

Milca Ribeiro Saruhashi

QUANTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS DO OXIGÊNIO E DO
NITROGÊNIO PARA AVALIAÇÃO DO ESTADO FUNCIONAL DE
MACRÓFAGOS: IMPLANTAÇÃO DAS TÉCNICAS NO
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA DO INSTITUTO LAURO DE
SOUZA LIMA

INSTITUTO LAURO DE SOUZA LIMA

Bauru-SP

2010

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE TREINAMENTO E ENSINO

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL:

S77q

Saruhashi, Milca Ribeiro.

Quantificação dos metabólitos do oxigênio e do nitrogênio para
avaliação do estado funcional de macrófagos : implantação das
técnicas no laboratório de Biologia do Instituto Lauro de Souza Lima /
Milca Ribeiro Saruhashi, 2010.

58 f. : il.

Orientadora: Dra. Fátima Regina Vilani Moreno

Monografia (Aprimoramento Profissional em Análises Clínicas)–
Secretaria de Estado da Saúde. Coordenadoria de Controle de Doenças.
Instituto Lauro de Souza Lima, Bauru, 2010

1. Macrófagos. 2. Peróxido de hidrogênio. 3. Superóxido. 4. Óxido
nítrico. I. Secretaria de Estado da Saúde. Coordenadoria de Controle de
Doenças. Instituto Lauro de Souza Lima. II. Título.

QW690

SECRETARIA DE ESTADO DA SAÚDE

PROGRAMA DE APRIMORAMENTO PROFISSIONAL

Milca Ribeiro Saruhashi

**QUANTIFICAÇÃO DOS METABÓLITOS DO OXIGÊNIO E DO
NITROGÊNIO PARA AVALIAÇÃO DO ESTADO FUNCIONAL DE
MACRÓFAGOS: IMPLANTAÇÃO DAS TÉCNICAS NO
LABORATÓRIO DE BIOLOGIA DO INSTITUTO LAURO DE
SOUZA LIMA**

Monografia apresentada ao Programa de Aprimoramento
Profissional/SES em Análises Clínicas do Instituto Lauro
de Souza Lima.

Orientadora: Dr^a. Fátima Regina Vilani Moreno

INSTITUTO LAURO DE SOUZA LIMA

Bauru-SP

2010

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fátima Regina Vilani Moreno

Divisão de Pesquisa e Ensino - Equipe Técnica de Biologia - Instituto Lauro de Souza Lima

Primeiro Titular: Dr^a. Sílvia Cristina Barboza Pedrini

Divisão de Dermatologia - Seção de Laboratório de Patologia Clínica - Setor de Biotério - Instituto Lauro de Souza Lima

Segundo Titular: Dr^a. Sônia Maria Usó Ruiz Silva

Divisão de Pesquisa e Ensino - Equipe Técnica de Microbiologia - Instituto Lauro de Souza Lima

Terceiro Titular: Rafael Mielli Rodrigues

Divisão de Pesquisa e Ensino - Seção de Biblioteca - Instituto Lauro de Souza Lima

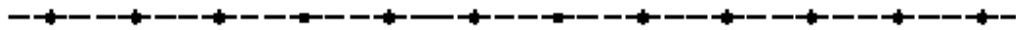
Data da Defesa: 25/02/2010

TÉCNICAS LABORATORIAIS PADRONIZADAS POR
MILCA RIBEIRO SARUHASHI, NO LABORATÓRIO DE
BIOLOGIA DA EQUIPE TÉCNICA DE BIOLOGIA, DO
INSTITUTO LAURO DE SOUZA LIMA, BAURU-SP

ORIENTADORA: Dr^a. FÁTIMA REGINA VILANI MORENO

PROGRAMA DE APRIMORAMENTO PROFISSIONAL EM
ANÁLISES CLÍNICAS, ÁREA DE IMUNOLOGIA, REALIZADO NO
INSTITUTO LAURO DE SOUZA E PATROCINADO PELA
FUNDAP.

Agradecimentos



Primeiramente agradeço a Deus por me ter dado a oportunidade de participar do Programa de Aprimoramento Profissional no Instituto Lauro de Souza Lima, onde encontrei pessoas que me deram apoio, transmitiram conhecimentos, me ensinaram tantos assuntos que acrescentaram na minha vida profissional como na minha vida pessoal. Agradeço pela força, sabedoria, sustento que somente Ele é capaz de dar.

Agradeço a minha Orientadora Fátima Regina Vilani Moreno, por ter acreditado no meu potencial, me incentivado e assistido na realização deste trabalho.

À Silvia Cristina Barbosa Pedrini pela colaboração, ajuda tanto no desenvolver como no apoio, incentivo e conversas.

Aos meus amigos companheiros de aprimoramento, Fernanda Castro Jobim Vilalva e Rodrigo Cazola Mioni, pelo companheirismo, amizade, experiências vividas e trocadas, alegrias e tristezas, momentos de festas e de dificuldades que enfrentamos juntos.

Aos meus pais, Lidia Carolina e Morimitsu, agradeço o apoio, exemplo, dedicação, amor, incentivo, compreensão, possibilitando chegar onde estou, fazendo dessa vitória ser nossa e não somente minha. E também agradeço aos meus irmãos, Tiago e Felipe, pelo carinho, estímulo e atenção.

Ao meu amado marido, Fabio, pelo amor, afeto, carinho, paciência. Obrigada por fazer parte da minha conquista e da minha vida, por me acompanhar tanto nos bons como nos maus momentos.

Ao Rafael Mielli Rodrigues, pela elaboração da ficha catalográfica, revisão das referências bibliográficas e orientação na formatação do texto.

Agradeço também aos funcionários dos laboratórios onde passei: Imunologia, Micologia, Imunogenética, Microbiologia, Análises Clínicas, e ao pessoal do biotério, que direta ou indiretamente me auxiliaram na realização deste trabalho, através de ajuda, palavras amigas, conselhos e compreensão.

Resumo



Saruhashi, MR. Quantificação dos metabólitos do oxigênio e do nitrogênio para avaliação do estado funcional de macrófagos: implantação das técnicas no laboratório de biologia do Instituto Lauro de Souza Lima. [monografia]. Bauru:ILSL; 2010.

