastante ativas e mantêm íntimos contatos com outras células (C). Barra 1 μm .

Figura 18. Esta figura ilustra o contato íntimo entre 2 macrófagos do grupo 20T que se fundiram. Barra 1 μm .

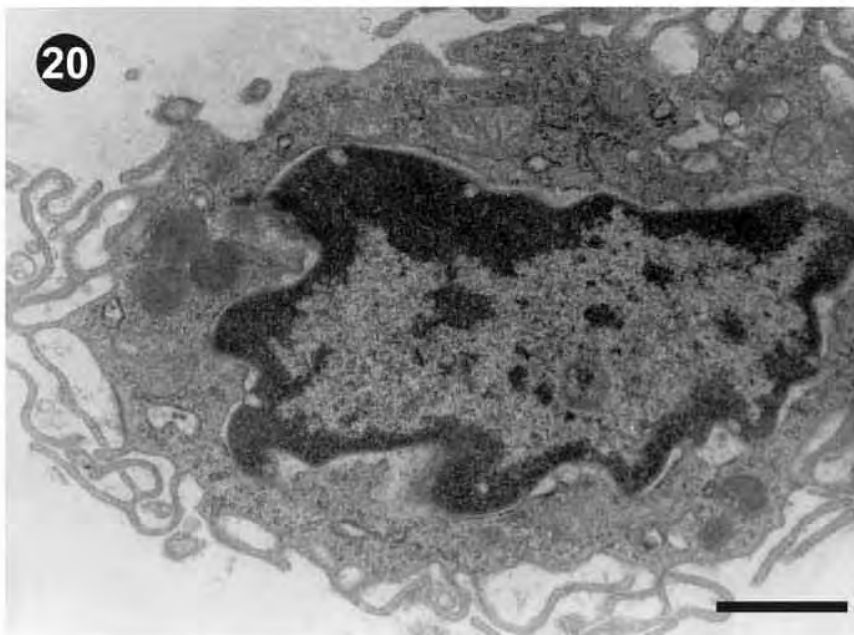
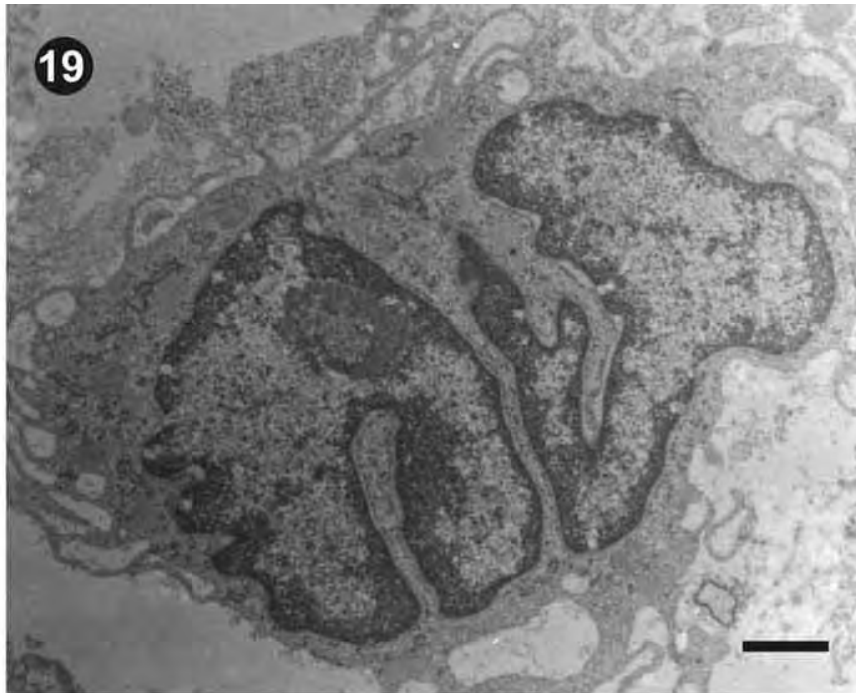


Figura 19. Macrófago do grupo 30S. Esta figura mostra possivelmente a fusão de dois macrófagos, processo que culminará na formação de células gigantes, componentes dos granulomas. Note que já há alteração na morfologia nuclear. Barra 1 μm .

Figura 20. Macrófago do grupo 30S. A célula sozinha preserva os aspectos daquelas descritas até agora para outros estágios. Barra 1 μm .

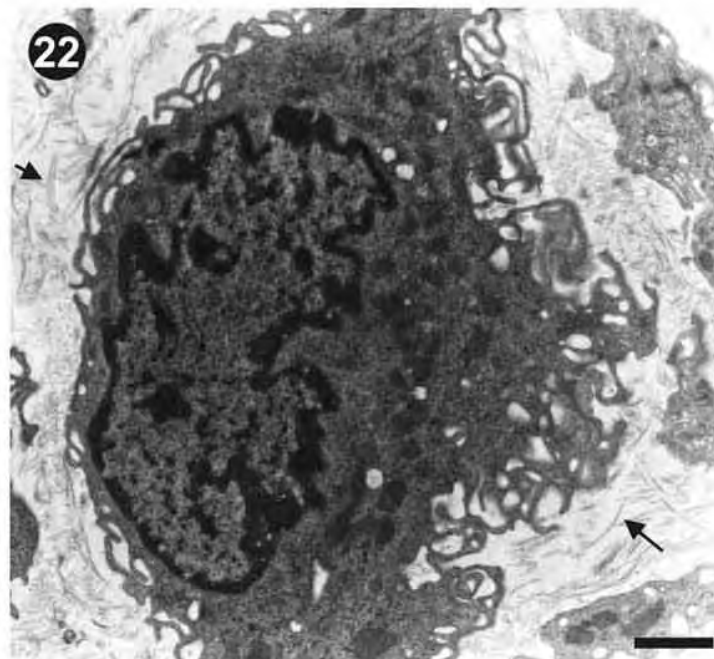
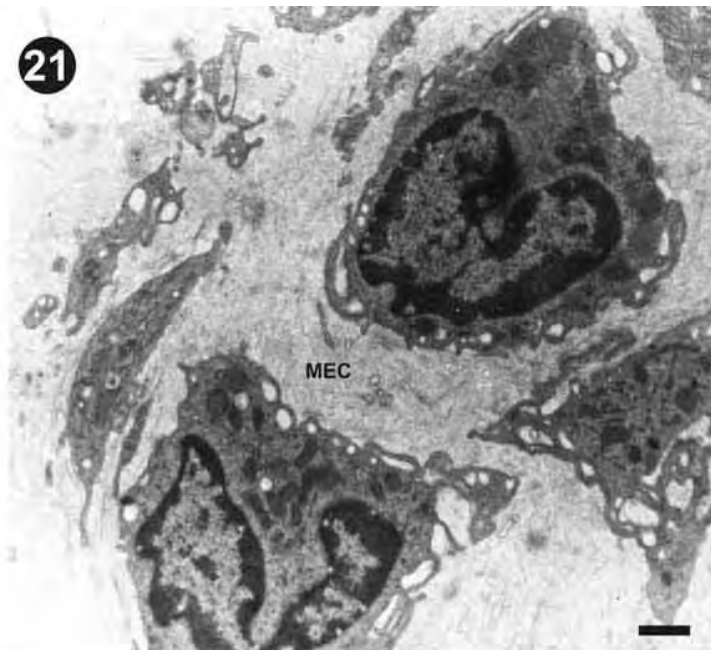


Figura 21. Macrófagos do grupo 30T. Configuração dos macrófagos próximos a uma trabécula de PVC. As células não exibem diferença significativa em relação àquelas já descritas. Mas note que, em meio a muita matriz extracelular (MEC), elas vão arranjando-se de forma circular e provavelmente se unirão no granuloma formado ao redor do PVC. Observe ainda processos citoplasmáticos de outras células, provavelmente outros macrófagos ou fibroblastos, que corroboram a idéia da disposição circular das células e futura união. Barra 1 μm .

Figura 22.. Macrófago do grupo 30T. Aqui, como no grupo 30S célula sozinha preserva os aspectos daquelas descritas até agora, e vai sendo rodeada pela fibras colágenas (seta) matriz extracelular e outras células. Barra 1 μm .

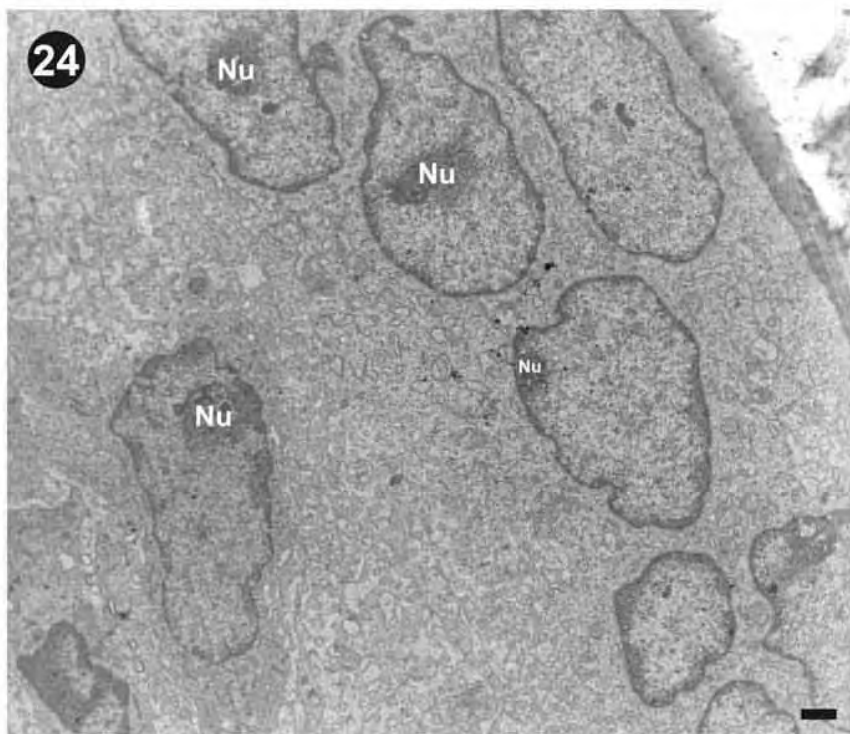
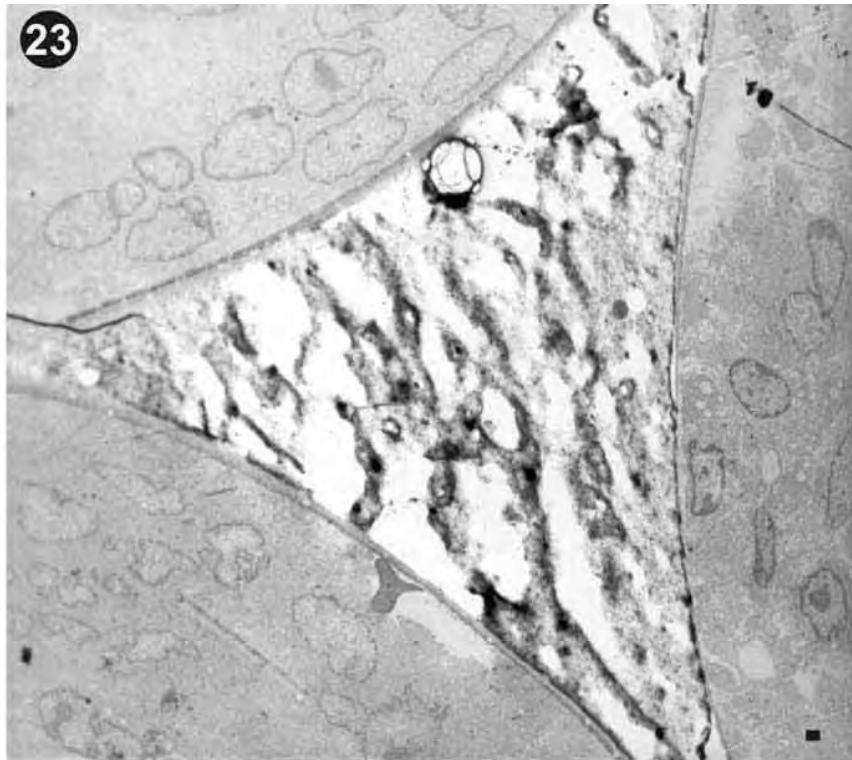


Figura 23. Trabécula de PVC com células epitelióides e células gigantes ao redor. Grupo 20S. Barra 1 μm .

Figura 24. Detalhe de uma célula gigante da figura anterior. Os núcleos são alongados, quase completamente ocupados por eucromatina. Na maioria deles é possível ver o nucléolo (Nu), às vezes na periferia, . Grupo 20S. Barra 1 μm .

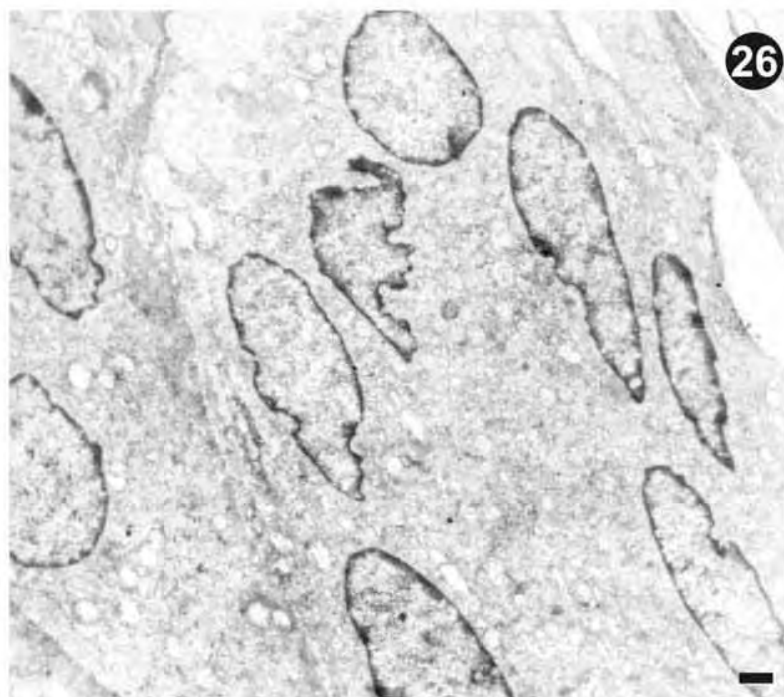
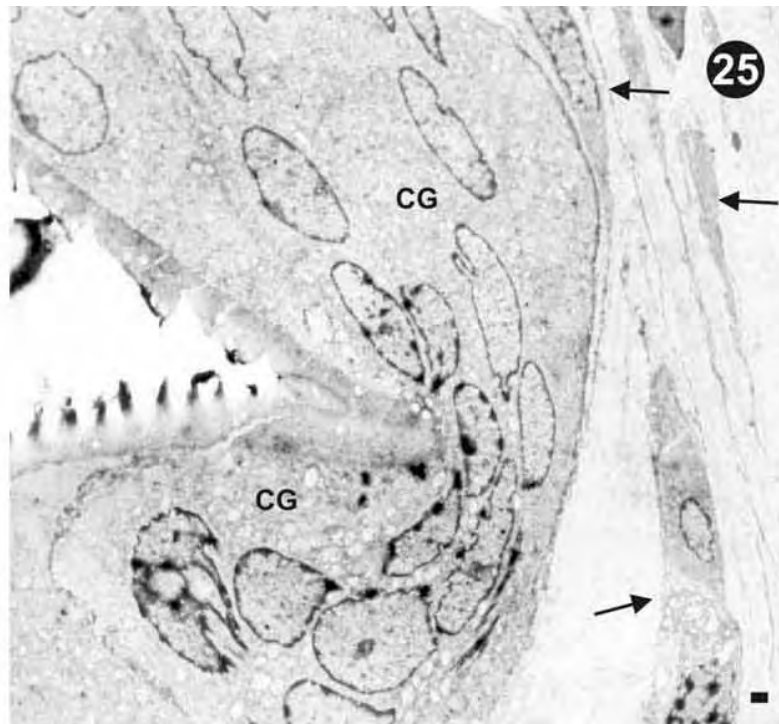


Figura 25. Grupo 20T. Trabécula de PVC com células gigantes ao redor. Note que fibroblastos (seta) circundam a célula gigante (CG) e depositam matriz extracelular, contribuindo para a formação da cápsula. Barra 1 μm

Figura 26. Detalhe da célula gigante da foto anterior. Praticamente não há diferença entre os núcleos do grupo T e S. O citoplasma apresenta-se repleto de vesículas elétron-lúcidas. Barra 1 μm

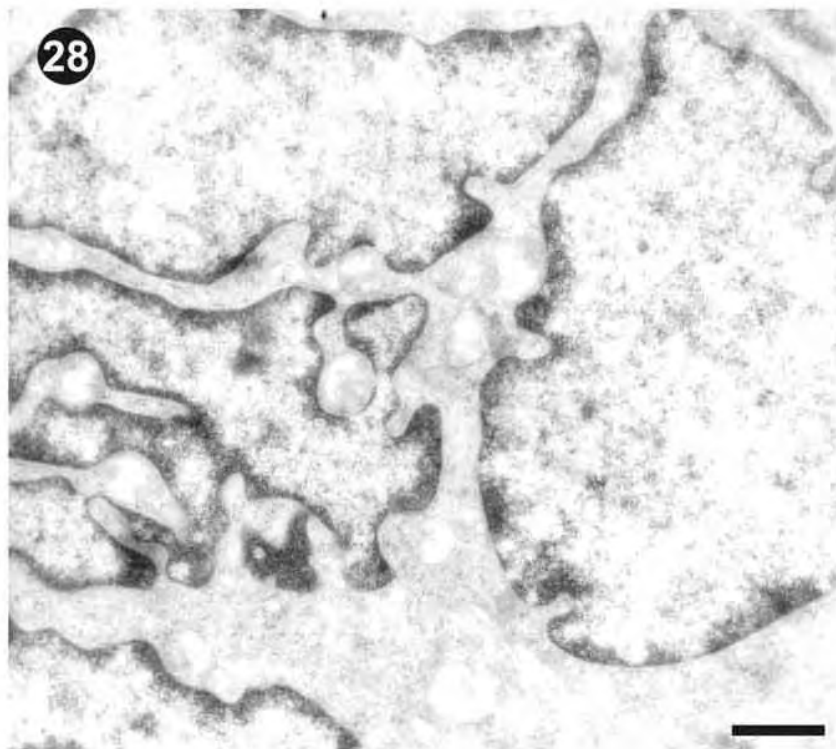
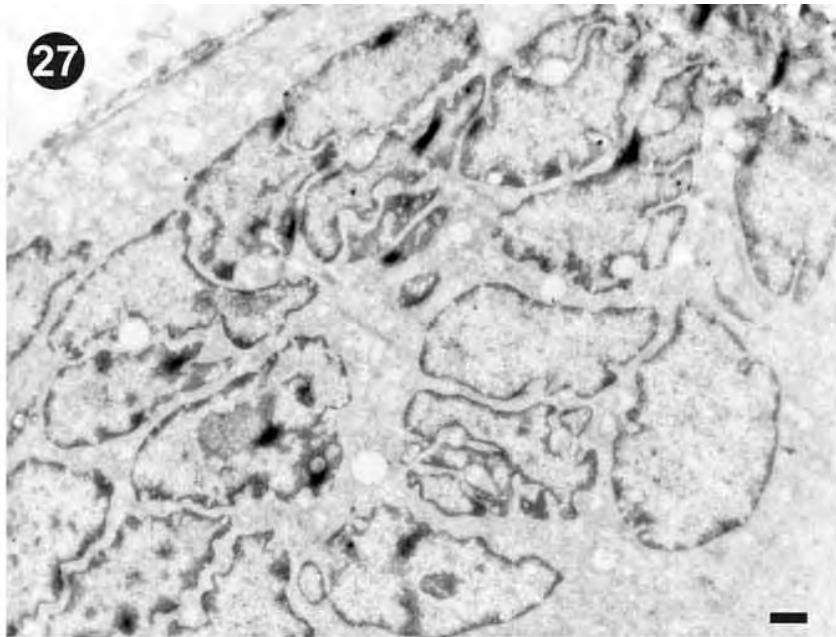


Figura 27. Núcleos de células gigantes do grupo 30S. Note a variedade de formas e a presença de heterocromatina na periferia. Barra 1 μm .