Os macrófagos (MØ) são células que pertencem ao Sistema Mononuclear Fagocitário e participam de uma ampla variedade de processos fisiológicos e patológicos. A interação de moléculas específicas com receptores na superfície do MØ pode induzir um aumento no metabolismo basal da célula, a chamada *explosão respiratória*, caracterizada por uma maior atividade da via glicolítica e da via hexose monofosfato, acompanhada por um aumento no consumo de oxigênio. Por ação da oxidase de membrana, há redução do oxigênio molecular para ânion superóxido (O_2^-), o qual é rapidamente convertido para peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila com potente atividade oxidativa microbicida, tanto no fagossoma quanto no meio extracelular. Há também mecanismos de defesa dependentes do nitrogênio, a via de produção de óxido nítrico (NO), constituindo-se em um mecanismo primário de defesa contra microrganismos intracelulares e agentes muito grandes para serem fagocitados. Para a implantação das técnicas de avaliação do estado funcional dos MØ - liberação de H_2O_2 , O_2^- e NO - foram utilizados MØ peritoneais de camundongos saudáveis das linhagens *nude* e Swiss, bem como camundongos *nude* inoculados, intraperitonealmente, com *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*). Esses camundongos foram inoculados com $3,3 \times 10^4$ bacilos e sacrificados 11 meses após inoculação. Os resultados da liberação de H_2O_2 por MØ de camundongos inoculados e saudáveis, demonstraram maior produção desse metabólito nos animais inoculados com o bacilo. Com relação à produção de O_2^- , não houve diferença entre camundongos *nude* e suíços saudáveis; do mesmo modo, a produção de H_2O_2 foi semelhante nessas duas linhagens de camundongos. Com relação ao NO, os resultados revelaram maior produção nos camundongos inoculados com o bacilo em comparação aos animais saudáveis, a semelhança do que foi observado com a H_2O_2 . Esses resultados sugerem que a via intraperitoneal de inoculação do *M. leprae* parece estimular a produção desses metabólitos. Tomados em conjunto, os resultados revelam que as técnicas para dosagem dos metabólitos do oxigênio e nitrogênio foram implantadas no laboratório, conforme o objetivo inicial, e poderão ser utilizadas em estudos futuros visando avaliar o estado funcional de MØ.

Palavras-chave: Macrófagos, Peróxido de Hidrogênio, Superóxido, Óxido Nítrico.

Abstract



Sumário



SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Características Morfo-fisiológicas dos Macrófagos	16
1.1.1. Receptores de Superfície	16
1.1.2. Aspectos Funcionais	17
1.1.3. Produtos de Secreção	18
1.1.4. Funções do Macrófago na Resposta Imune	22
2. OBJETIVO	25
3. MATERIAL e MÉTODOS	27
3.1. Animais	27
3.2. Grupos Experimentais	27
3.3. Sacrifício	27
3.4. Isolamento dos Macrófagos Peritoneais	27
3.5. Cultura de Macrófagos Peritoneais	28
4. TÉCNICA PARA QUANTIFICAÇÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H₂O₂)	29
4.1. Preparo dos Reagentes	29
4.2. Materiais Necessários	31
4.3. Procedimentos	31
5. TÉCNICA PARA QUANTIFICAÇÃO DO ÂNION SUPERÓXIDO (O₂⁻)	32
5.1. Preparo dos Reagentes	32
5.2. Materiais Necessários	33
5.3. Procedimentos	33
6. TÉCNICA PARA DOSAGEM DO ÓXIDO NÍTRICO (NO)	34
6.1. Preparo dos Reagentes	34
6.2. Materiais Necessários	35
6.3. Procedimentos	35

7. RESULTADOS	37
8. DISCUSSÃO	50
9. CONCLUSÕES	58
10. REFERÊNCIAS	60

Introdução



1. INTRODUÇÃO

Os macrófagos (MØ) são células que pertencem ao Sistema Mononuclear Fagocitário (SMF) e participam de uma ampla variedade de processos fisiológicos e patológicos. Estas células originam-se na medula óssea a partir de uma célula progenitora, a unidade formadora de colônia granulócito-macrófago (CFU-GM). O monoblasto, formado a partir da CFU-GM, é a célula mais imatura do SMF e, no processo de divisão celular, originará dois promonócitos. O promonócito, mais diferenciado que o monoblasto, formará monócitos, os quais alcançam a corrente sanguínea onde permanecem por 48 horas antes de se dirigirem aos tecidos. Representantes celulares do SMF são encontrados em vários tecidos, órgãos e cavidades serosas.⁽¹⁻³⁾

Embora a maior parte dos MØ se origine da migração dos monócitos do sangue, uma pequena proporção (menos de 5%) pode se multiplicar localmente.⁽¹⁾ O processo de diferenciação dos MØ nos tecidos parece ser influenciado diretamente pelo microambiente tecidual havendo a formação de populações de MØ diferentes quanto à morfologia e função.⁽⁴⁾ Na transformação do monócito em MØ ocorre um aumento no número de mitocôndrias, na atividade de enzimas mitocondriais e na respiração celular; com a maturação do MØ há um aumento na oxidação da glicose e na produção de lactato, além de um aumento no número de lisossomos e na concentração de enzimas lisossomais.⁽²⁾

A interação de moléculas específicas com receptores na superfície do MØ pode induzir um aumento no metabolismo basal da célula, a chamada *explosão respiratória*, caracterizada por uma maior atividade da via glicolítica e da via hexose monofosfato, acompanhada por um aumento no consumo de oxigênio.⁽²⁾ Por ação da oxidase de membrana, há redução do oxigênio molecular para anion superóxido, o qual é rapidamente convertido para peróxido de hidrogênio e radical hidroxila com potente atividade oxidativa microbicida, tanto no fagossoma quanto no meio extracelular.^(2,5)

A magnitude da *explosão respiratória* tende a se reduzir significativamente no processo de diferenciação monócito-MØ. Portanto MØ residentes apresentam reduzida capacidade de *explosão respiratória*, a qual pode ser aumentada em várias vezes quando os MØ são ativados.⁽⁶⁾

1.1. Características Morfo-fisiológicas dos Macrófagos

Entre as principais funções exercidas pelos MØ estão a endocitose de partículas, a síntese de moléculas importantes para as respostas inflamatória e imune e o processamento e apresentação antigênica para os linfócitos T.