Figura 28. Detalhe de alguns desses núcleos. Repare que muitos lembram os núcleos do grupo de 20 dias enquanto outros apresentam-se bem mais irregulares, com reentrâncias e maior quantidade de heterocromatina na periferia. Barra 1 μm .

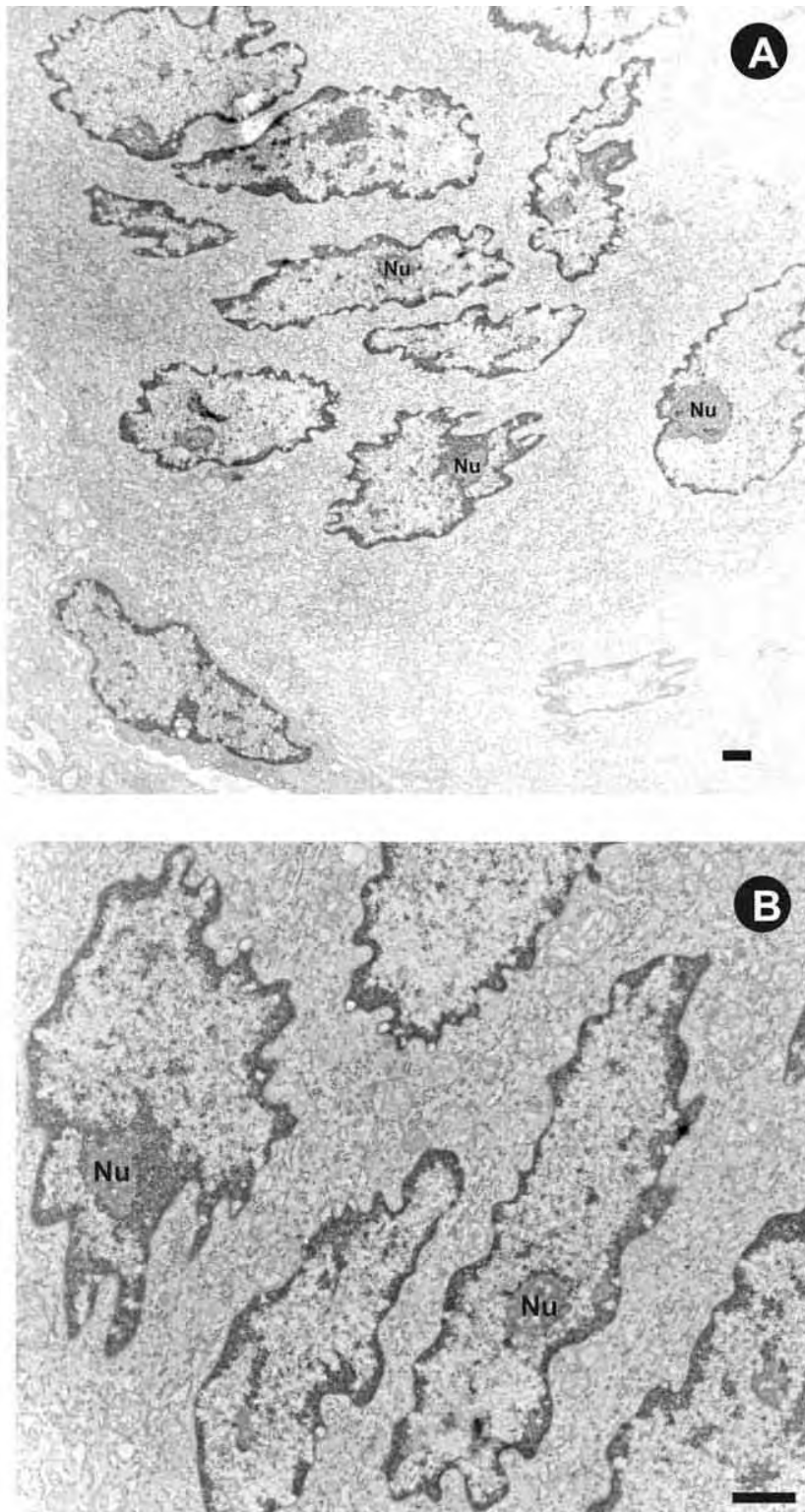


Figura 29. A. Célula gigante do grupo 30T. B. Note o aspecto irregular dos núcleos e dos nucléolos (Nu), mais periféricos, e o aumento na quantidade de heterocromatina em relação às outras células gigantes. Barra 1 μm .

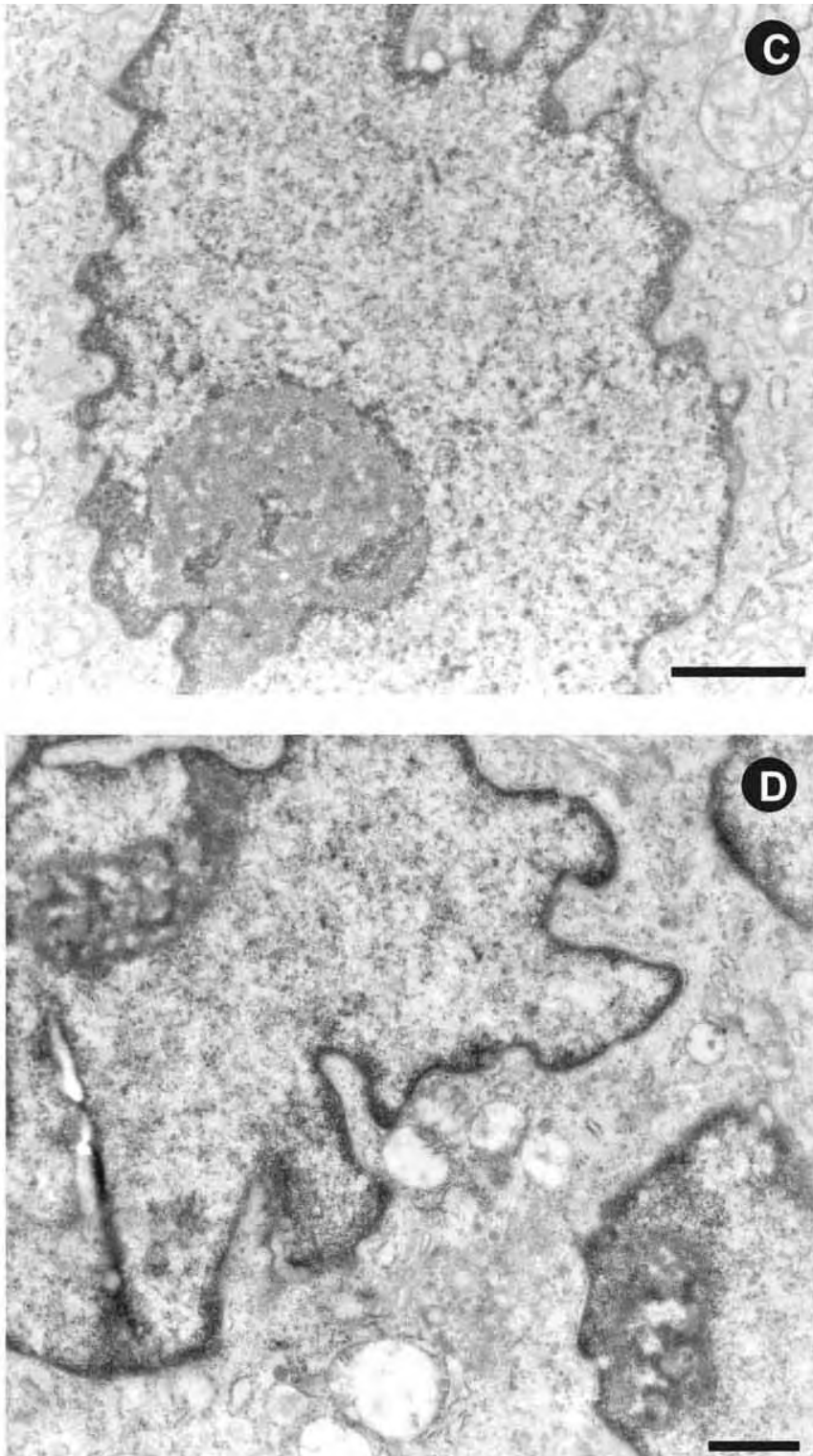


Figura 29. As fotos C e D mostram nucléolos das células gigantes do grupo 30T acentuadamente deslocados para a periferia, apresentando regiões de diferentes elétrón-densidades, configurações bem diferentes daquelas encontradas na morfologia clássica de uma célula. Barra 1 μm .

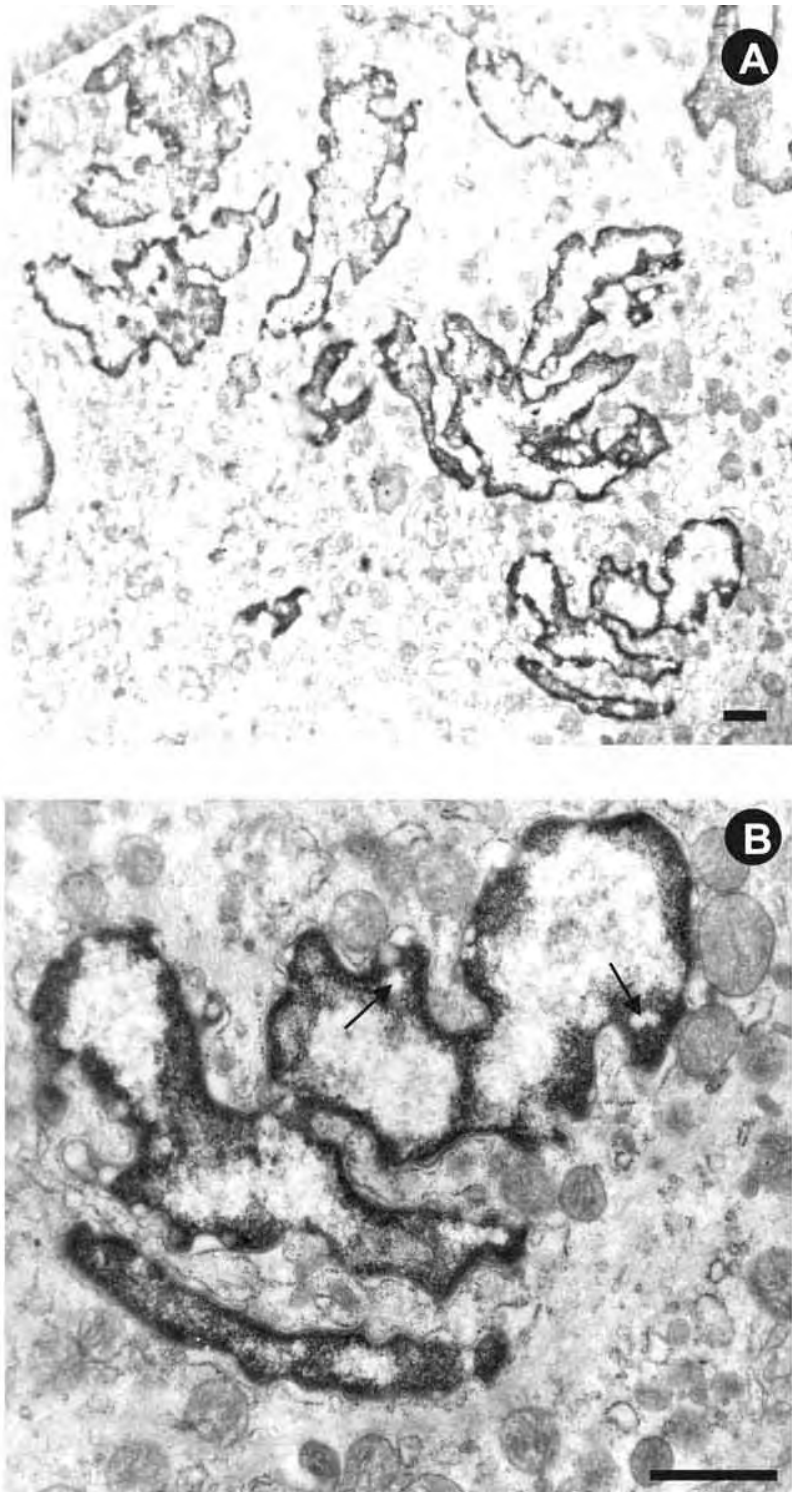


Figura 30. A. Núcleos de célula gigante com características de apoptose do grupo 30T. Aqui os núcleos revelam-se bastante alterados. A heterocromatina encontra-se em quantidade muito maior, os nucléolos não são visualizados e são vistos alguns fragmentos nucleares ou estes estão sendo formados. As mitocôndrias exibem maior elétrón-densidade em relação àquelas observadas em outros estágios. B é um detalhe da figura A. As setas indicam sinais de vacuolização nuclear. Barra 1 μm .

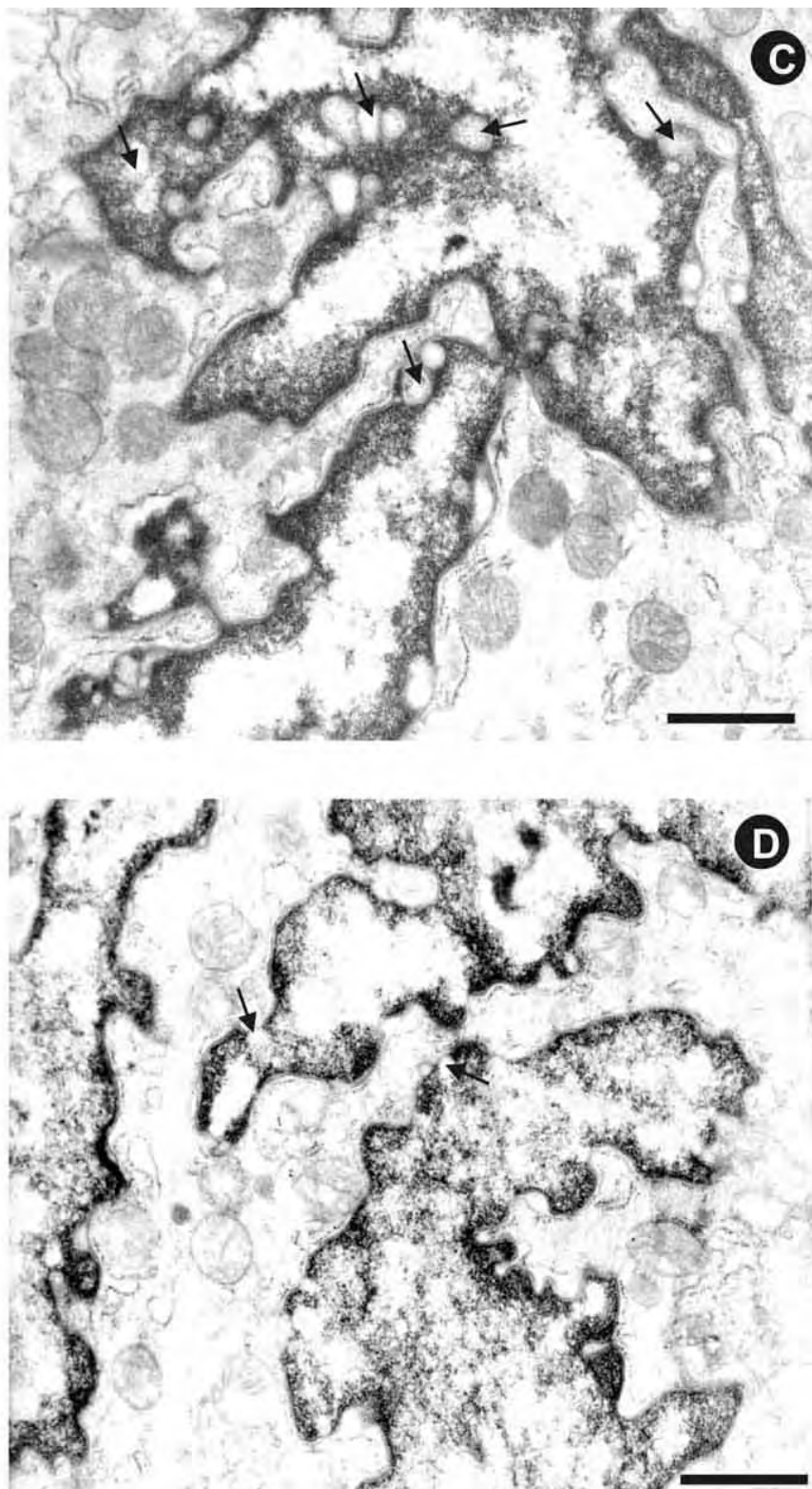


Figura 30. C e D são detalhes da figura A e evidenciam a irregularidade e tendência dos núcleos a formarem porções menores e se vacuolizar (seta), indícios de processo apoptótico. Barra 1 μm .