1.1.1. Receptores de Superfície

Os MØ possuem vários receptores de superfície que determinam o controle de atividades como o crescimento, diferenciação, ativação, reconhecimento, endocitose, migração e secreção celular.

- *Receptores para a Fração Fc da Imunoglobulina e para o Complemento:* o processo da fagocitose requer a interação direta entre ligantes presentes sobre a partícula e receptores do fagócito. A ligação do complexo imunoglobulina-partícula com receptores sobre a superfície do MØ pode desencadear funções como a endocitose, a geração de sinais transmembrana - com reorganização do citoesqueleto no local do contato, facilitando a fagocitose - e a secreção de potentes mediadores.⁽⁷⁾

Os MØ possuem receptores para a fração Fc da IgG (IgG1 e IgG3), bem como para os componentes C3b e C4b do sistema complemento e, desta forma, partículas revestidas por essas moléculas passam a ser rapidamente internalizadas⁽⁷⁾. Ao contrário dos receptores para Fc, a fagocitose via complemento parece não induzir a liberação de metabólitos do oxigênio ou do ácido aracônico por MØ.⁽⁸⁾ Receptores específicos para manose/fucose e lectinas podem também permitir a fagocitose de partículas não opsonizadas.⁽⁷⁾

- *Receptores para Citocinas:* os MØ possuem receptores para um grande número de citocinas, sendo que a maioria desses receptores está expressa em baixa densidade; entretanto, o número pode aumentar quando a célula é ativada.⁽³⁾

As citocinas interagem com seus receptores específicos modulando a função macrofágica. Deste modo, citocinas como o interferon gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-2 (IL-2), fator estimulador de colônia de monócito (M-CSF) e fator estimulador de colônia de monócito/granulócito (GM-CSF) são importantes no processo de ativação macrofágica, enquanto que outras, como a IL-10 e o fator transformador de crescimento beta (TGF- β) são consideradas fatores de desativação do MØ.^(9, 10)

1.1.2. Aspectos Funcionais

- *Quimiotaxia*: os estímulos quimiotáticos desempenham importante papel na resposta dos fagócitos aos microrganismos. A ligação de um fator quimiotático a receptores específicos expressos sobre a superfície do MØ ativa vias de transdução relacionadas com a ativação celular, induzindo a adesão da célula ao endotélio vascular, alteração de seu tamanho com o rearranjo do citoesqueleto e movimentação através do tecido até o foco inflamatório.⁽⁶⁾

- *Endocitose*: é a capacidade que os monócitos-MØ apresentam de ingerir materiais solúveis ou particulados. Dá-se o nome de *pinocitose* à ingestão de materiais menores que 0,5 µm e *fagocitose* ao englobamento de materiais maiores que 0,5 µm.⁽⁷⁾

A fagocitose inicia-se com a aderência da partícula a ser fagocitada à membrana celular do fagócito, acompanhada da emissão de pseudópodos que terminam por envolver toda a partícula que é posteriormente interiorizada. Forma-se o fagossoma, contendo um envoltório de constituição semelhante à própria membrana celular. Os lisossomos deslocam-se em direção ao fagossoma e, após a fusão desses, forma-se o fagolisossoma. As enzimas digestivas dos lisossomos participam da digestão intracelular da partícula. A partir da interação da partícula com a membrana celular do fagócito formam-se substâncias tóxicas que participam dos mecanismos microbicidas destas células.^(2, 3)

O fenômeno da fagocitose pode ser facilitado por determinadas moléculas denominadas opsoninas. Partículas revestidas por anticorpos ou por certos produtos da ativação do sistema complemento aderem à membrana do fagócito e são interiorizadas mais rápida e intensamente do que partículas não opsonizadas. Conforme citado anteriormente, os MØ possuem receptores para a fração Fc da IgG e para componentes do complemento, de modo que, partículas opsonizadas por moléculas de anticorpos ou complemento passam a ser internalizadas rapidamente.^(2, 7)

Muitos microrganismos são capazes de ativar a cascata do complemento gerando frações com capacidade opsonica.^(2, 7) Também o MØ é capaz de produzir complemento. A aderência pode ainda ocorrer sem opsonização, desde que a partícula possua em sua superfície determinantes que possam ser reconhecidos pelo MØ.^(7, 11)

1.1.3. Produtos de Secreção

Os MØ produzem e secretam várias substâncias biologicamente importantes para as respostas inflamatória e imune, como citocinas, enzimas, metabólitos do ácido aracdônico, componentes do sistema complemento, reativos intermediários do oxigênio e do nitrogênio.

Com relação às citocinas, os MØ produzem IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- α , entre outras. A IL-1 atua sobre os linfócitos T levando à produção de citocinas, especialmente a IL-2, bem como aumentando a expressão de receptores para IL-2. A IL-6 tem ações muito semelhantes a IL-1, porém atua sobre os linfócitos B promovendo sua diferenciação terminal em células secretoras de anticorpos. A IL-12 é um dos mais potentes fatores de crescimento de linfócitos T e parece conduzir esses linfócitos em direção ao padrão de citocinas tipo Th1 durante a apresentação antigênica. O TNF- α apresenta atividades biológicas diversificadas, isto é, induz a produção de citocinas e a expressão de receptores para IL-2 pelos linfócitos T, aumenta a produção de anticorpos e promove a proliferação dos linfócitos B, atua como quimiotático para monócitos-MØ e induz a produção de IL-1, IL-6 e IL-8 pelos MØ.^(9, 10, 12)

Particularmente quanto aos reativos do oxigênio e do nitrogênio, são sistemas bioquímicos antimicrobianos dos fagócitos mononucleares de vital importância na defesa do organismo contra as infecções e este assunto será discorrido com mais detalhes por ser objeto deste estudo.