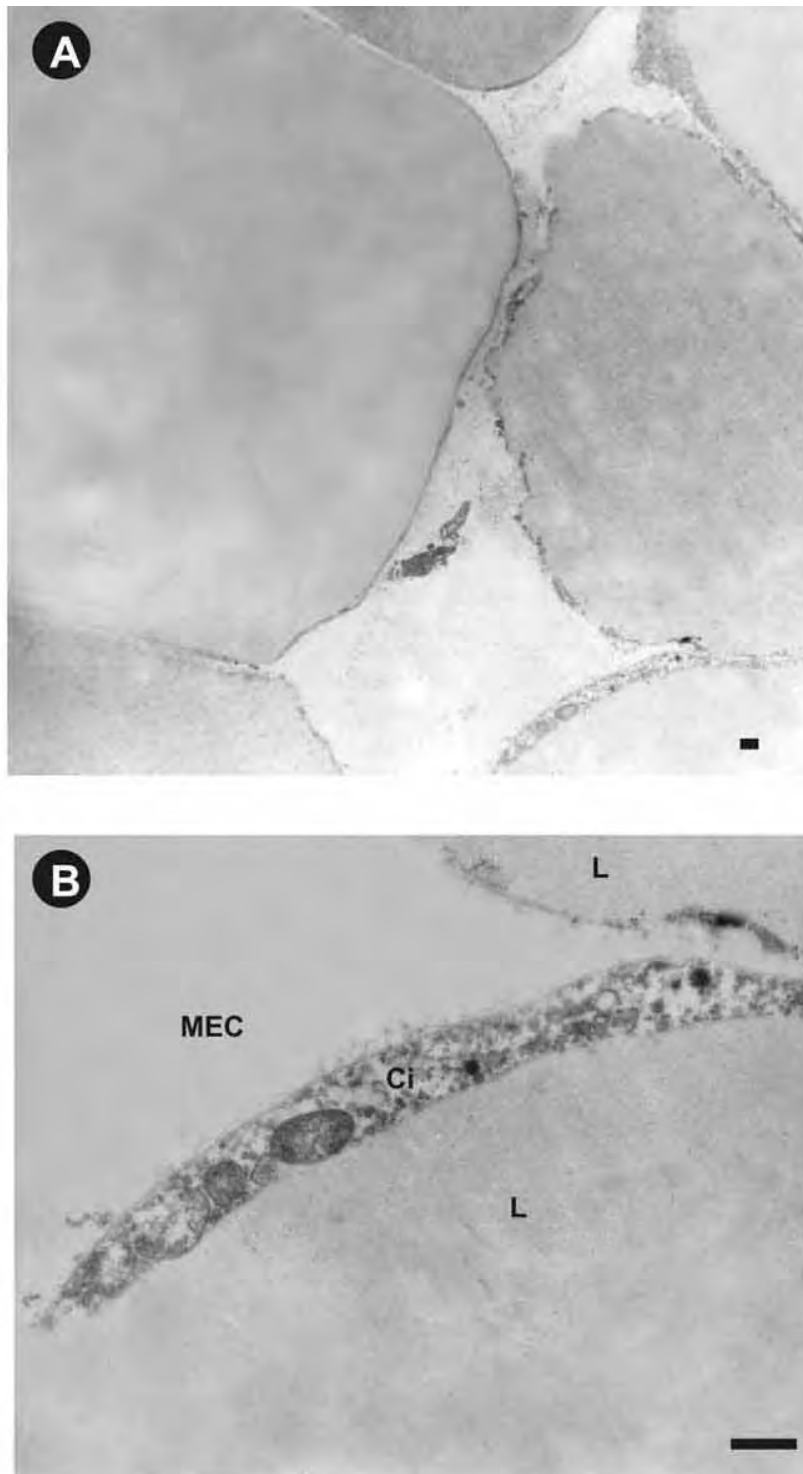


Figura 31. A. Adipócitos do grupo 20S. Dada a grande quantidade de lipídio estocado pela célula, o citoplasma fica restrito à uma fração extremamente pequena do volume celular e é difícil visualizar o núcleo. B. Detalhe de um adipócito da figura anterior. Lipídio (L). Citoplasma (Ci). Matriz extracelular (MEC). Barra 1 μm .

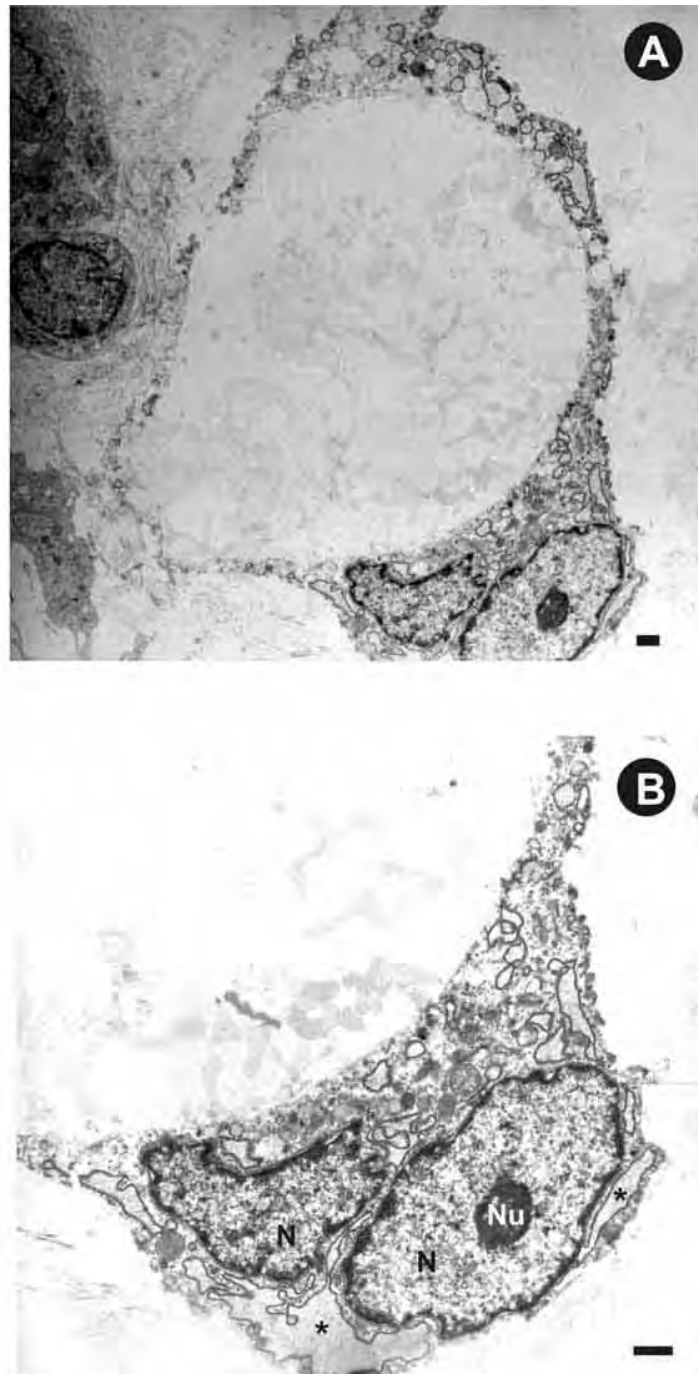


Figura 32. A. Adipócito do grupo 20T. A maior parte do volume celular é preenchido pelo depósito lipídico, ficando o núcleo e o citoplasma restritos à periferia celular. B. Detalhe do adipócito. A variedade de organelas encontrada no citoplasma é bastante grande, incluindo mitocôndrias, polirribossomos e abundante retículo endoplasmático rugoso, além de algumas vesículas. O núcleo (N) aparece em duas porções: em uma delas é possível ver o nucléolo (Nu); a eucromatina predomina e preenche praticamente todo o núcleo, estando a heterocromatina restrita à periferia nuclear. A membrana externa do envoltório nuclear expande-se bruscamente a partir de alguns pontos formando grandes cisternas de retículo endoplasmático rugoso (asterisco) que se estendem por todo o citoplasma. Tais características permitem inferir alta atividade celular. Os adipócitos do grupo T são menores em relação aos do grupo S. Barra 1 μm .

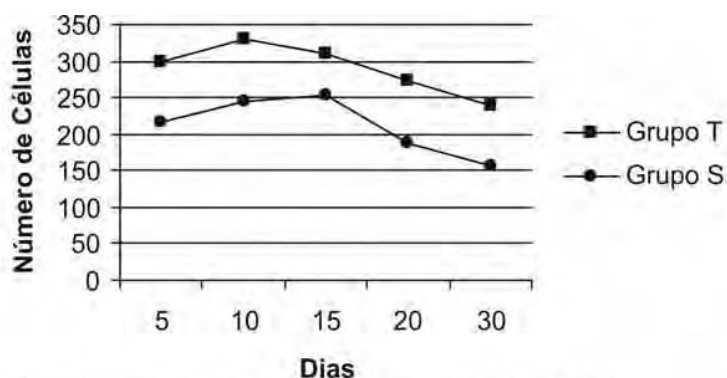


Figura 33. O gráfico compara o número total de macrófagos para cada subgrupo.

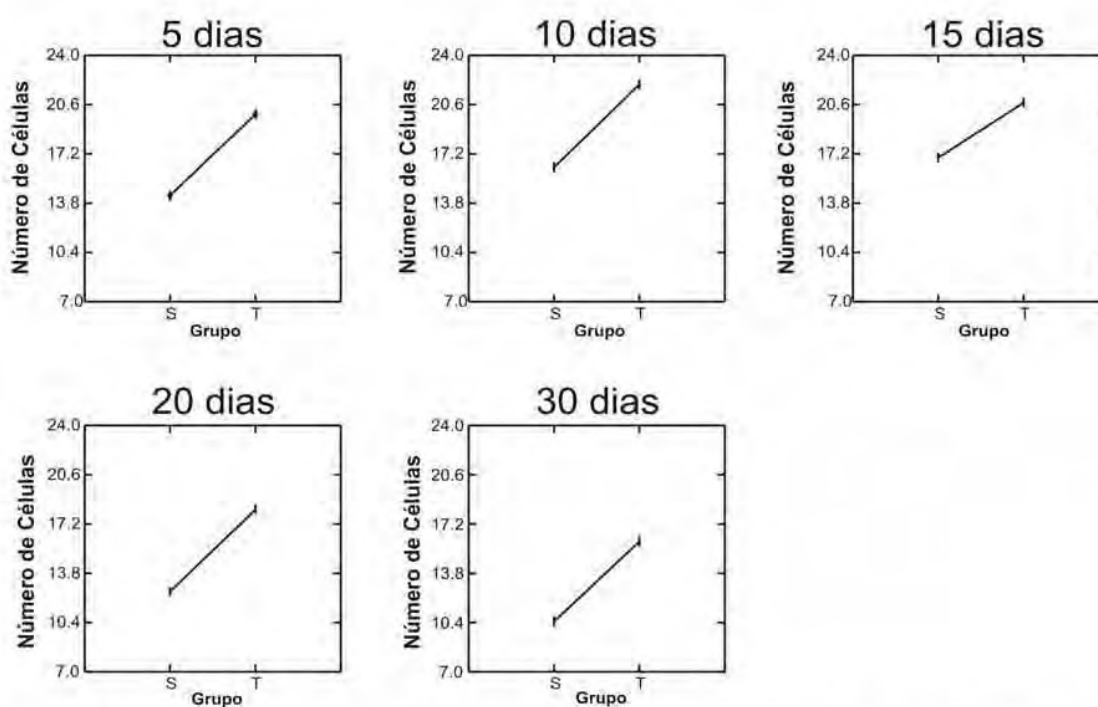


Figura 34. A figura ilustra a diferença de média do número de macrófagos dentro de cada nível de análise. Note como o número de macrófagos do grupo T é maior durante todo o experimento.

Análise de Variância

Fonte	Soma de Quadrados	Graus de Liberdade	Média Quadrática	Razão F	Probabilidade (P)
G	1040.167	1	1040.167	991.084	0.000
T	733.427	4	183.357	174.705	0.000
G*T	20.333	4	5.083	4.843	0.001
Error	146.933	140	1.050		

Tabela 1. Tabela da Análise de Variância do número de macrófagos.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O implante subcutâneo de uma esponja de PVC gerou, como esperado, uma resposta inflamatória e reparadora que progride para a formação de um granuloma de corpo estranho.

Assim como descrito para algumas situações clínicas, como implantes de silicone, o corpo estranho é cercado por uma camada de células que tentam isolá-lo. Tal qual nestas reações, as células predominantes foram fibroblastos, seguidos pelos macrófagos.

Na figura 1 (página 125) é possível observar o padrão de variação das células investigadas nos diferentes grupos. Como discutido nos capítulos precedentes, o pico numérico das células do grupo T ocorre antes do pico numérico das células do grupo S, para quaisquer dos grupos celulares pesquisados. Assim, apesar das análises estatísticas ora indicarem que há interação entre os efeitos dos fatores T e G (no caso dos macrófagos), ora indicarem que tal interação não existe e os efeitos isolados destes fatores são

significativos (no caso de fibroblastos e mastócitos), deve-se prestar atenção de que o tempo é igual para ambos os grupos e é, portanto, em última análise, um elemento que permite a comparação das células sob efeito de diferentes treinamentos. Ou seja, é possível atribuir as diferenças encontradas entre os tipos celulares analisados dos grupos S e T aos efeitos da atividade física moderada.

Ainda com base nesta figura, podemos inferir que o exercício físico moderado, além de beneficiar o processo de reparação tecidual por meio de sua ação nas células, ainda pode potencializar a comunicação entre os diferentes tipos celulares. Note que para o grupo T, o pico numérico dos mastócitos ocorre aos 5 dias, o dos macrófagos aos 10 dias e o dos fibroblastos aos 15 dias. Enquanto para o grupo S o pico numérico para estas mesmas células ocorre aos 10, 15 e 20 dias, respectivamente. Tais relações ganham adicional importância aqui, caso houvesse surgido no leitor dúvidas relativas ao pico numérico dos tipos celulares, dado o intervalo de dias entre as contagens realizadas para cada grupo, pois a figura deixa claro o sentido seqüencial entre as células, com picos consecutivos para cada tipo celular, e a importância de uma para o desempenho de outra, imprimindo aos dados maior firmeza e confiabilidade.

Desta forma, é possível perceber não só a comunicação entre estes tipos celulares, mas também sua interdependência para o sucesso do reparo tecidual, fenômenos executados seja pelo fenômeno célula/célula ou célula/molécula (matriz extracelular, citocinas, fatores de crescimento).

Da mesma forma, fica então corroborada a posição de células efetoras atribuídas aos mastócitos e fibroblastos. Tais células podem contribuir produzindo citocinas e/ou fatores de crescimento, ou influenciando o comportamento de uma série de outras células, incluindo os adipócitos, células endoteliais e pericitos.

Conclui-se assim que os efeitos da atividade física moderada contribuem significativamente para a resolução do processo inflamatório e da reparação tecidual, potencializando a função das células envolvidas. Outrossim, o modelo escolhido para desenvolver o trabalho tem também validade para efetuar comparações com situações clínicas rotineiras. Muito embora, o leitor deva estar atento para o fato já mencionado de que variações no modelo escolhido geram

variações nos padrões de contagem, sem, contudo, provocar alterações nas conclusões obtidas.

Dessa maneira, pode-se prosseguir tais investigações utilizando este modelo para buscar maiores esclarecimentos a respeito destas situações como, por exemplo, quais citocinas e fatores de crescimento são afetados pela atividade física moderada e de que forma, de modo a solucionar situações onde a reparação tecidual torna-se patológica.

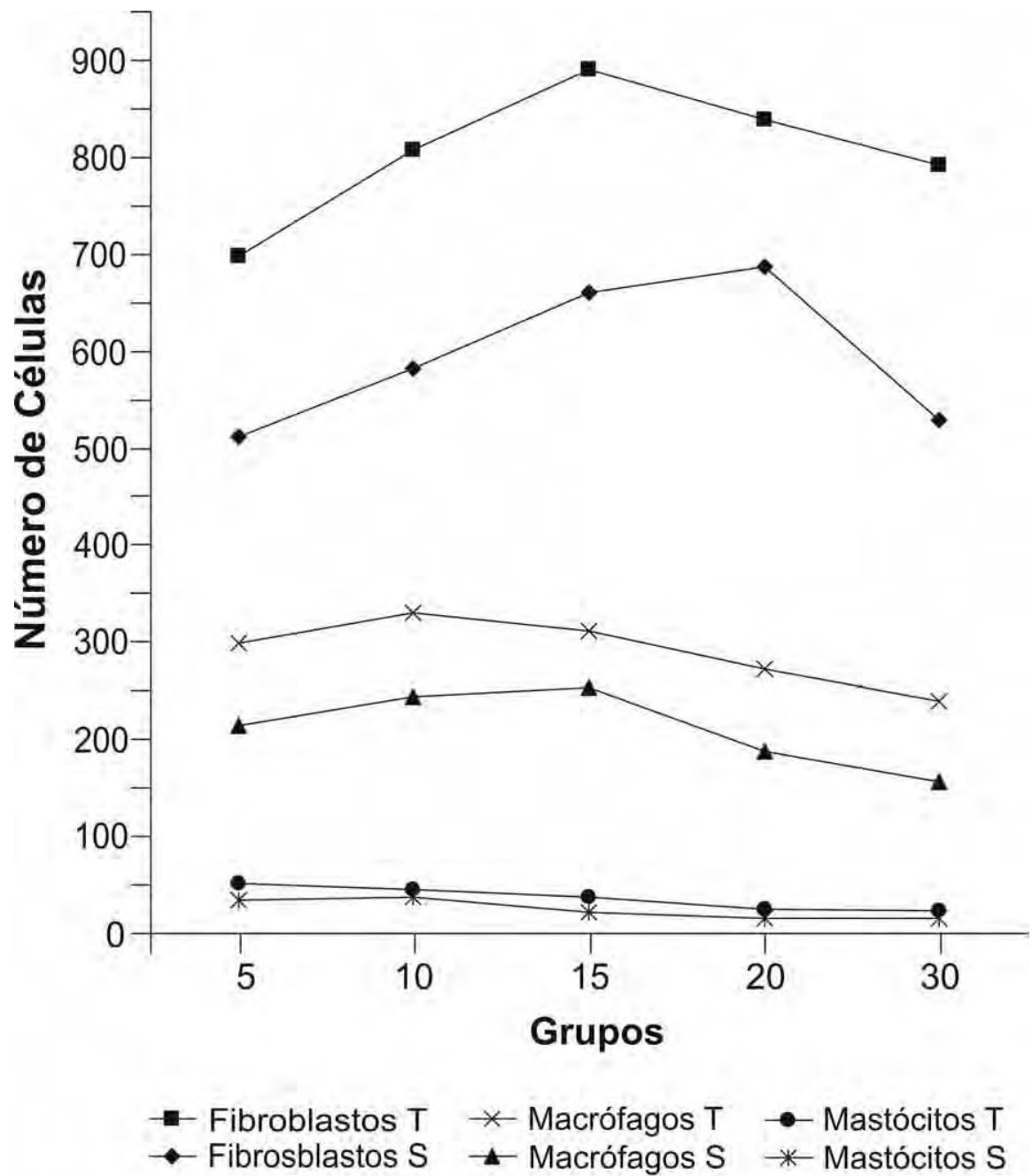


Figura 1. O gráfico ilustra a variação do número total de mastócitos, macrófagos e fibroblastos ao longo do experimento.

LITERATURA GERAL CITADA

AKGUL, C., EDWARDS, S. W. Regulation of neutrophil apoptosis via death receptors. **Cell Mol Life Sci**, v. 60, n. 11, p. 2402-2408. 2003.

AMEMIYA, T.; DAKE, Y. Granuloma after augmentation of the eyelids with liquid silicone: an electron microscopic study. **Ophthal Plast Reconstr Surg**, v.10, n. 1, p. 51-56. 1994.

BAUGH, J. A.; DONNELLY, S. C. Macrophage migration inhibitory factor: a neuroendocrine modulator of chronic inflammation. **J Endocrinol**, v. 179, n.1, p. 15-23. 2003.