- *Atividade Microbicida*: a capacidade microbicida dos MØ é variável dependendo da subpopulação considerada e pode ser exercida por meio de mecanismos dependentes do oxigênio, independentes do oxigênio e dependentes do nitrogênio.

a. *Mecanismos Microbicidas Dependentes do Oxigênio (Oxidativos)*: os MØ produzem ânion superóxido (O_2^-) quando estimulados por elementos particulados ou solúveis.⁽¹³⁾ A partir do O_2^- são formados outros produtos com ação microbicida; esses reativos intermediários do oxigênio (ROI - reactive oxygen intermediates) podem ser gerados por mecanismos dependentes ou independentes da mieloperoxidase.⁽²⁾

a.1 *Mecanismos Independentes da Mieloperoxidase*: os MØ, ao contrário dos neutrófilos e dos monócitos, contém níveis muito baixos de mieloperoxidase e portanto, utilizam principalmente as vias metabólicas que não dependem desta enzima.⁽¹⁴⁾ Neste sistema, são formados o O_2^- e o peróxido de hidrogênio ou água oxigenada (H_2O_2), que podem ser convertidos gerando o radical hidroxila (OH^\cdot) e o oxigênio molecular (O_2). Na formação de OH^\cdot há participação do ferro como agente catalisador.⁽²⁾ Os ROI são tóxicos para os microrganismos e reagem com a maioria das moléculas orgânicas como DNA, proteínas e lipídeos, alterando-as.⁽²⁾

a.2 *Mecanismos Dependentes da Mieloperoxidase*: estes mecanismos são utilizados por monócitos e neutrófilos para gerar os ROI. Neste sistema o O_2^- é dismutado para formar o H_2O_2 ; a mieloperoxidase catalisa então a oxidação do cloreto para ânion hipoclorito (OCl^-) gerando O_2 .⁽²⁾ O iodeto ou brometo pode substituir o cloreto nestas reações, entretanto o

cloreto é predominantemente utilizado em razão de sua maior disponibilidade no interior do fagolisossoma.

O hipoclorito é provavelmente um dos mais potentes agentes bactericidas devido a sua capacidade de oxidação, especialmente por sua habilidade para oxidar aminas para cloraminas. Entretanto, apesar do seu potencial bactericida, este metabólito não parece desenvolver um papel de relevância na defesa contra infecções, uma vez que pacientes com deficiência de mieloperoxidase não apresentam risco aumentado para desenvolver infecções graves.⁽¹⁵⁾

b. Mecanismos Independentes do Oxigênio (não oxidativos): várias enzimas participam dos mecanismos não oxidativos dos MØ: lisozima, lactoferrina, hidrolases ácidas, RNase, DNase, collagenase, fosfolipase, entre outras, cuja função principal parece ser a digestão da partícula fagocitada.⁽²⁾

c. Mecanismos Microbicidas Dependentes do Nitrogênio (RNI - reactive nitrogen intermediates): a via de produção de óxido nítrico (NO) a partir da L-arginina foi identificada como um novo sistema antimicrobiano do MØ.⁽¹⁶⁾ Estudos têm sugerido que o NO tem ação antimicrobiana contra fungos⁽¹⁷⁾, bactérias⁽¹⁸⁾, protozoários^(19, 20) e células tumorais⁽²¹⁾, constituindo-se, assim, em um mecanismo primário de defesa contra microrganismos intracelulares e agentes muito grandes para serem fagocitados.

A reação bioquímica envolvida na produção do NO é catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), a qual se apresenta sob dois tipos: *constitutiva* e *induzida*. A forma *constitutiva* é citosólica, dependente de Ca^{2+} /calmodulina para sua liberação e tem atividade de curta duração; o NO produzido atua na transdução de sinais em várias respostas fisiológicas.⁽²²⁾ A forma *induzida* (iNOS – óxido nítrico sintase induzível) é independente de Ca^{2+} e mantém uma ativação prolongada após sua expressão. É expressa por células inflamatórias por meio de diversos estímulos, dentre eles os lipopolissacarídeos, fragmentos antigênicos de micobactérias, fungos e protozoários, e por citocinas inflamatórias como IL-1, TNF- α e IFN- γ .⁽²²⁾

A síntese de NO tem sido observada em macrófagos e células gigantes multinucleadas, bem como em outras células, como fibroblastos, células epiteliais e endoteliais⁽²³⁾, células de Langerhans⁽²⁴⁾, eosinófilos⁽²⁵⁾, neutrófilos⁽²⁶⁾, linfócitos T CD4⁺⁽²⁷⁾, osteoclastos e osteoblastos⁽²⁸⁾, podendo ter vários efeitos dependendo do tipo de células que o produz, do sítio de liberação e da concentração produzida.⁽²²⁾

O NO é um gás altamente reativo que possui vida média de 6 a 30 segundos devido a sua rápida oxidação e conseqüente geração de nitritos (NO⁻²) e nitratos (NO⁻³).⁽²⁹⁾ A

reatividade do NO, da mesma forma que o oxigênio, está relacionada com suas propriedades redox; NO e O₂⁻ reagem para formar peroxinitrito (ONOO⁻), molécula altamente oxidante, potencialmente mais tóxica que o próprio NO.⁽³⁰⁾ Os alvos moleculares do NO na célula-alvo são enzimas contendo ferro ou cobre, as quais participam do metabolismo respiratório e da síntese de DNA.⁽³¹⁾

O TGF-β é considerado inibidor da via da NO sintase por sua ação estimuladora de uma outra via de utilização da L-arginina – a via da arginase. Portanto o TGF-β pode suprimir a ação citotóxica de MØ ativados contra células tumorais.⁽³²⁾

A atividade microbicida dos MØ pode ser aumentada por determinadas citocinas, como o IFN-γ e os fatores estimuladores de colônia. O IFN-γ aumenta grandemente a capacidade de geração da *explosão respiratória* por MØ, sendo que a estimulação do metabolismo oxidativo promove maior atividade microbicida contra uma grande variedade de patógenos intracelulares.⁽³³⁾ Além disso, o IFN-γ também estimula a expressão da enzima iNOS, essencial para a formação do NO.^(16, 22) Os fatores estimuladores de colônia, como o M-CSF e o GM-CSF estimulam a capacidade fagocítica e microbicida dos MØ e, também, a liberação de vários mediadores da inflamação, como o O₂⁻, prostaglandina E e ácido aracônico, além de citocinas como a IL-1, IFN-γ e TNF-α.⁽¹²⁾

1.1.4. Funções do Macrófago na Resposta Imune

O MØ participa da resposta imune através de duas grandes vias: aferente e eferente. Em seu papel aferente o MØ atua como uma célula apresentadora de antígeno (antigen-presenting cell- APC) ao linfócito T.