BERTON, A.; LEVI-SCHAFFER, F.; EMONARD, H.; GARBUZENKO, E.; GILLERY, P.; MAQUART, F.-X. Activation of Fibroblasts in collagen lattices by mast cell extract: a model of fibrosis. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 30, n. 3, p. 485-492. 2000.

BLEIBERG, I. Colony forming cell-fibroblast development in extracellular matrix-induced bone and bone marrow formation in rat. **Connective Tissue Research**, v. 14, n. 2, p. 121-127. 1985.

BOSQUIAZZO, V. L.; DURANDO, M.; VARAYOUD, J.; RAMOS, J. G.; RODRÍGUEZ, H. A.; MUÑOZ-DE-TORO, M.; LUQUE, E. H. Macrophage density in the pregnant rat uterine cervix is modulated by mast cell degranulation. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 65, n. 2, p. 147-158. 2005.

BUCKLEY, C. D.; PILLING, D.; LORD, J. M.; AKBAR, A. N.; SCHELL-TOELLNER, D.; SALMON, M. Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. **Trends in Immunology**, v. 22, n. 4, p. 199-203. 2001.

BUSNELLO, R. G.; OSOWSKI, F.L.; SCROFERNEKER, M. L., Hipersensibilidade do Tipo IV. In SCROFERNEKER, M. L.; POHLMANN, P. R. (Org.). **Imunologia Básica e Aplicada**. Porto Alegre: Sagra Luzzato, 1998. p. 305-315.

CABRERO, A.; LAGUNA, J. C.; VAZQUEZ, M. Peroxisome proliferator-activated receptors and the control of inflammation. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v.1, n. 3, p. 243-248. 2002.

CHAKRAVARTHY, U.; GARDINER, T. A. Endothelium-derived agents in pericyte function/dysfunction. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 18, n. 4, p. 511-527. 1999.

CHANG, L.; CROWSTON, J. G.; CORDEIRO, M. F.; AKBAR, A. N.; KHAW, P. T. The role of the immune system in conjunctival wound healing after granuloma surgery. **Survey of Ophthalmology**, v. 45, n. 1, p. 49-68.

CHANSON, M.; DEROUETTE, J-P.; ROTH, I.; FOGLIA, B.; SCERRI, I.; DUDEZ, T.; KWAK, B. R. Gap junctional communication in tissue inflammation and repair. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1711, n. 2, p. 197-207. 2005.

CHANTRAIN, C. F.; HENRIET, P.; JODELE, S. EMONARD, H.; FERON, O.; COURTOY, P. J.; DECLERCK, Y. A.; MARBAIX, E. Mechanisms of pericyte recruitment in tumour angiogenesis: A new role for metalloproteinases. **European Journal of Cancer**, v. 42, n. 3, p. 310-318. 2006.

CLARK, R. A. F. Wound Repair: Overview and General Considerations. In: CLARK, R. A. F. (Org.). **The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair**. New York : Plenum Press, 1996. p. 3 – 50.

CURI, R.; LAGRANHA, C. J.; DOI, S. Q.; SELLITTI, D. F.; PROCOPIO, J.; PITÓN-CURI, T. C.; CORLESS, M.; NEWSHOLME, P. Molecular mechanisms of glutamine action. **Journal Of Cellular Physiology**, v. 204, n. 2, p. 392-401. 2005.

DACKIW, A. P. B.; NATHENS, A. B.; RIBEIRO, M. B.; CHEUNG, P. Y. C.; MARSHALL, J. C.; ROTSTEIN, O. D. Mast cell modulation of macrophage procoagulant activity and TNF production. **Journal of Surgical Research**, v. 59, n. 1, p. 1-5. 1995.

DESMOULIÈRE, A.; GABBIANI, G. The role of the myofibroblast in wound healing and fibroconnective diseases. In: CLARK, R. A. F. (Org.). **The Molecular**

and **Cellular Biology of Wound Repair**. New York : Plenum Press, 1996. p. 391-423.

DOLORES, W.; CHTISTIAN, R.; HARALD, N.; HILDEGUNDE, P.; GEORG, W. Cellular and molecular composition of fibrous capsules formed around silicone breast implants with special focus on local immune reactions. **Journal of Autoimmunity**, v. 23, n. 1, p. 81-91. 2004.

DRIESEN, R.B.; DISPERSYN, G. D.; VERHEYEN, F. K.; VAN DEN EIJNDE, S. M.; HOFSTRA, L.; TONÉ, F.; DIJKSTRA, P.; DEBIE, W.; BORGERS, M.; RAMAEKERS, F. C. S. Partial cell fusion: A newly recognized type of communication between dedifferentiating cardiomyocytes and fibroblasts. **Cardiovascular Research** , v.68, n. 1, p. 37-46. 2005.

DVORAK, A. M.; COSTA, J. J.; MONAHAN-EARLEY, R. A.; FOX, P.; GALLI, S. J. Ultrastructural analysis of human skin biopsy specimens from patients receiving recombinant human stem cell factor: Subcutaneous injection of rhSCF induces dermal mast cell degranulation and granulocyte recruitment at the injection site. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 101, n. 6, p. 793-806. 1998.

DVORAK, A. M.; MORGAN, E. S. Diamine oxidase-gold enzyme-affinity ultrastructural demonstration that human gut mucosal mast cells secrete histamine by piecemeal degranulation in vivo. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 99, n.6, p. 812-820. 1997.

DVORAK, A. M.; SCHROEDER, J. T.; MACGLASHAN, D. W.; BRYAN, K. P.; MORGAN, E. S.; LICHTENSTEIN, L. M.; MACDONALD, S. M. Comparative ultrastructural morphology of human basophils stimulated to release histamine by anti-IgE, recombinant IgE-dependent histamine-releasing factor, or monocyte chemotactic protein-1. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**. v. 98, n. 2, p. 355-370. 1996.

EVERETT, E. T.; PABLOS, J. L.; HARLEY, R. A.; LEROY, E. C.; NORRIS, J. S., The role of mast cells in the development of skin fibrosis in tight-skin mutant mice. **Comp Biochem Physiol**, v. 110A, n. 2, p. 159-165. 1995.

EYDEN, B.; TZAPHLIDOU, M. Structural variations of collagen in normal and pathological tissues: role of electron microscopy. **Micron**, v. 32, n. 3, p. 287-300. 2001.

FANTUZZI, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 115, n. 5, p. 911-919. 2005.

FIELD, C J; GOUGEON, R; MARLISS, E B. Circulating Mononuclear Cell Numbers and Function During Intense Exercise and Recovery. **J Appl Physiol**, v. 71, n. 3, p. 1089-1097, 1991.

FOUGEROLLES, A. R.; KOTELIANSKY, V. E. Regulation of monocyte gene expression at the extracellular matrix and its functional implications. **Immunological Reviews**, v. 186, p. 208-220, n. 2. 2002.

GIORGIO, S. Macrófagos. In: Carvalho, H. F.; Collares-Buzato, C. B. (Org.). **Células: uma abordagem multidisciplinar**. Barueri: Ed. Manole, 2005, p. 372-381.

GRAVES, D. T.; ALSULAIMANI, F.; DING, Y.; MARKS, S. C. Jr. Developmentally regulated monocyte recruitment and bone resorption are modulated by functional deletion of the monocytic chemoattractant protein-1 gene. **Bone**, v. 31, n. 2, p. 282-287. 2002.

GRIP, O.; JANCIAUSKIENE, S.; LINDGREN, S. Macrophages in inflammatory bowel disease. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v. 2, n. 2, p. 155-160. 2003.

GUI-PING, Y; LI-RUI, D.; TAO, X.; XIAN-HUI, H.; HUAN, Q.; LI-HUI, X.; XIAO-DONG, C.; SHENG-QIU, F.; ZAI-QING, Y. One in vitro model for visceral adipose-derived fibroblasts in chronic inflammation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.333, n.3, p.850-857. 2005.

GURISH, M. F.; BOYCE, J. A. Mast cells: Ontogeny, homing and recruitment of a unique innate effector cell. **J Allergy Clin Immunol**, v. 117, n. 6, p. 1285-1291. 2006.

HIRSCHI, K. K.; D'AMORE, P. Pericytes in the microvasculature. **Cardiovascular Research**, v. 32, n. 4, p. 687-698. 1996.

IBA, Y.; SHIBATA, A.; KATO, M.; MASUKAWA, T. Possible involvement of mast cells in collagen remodeling in the late phase of cutaneous wound healing in mice. **International Immunopharmacology**, v. 4, n. 14, p. 1873-1880. 2004.

JAMUR, M. C. Mastócitos. In: Carvalho, H. F.; Collares-Buzato, C. B. (Org.). **Células: uma abordagem multidisciplinar**. Barueri: Ed. Manole, 2005. p. 382-391.

JUNG, Y. YASOSHIMA, A.; SAEGUSA, J.; NAKAYAMA, H.; DOI, K. Ultrastructural features of mast cells in picryl chloride (PCL)-induced contact dermatitis in IQI/Jic mice. **Exp Toxic Pathol**, v. 54, n. 4, p. 265-271. 2003.

JUNQUEIRA, L. C; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. Rio de janeiro: Editora Guanabara Koogamn S. A., 9ª edição, 1999. p. 84-85.

KOYAMA, K; KAYA, M; TSUJITA, J; HORI, S. Effects of Decreased Plasma Glutamine Concentrations on Peripheral Lymphocyte Proliferation in Rats. **Eur Appl Physiol**, v. 77, n. 1-2, p. 25-31. 1998.

KURKINEN, M. Sequential Appearance Of Fibronectin And Collagen In Experimental Granulation Tissue. **Lab Invest**, v.43, n. 1, p. 47-51. 1980.