Resumidamente: a APC endocita o patógeno que é processado nos vacúolos endocíticos, no citoplasma, pela ação das enzimas proteolíticas, gerando peptídeos imunogênicos. Em algum ponto do seu trajeto, vesículas contendo moléculas de classe II do MHC (Complexo de Histocompatibilidade Principal) se fundem aos endossomas e se ligam aos peptídeos imunogênicos, transportando-os para a superfície da célula, onde se tornam acessíveis aos linfócitos T CD4⁺ específicos para aquela combinação particular de epítipo-moléculas de classe II. A ligação do receptor do linfócito T CD4⁺ a esse complexo, juntamente com a liberação de IL-1 pela APC, ativam os linfócitos T CD4⁺. Essas células ativadas passam a expressar receptores para IL-2 e a produzirem IL-2, o que estimula o crescimento dos linfócitos T e a produção de outras citocinas importantes na ativação de outros tipos celulares.^(34, 35)

Dentre as citocinas liberadas pelos linfócitos T CD4⁺ encontra-se o IFN- γ , uma citocina chave na ativação macrofágica.⁽³³⁾ Os MØ ativados exercem importante papel na resistência do hospedeiro a patógenos intracelulares obrigatórios e facultativos, uma vez que esses patógenos podem sobreviver e se multiplicar em MØ não ativados.⁽³⁶⁾ Assim, o MØ ativado participa da resposta imune através da via eferente.

Os MØ ativados apresentam alterações funcionais e morfológicas, como: aumento de aderência e espreadimento sobre o vidro, modificações bioquímicas e enzimáticas, liberação aumentada dos ROI e dos RNI e potencialização das funções fagocíticas, microbicidas e citotóxicas.^(16, 33, 37)

Considerando que a quantificação dos metabólitos do oxigênio e do nitrogênio pode ser empregada como parâmetro de avaliação do estado funcional de MØ e, conseqüentemente, da resposta imune celular, e que a utilização dessas técnicas será de grande valor na avaliação da imunidade celular de pacientes com hanseníase e doença de Jorge Lobo (assunto que será objeto de estudos futuros), este trabalho foi realizado com o objetivo de implantar essas técnicas no laboratório de biologia do Instituto Lauro de Souza Lima. Para tanto, foram utilizados MØ peritoneais de camundongos saudáveis das linhagens *nude* e Swiss, bem como camundongos *nude* inoculados, intraperitonealmente, com *Mycobacterium leprae* (*M. leprae*).

O camundongo *nude* foi descrito pela primeira vez por Flanagan⁽³⁸⁾, em 1966, e, em 1968, Pantelouris⁽³⁹⁾ verificou que esses animais eram congenitamente atímicos. Esses camundongos não sobrevivem por tempo superior a 6 meses em biotérios convencionais, entretanto, em biotérios SPF (livre de patógenos específicos) podem sobreviver por mais de 2 anos. O camundongo *nude* foi introduzido na hanseníase experimental por Prabhakaran et al.⁽⁴⁰⁾, que inocularam *M. leprae* no coxim plantar de camundongos normais e atímicos e não observaram diferenças significantes no processo infeccioso entre os animais, durante os 6 meses pós-inoculação. Posteriormente, Colston & Kohsaka⁽⁴¹⁾, ao reproduzirem o experimento, observaram disseminação do bacilo nos camundongos *nude* após 8 meses de inoculação. Em outro estudo, foi demonstrado multiplicação bacilar (10^{10}) no coxim plantar desses animais 12 meses pós-inoculação e disseminação para fígado e baço após 18 meses.⁽⁴²⁾ Sendo assim, o camundongo *nude* tem sido largamente empregado no estudo da hanseníase experimental e neste trabalho este camundongo foi utilizado, juntamente com os camundongos suíços, na padronização das técnicas dos ROI e RNI em nosso laboratório.

Objetivo



2. OBJETIVO

Este estudo teve por objetivo implantar as seguintes técnicas para avaliação do estado funcional de macrófagos, no Laboratório de Biologia da Equipe Técnica de Biologia, do Instituto Lauro de Souza Lima:

- liberação de H_2O_2 ,
- quantificação de O_2^- ,
- dosagem de NO.

Material e Métodos



3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais: foram utilizados 34 camundongos, sendo 15 da linhagem Swiss e 19 da linhagem *nude* (com “background” genético Swiss), com 6 a 8 semanas de idade provenientes do Biotério do Instituto Lauro de Souza Lima, de Bauru-SP. Os camundongos foram mantidos em ambiente estéril composto por microisoladores em rack ventilada e receberam ração balanceada suplementada com complexo vitamínico e água esterilizadas *ad libitum*.

3.2. Grupos Experimentais: foram constituídos por 15 camundongos suíços sadios (G1), 15 camundongos *nude* sadios (G2) e 04 camundongos *nude* inoculados intraperitonealmente com 100 µl de uma suspensão de *M. leprae*, proveniente de biópsia de paciente com hanseníase virchoviana, não tratado, contendo 3.3×10^5 bacilos/ml (G3).

3.3. Sacrifício: os animais foram sacrificados em câmara de CO₂, conforme os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Os animais *nude* inoculados com *M. leprae* foram sacrificados 11 meses após a inoculação.

3.4. Isolamento dos Macrófagos Peritoneais: todos os procedimentos descritos a seguir foram realizados em condições assépticas; para tanto, os materiais e reagentes utilizados foram previamente esterilizados e todos os passos foram realizados em câmara de fluxo laminar, previamente submetida à irradiação com luz ultravioleta por 30 min. Os animais foram colocados no interior da câmara de fluxo laminar e fixados em decúbito dorsal em suporte de dissecação. A parede abdominal foi exposta, rebatendo-se a pele da região e, em seguida, a cavidade abdominal foi lavada com 8 a 10 ml de NaCl 0,9% gelado, injetados na porção mediana superior do abdome. A cavidade foi massageada e o líquido peritoneal foi obtido com seringa hipodérmica de 10 ml com agulha 25 x 7 mm. O lavado peritoneal (LP) foi colocado em tubos de vidros estéreis e mantidos em banho de gelo, este procedimento foi repetido mais 2 vezes. O LP foi centrifugado a 1500 rpm por 10 min e as células ressuspensas em 1 ml de meio RPMI contendo L-glutamina e 25 mM de tampão HEPES adicionado de soro fetal bovino a 10% e penicilina (100 UI/ml)-estreptomicina (100 µg/ml) (meio completo). A contagem do número de MØ foi realizada em câmara de

Neubauer mediante diluição 1:8 da suspensão de células com corante vermelho neutro a 0,02% em solução salina, mantida por 20 min a 37°C. A concentração final da suspensão foi ajustada para 1×10^6 MØ/ml, sendo necessário muitas vezes, fazer o *pool* de 2 a 3 suspensões celulares para obter a concentração desejada.

3.5. Cultura de Macrófagos Peritoneais: 100 µl da suspensão celular foram distribuídos em placas de cultura de tecido, de fundo plano e com tampa, contendo 96 orifícios. A placa foi incubada a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂, por 2 horas, para aderência dos MØ. As células não aderentes foram removidas mediante lavagem dos orifícios com meio RPMI. Em seguida, foram adicionados 100 µl de meio completo em cada orifício na presença ou não de 10 µg/ml de LPS (lipopolissacáride da *E. coli*) e 10 µg/ml de antígeno inteiro (AgI) do *M. leprae* (o antígeno foi cedido pelo Dr. P. Brennan, do Dept. of Microbiology, Immunology and Pathology, Colorado State University, USA). As culturas que não receberam nenhum estímulo foram denominadas culturas controle (CC) e foram realizadas para avaliar a produção espontânea dos ROI e RNI. A placa foi incubada a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂, durante 24 horas. Após este período, os sobrenadantes foram coletados, centrifugados a 1500 rpm por 10 minutos e utilizados para dosagem de óxido nítrico. Os MØ aderidos e cultivados por 24 h foram empregados para a determinação dos ROI.

4 TÉCNICA PARA QUANTIFICAÇÃO DO PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO (H₂O₂)

4.1. Preparo dos Reagentes:

Solução A:

80 g NaCl

2 g KCl

2 g KH₂PO₄

11,5 g Na₂HPO₄

Água destilada qsp 800 ml

Acertar o pH 7,0 e manter em frasco escuro, na geladeira (4°C).

Solução B:

1 g CaCl_2

100 ml de água destilada

Conservar em frasco escuro, na geladeira (4°C).

Solução C:

1 g MgCl_2

100 ml de água destilada

Conservar em frasco escuro, na geladeira (4°C).

Vermelho de fenol:

0,1 g vermelho de fenol

10 ml de água destilada

Conservar em frasco escuro, na geladeira (4°C).

Tampão fosfato (pH 7,0):

Solução 1

150 ml água destilada

2,61 g K_2HPO_4

Solução 2

150 ml água destilada

2,06 g KH_2PO_4

Em 100 ml da Solução 1 acrescentar a Solução 2 até atingir pH 7,0.

Peroxidase 5mg/ml:

10 mg peroxidase

2 ml tampão fosfato

Aliquotar 100 μl em eppendorfs e conservar em freezer (-20°C).

Dextrose:

1 g dextrose

100 ml água destilada

Conservar em frasco escuro, na geladeira (4°C).

4.3. Procedimentos:

- A liberação de H_2O_2 foi determinada de acordo com técnica descrita por Pick & Miesel⁽⁴³⁾.

- Após o período de 24 h do cultivo dos MØ e remoção dos sobrenadantes, as células aderentes foram ressuspensas no volume original (100 μ l) em solução de vermelho de fenol contendo: 140 mM de NaCl; 10 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,0; 5,5 mM de dextrose; 0,56 mM de vermelho de fenol e 0,01 mg/ml de peroxidase de raiz forte tipo II. As células foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida por 60 min, na presença ou não de 10 μ l de forbol miristato acetato (PMA). Após incubação, a reação foi interrompida pela adição de 10 μ l de NaOH 1 N e a absorbância foi determinada em microleitor automático de ELISA com filtro de 620 nm, contra branco constituído de solução de vermelho de fenol e NaOH 1 N. Os resultados foram expressos em nanomoles (nM) de H_2O_2 /1 x 10⁵ células, a partir de curva padrão estabelecida em cada ensaio, constituída com concentrações molares conhecidas de H_2O_2 em tampão vermelho fenol, variando de 0,5 a 2,0 nM.

5. TÉCNICA PARA QUANTIFICAÇÃO DO ÂNION SUPERÓXIDO(O₂⁻)

5.1. Preparo dos Reagentes:

Solução salina de Hank's sem vermelho de fenol

Citocromo C:

Diluir o conteúdo do frasco em 12,6 ml de solução salina de Hank's sem vermelho de fenol.

Aliquotar 100 μ l em eppendorfs e conservar em freezer (-20°C).

PMA:

1 mg PMA

1 ml DMSO

Aliquotar 1 μ l/eppendorf e diluir em 100 μ l de solução salina de Hank's sem vermelho de fenol.

Preparar 15 minutos antes de usar.