LEFÈVRE, F.; GARNOTEL, R.; GEORGES, N.; GILLERY, P. Modulation of Collagen Metabolism by the Nucleolar Protein Fibrillarin. **Experimental Cell Research**, v. 271, n. 1, p. 84-93. 2001.

LEFÈVRE, F.; LORENZATO, M.; GEORGES, N.; CLAVEL, C.; BIREMBAUT, P.; GILLERY, P. Decreased number of nucleolar organizing regions in collagen lattice cultured fibroblasts. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences - Series III - Sciences de la Vie**, v. 321, n. 12, p. 991-997, 1998.

LETOURNEAU, R.; ROZNIECKI, J. J.; DIMITRIADOU, V.; THEOHARIDES, T. C. Ultrastructural evidence of brain mast cell activation without degranulation in monkey experimental allergic encephalomyelitis. **Journal of Neuroimmunology**, v. 145, n. 1-2, p. 18-26. 2003.

LOGAN, M.; ODEMUYIWA, S.; MOQBEL, R. Understanding exocytosis in immune and inflammatory cells: The molecular basis of mediator secretion. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, n. 5, p. 923-932. 2003.

LOWDER, T.; PADGETT, D. A.; WOODS, J. A. Moderate exercise protects mice from death due to influenza virus. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 19, n. 5, p. 377-380. 2005.

MAACK, T. Receptor of Atrial Natriuretic Factor. **Annu Rev Physiol**, v. 54, p. 11-27. 1992.

MATSUNAGA, K.; ITO, M. Quantitative analysis of apoptotic cell death in granulomatous inflammation induced by intravenous challenge with *Cryptococcus neoformans* and bacillus Calmette-Guérin vaccine. **Pathology International**, v. 50, n. 3 p. 206-218. 2000.

MORAES, S. G.; JOAZEIRO, P.P. Fibroblasto. In: Carvalho, H. F.; Collares-Buzato, C. B. (Org.). **Células: uma abordagem multidisciplinar**. Barueri: Ed. Manole, 2005. p. 22-33.

NAGAI, H.; ABE, T.; YAMAGUCHI, I.; MITO, K.; TSUNEMATSU, M.; KIMATA, M.; INAGAKI, N. Role of mast cells in the onset of IgE-mediated late-phase cutaneous response in mice. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.106, n. 1, sup. 1, p. s 91-s98. 2000.

NAIR, M. G.; COCHRANE, D. W.; ALLEN, E. J. Macrophages in chronic type 2 inflammation have a novel phenotype characterized by the abundant expression of *Ym1* and *Fizz1* that can be partly

replicated in vitro. **Immunology Letters**, v. 85, n. 2, p. 173-180. 2003.

NAWROCKI, A. R.; SCHERER, P. E. The adipocyte as a drug discovery target. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 18, p. 1219-1230. 2005.

NIEMAN, D. C. Exercise, Infection and Immunity. **Int J Sports Med**, v. 15, sup. 3, p. s131-141. 1994.

NIEMAN, D. C. Exercises Immunology: integration and regulation. **Int J Sports Med**, v. 19, sup. 3, p. s171. 1998.

NOËL, W.; RAES, G.; GHASSABEH, G. H.; BAETSELIER, P.; BESCHIN, A. Alternativy activated macrophages during parasite infections. **Trends in Parasitology**, v. 20, n. 3, p. 126-133. 2004.

NORDBORG, C.; NORDBORG, E.; PETURSDOTTIR, V. The pathogenesis of giant cell arteritis: morphological aspects. **Clin Exp Rheumatol**, v. 18, n. 4, sup. 20, p. S18-21. 2000.

OKAMOTO, H.; MIZUNO, K.; HORIO, T. Monocyte-derived multinucleated giant cells and sarcoidosis. **Journal of Dermatological Science**, v. 31, n. 2, p. 119-128. 2003.

ORDOVÁS, K.; SCROFERNEKER, M. L., Imunidade Celular. In SCROFERNEKER, M. L. e POHLMANN, P. R. (Org.) **Imunologia Básica e Aplicada**, Porto Alegre: Sagra Luzzato, p. 169-171, 1998.

PEACOCK, E. E.; VANWINKLE, W. **Wound Repair**, 3rd ed., WB Saunders, 1985. p. 55-56.

PEIJIE, C.; HONGWU, L.; FENGPENG, X.; JIE, R.; JIE, Z. Heavy load exercise induced dysfunction of immunity and neuroendocrine responses in rats. **Life Sciences**, v. 72, n. 20, p. 2255-2262. 2003.

RAULIN, C.; GREVE, B.; HARTSCHUH, W.; SOEGDING, K. Exudative Granulomatous Reaction to Hyaluronic Acid (Hylaform). **Contact Dermatitis**, v. 43, n. 3, p. 178-179. 2000.

RICHES, D. W. H. Macrophage Involvement in Wound Repair Remodeling and Fibrosis. In: CLARK, R. A. F. (Org.). **The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair**. New York : Plenum Press, 1996. p. 95 – 141.

ROBERTS, C. K.; WON, D.; PRUTHI, S.; LIN, S. S.; BARNARD, R. J. Effect of a diet and exercise intervention on oxidative stress, inflammation and monocyte adhesion in diabetic men. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v.73, n. 3, p. 249–259, 2006.

RONDO, J. W.; VIDARTE, G.; MICHALANY, N. Histologic study of the skin with gold thread implantation. **Plast Reconstr Surg**, v. 97, n.1, p.256-258. 1996.

SCHILLING, M.; BESSELMANN, M.; LEONHARD, C.; MUELLER, M.; RINGELSTEIN, E. B.; KIEFER, R. Microglial activation precedes and predominates over macrophage infiltration in transient focal cerebral ischemia: a study in green fluorescent protein transgenic bone marrow chimeric mice. **Experimental Neurology**, v. 183, n. 1, p. 25-33. 2003.

SMITH, J. A. Exercises Immunology And Neutrophilis. **Int J Sports Med**, v.18, sup.1, p. s46-s55. 1997.

SONG, E.; OUYANG, N.; HÖBERLT, M.; ANTUS, B.; WANG, M.; EXTON, M. S. Influence of alternatively and classically activated macrophages on fibrogenic activities of human fibroblasts. **Cellular Immunology**, v. 204, n. 1, p. 19-28. 2000.

SOTTILE, J. Regulation of angiogenesis by extracellular matrix. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1654, n. 1, p. 13-24. 2004.

SPORN, M. B.; ROBERTS, A. B. Peptide Growth Factors And Inflammation, Tissue Repair, And Cancer. **J Clin Invest**, v. 78, n. 2, p. 329-332. 1986.

STEINER, S.; NIESSNER, A.; ZIEGLER, S.; RICHTER, B.; SEIDINGER, D.; PLEINER, J.; PENKA, M.; WOLZT, M.; HUBER, K.; WOJTA, J.; MINAR, E.; KOPP, C. W. Endurance training increases the number of endothelial progenitor cells in patients with cardiovascular risk and coronary artery disease. **Atherosclerosis**, v. 181, n. 2, p. 305-310. 2005.

STERNFELD, B. Cancer and teh Protective Effect of Physical Activit: The Epidemiological Evidence. **Med Sci Sports Exer**, v. 24, n. 11, p. 1195-1209. 1992.

THOMSEN, P.; GRETZER, C. Macrophage interactions with modified material surfaces. **Current Opinion in Solid State and Material Science**, v. 5, n. 2-3, p. 163-176. 2001.

TSIROGIANNI, A. K.; MOUTSOPOULOS, N. K.; MOUTSOPOULOS, M. H. Wound healing: Immunological aspects. **Injury**, v. 37, n. 1, s. 1, p. S5-S12. 2006.

VIGOR, C.; ROLFE, K. J.; RICHARDSON, J.; BAKER, R.; GROBBELAAR, A.; LINGE, C. The involvement of the ECM and RGD peptides in apoptosis induction during wound healing. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, v. 59, n. 9, p. S4. 2006.

WALKER, A.; WARD, C.; DRANSFIELD, I.; HASLETT, C.; ROSSI, A. G. Regulation of Granulocyte Apoptosis by Hemopoietic Growth Factors, Cytokines and Drugs: Potential Relevance to Allergic Inflammation. **Curr Drug Targets Inflamm Allergy**, v.2, n. 4, p. 339-347. 2003.

WELCH, M. P.; ODLAND, G. F.; CLARK, R. A. Temporal Relationships Of F-Actin Bundle Formation, Collagen And Fibronectin Matrix Assembly, And Fibronectin Receptor Expression To Wound Contraction. **J Cell Biol**, v. 110, n. 1, p. 133-145. 1990.

WOODS, J A; CEDDIA, M A; KOZAK, C; WOLTERS, B W. Effects Of Exercise On Macrophage MHC II Response to Inflammation. **Int J Sports Med**, v. 18, n. 6, p. 483-488. 1997.

WOODS, J. A.; CEDDIA, M. A.; ZACK, M. D.; LOWDER, T. W.; LU, Q. Exercise training increases the naïve to memory T cell ratio in old mice. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 17, n. 5, p. 384-392. 2003.

YAMAMOTO, T.; KATAYAMA, I.; NISHIOKA, K. Mast cell numbers in multiple dermatofibromas. **Dermatology**, v. 190, n. 1, p. 9-13. 1995.

YANAGIHARA, M.; FUJII, T.; WAKAMATU, N.; ISHIZAKI, H.; TAKEHARA, T., NAWATE, K. Silicone Granuloma on the Entry Points of Acupuncture, Venepuncture and Surgical Needles. **J Cutan Pathol**, v. 27, n. 6, p. 301-305. 2000.