5.2. Materiais Necessários:

- Suporte para tubos
- Tubos de hemólise
- Pipetas automáticas
- Ponteiras
- Placa em U de 96 orifícios
- Microleitor automático de ELISA

5.3. Procedimentos:

- A dosagem do O_2^- foi determinada utilizando-se o cromógeno ferricitocromo C, segundo método de Pick & Misel⁽⁴³⁾, adaptado por Russo et al.⁽⁴⁴⁾

.Após o período de cultivo das células e remoção do sobrenadante, foi adicionado em cada orifício da placa 100 μ l de solução contendo 160 μ M de citocromo C em solução salina de Hank's livre de vermelho de fenol. As células foram incubadas a 37°C em atmosfera com 5% de CO_2 por 15 min, na presença ou não de 10 μ l de PMA. A leitura foi realizada em microleitor de ELISA com filtro de 540 nm, contra branco constituído de solução de Hank's sem vermelho de fenol. A concentração do O_2^- foi expressa em nanomol (nM) e calculada por meio da seguinte relação:

$$\frac{DO \times 100}{6,3}$$

6. TÉCNICA PARA QUANTIFICAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO (NO)

6.1. Preparo dos Reagentes:

Ácido Fosfórico (H_3PO_4 5%):

2,5 ml de H_3PO_4

47,5 ml de H_2O destilada

Manter em frasco escuro, na geladeira (4°C)

NEED 0,1% (N-Naphtyl-Etilenodiamina) (Solução A):

0,05g NEED

50 ml H₂O destilada

Preparar no momento do uso.

Sulfanilamida 1% em H₃PO₄ (Solução B):

0,5g sulfanilamida

50 ml H₃PO₄

Preparar no momento do uso.

Reagente de Greiss:

Misturar a Solução A e B (1:1). Deixar reagindo 15 minutos antes de usar. Preparar no momento do uso.

Reagente para curva:

0,140g de NaNO₂ (Nitrito de Sódio)

10 ml de H₂O destilada

Solução estoque, na concentração de 200 mM. Manter a 4°C (geladeira) por até 2 semanas.

6.2. Materiais Necessários:

- Suporte para tubos
- Tubos de hemólise
- Pipetas automáticas
- Ponteiras
- Placa em U de 96 orifícios
- Microleitor automático de ELISA

6.3. Procedimentos:

- O NO decompõe-se em nitrito (NO₂⁻) e nitrato (NO₃⁻) e sua detecção é realizada por meio da medida de NO₂⁻ baseada no método colorimétrico da reação de Griess.⁽⁴⁵⁾

Resultados



7. RESULTADOS

A cultura de MØ peritoneais de camundongos suíços saudáveis, estimulados ou não com LPS, está ilustrada na Figura 1. As placas de dosagem do O_2^- e NO foram fotografadas no momento da leitura em microleitor de ELISA e estão representadas nas Figuras 2 e 3.

Figura 1. Cultura de macrófagos peritoneais de camundongos suíços saudáveis após 24 h de incubação a 37°C. **A a D:** cultura controle (sem adição de estímulo). **E a H:** cultura estimulada com LPS. Notar vacúolos no interior dos macrófagos. **B.D.G.H:** Contraste de fase (Microscópio Invertido).

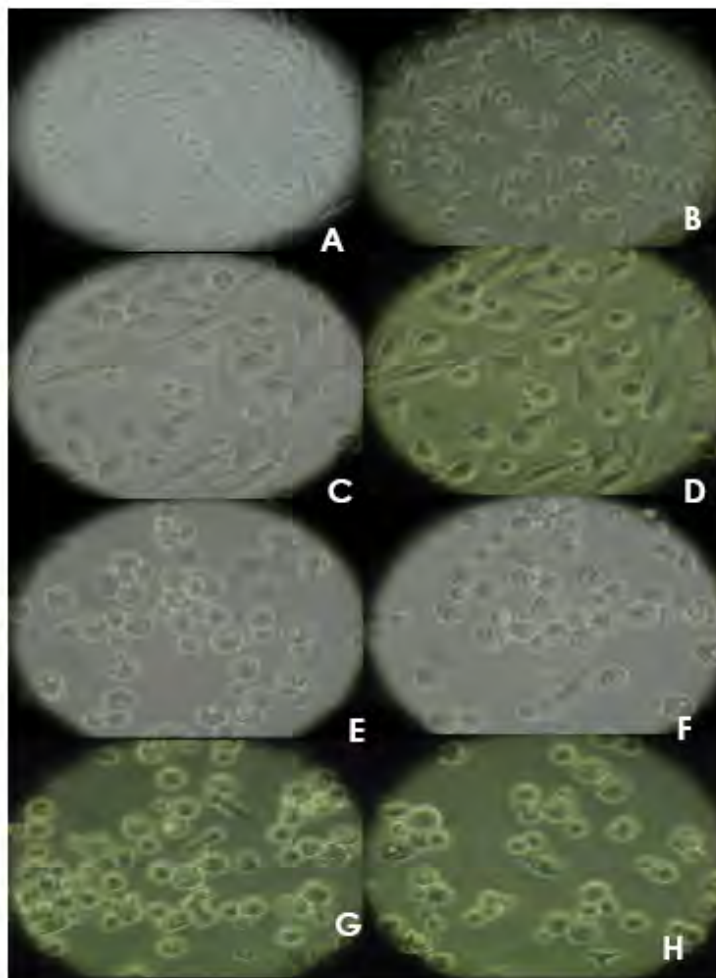


Figura 2. Placa para dosagem de O_2^- , antes da leitura em microleitor de ELISA.

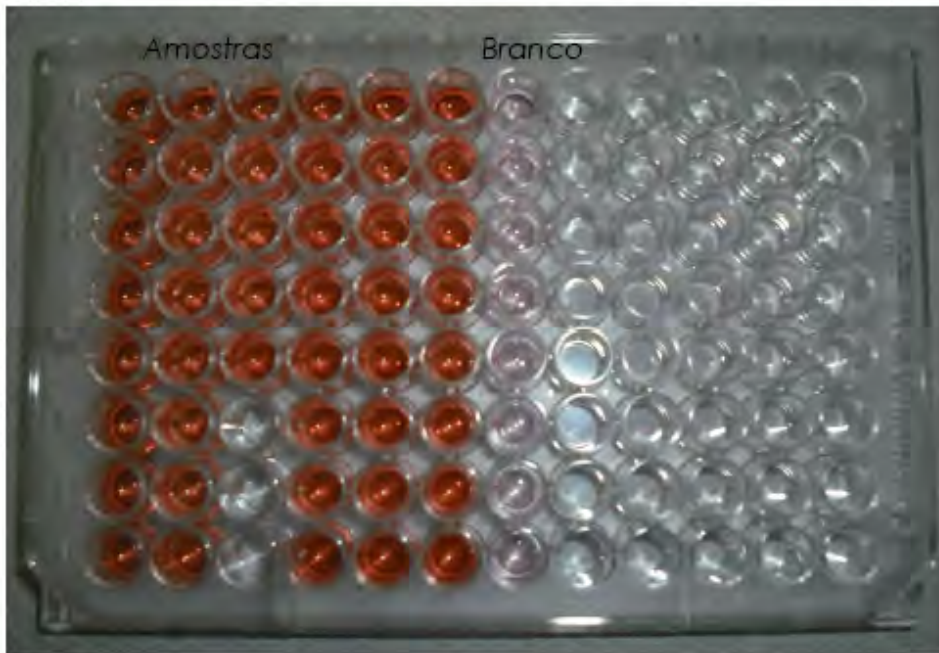
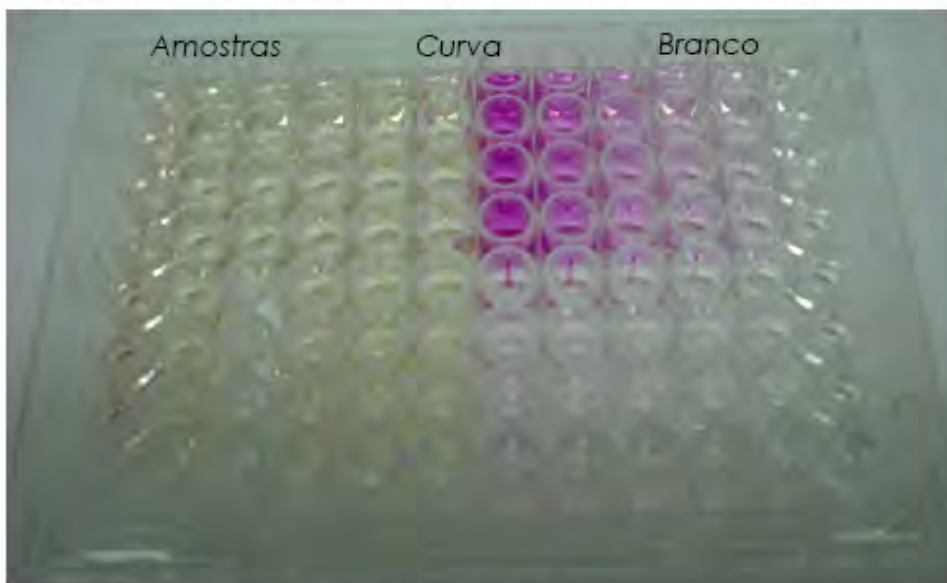


Figura 3. Placa para dosagem de NO, antes da leitura em microleitor de ELISA.



Os resultados da produção de H_2O_2 por MØ peritoneais de camundongos suíços (G1) e *nude* (G2) sadios e de camundongos *nude* inoculados com *M. leprae* (G3) estão ilustrados nas Figuras 4, 5, 6 e 7. Conforme pode ser observado, a liberação de H_2O_2 em culturas estimuladas, simultaneamente com LPS e PMA, foi maior que as culturas sem nenhum estímulo (liberação espontânea). De modo geral, a adição de PMA às culturas estimulou maior produção deste metabólito, entretanto, a adição de AgI do *M. leprae* não estimulou

maior liberação de H_2O_2 , sendo que os resultados revelaram valores menores ou iguais aqueles cujo estímulo foi o LPS associado ao PMA.

A liberação de H_2O_2 foi maior nos camundongos *nude* inoculados com o bacilo (G3) quando comparado aos camundongos sadios (G1 e G2), independentemente da linhagem (Figura 7). Os resultados mostraram, também, que não houve diferença na produção de H_2O_2 entre camundongos sadios (G1 e G2), conforme representado na Tabela 1.

Figura 4. Liberação de H_2O_2 por MØ peritoneais de camundongos suíços (G1). A barra representa a mediana da quantidade de H_2O_2 produzida por 1×10^5 células do lavado peritoneal.

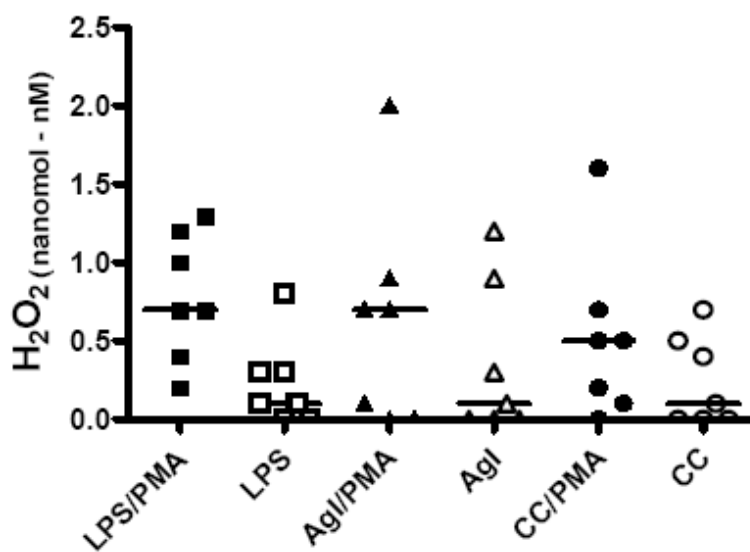


Figura 5. Liberação de H_2O_2 por MØ peritoneais de camundongos *nude* (G2). A barra representa a mediana da quantidade de H_2O_2 produzida por 1×10^5 células do lavado peritoneal.

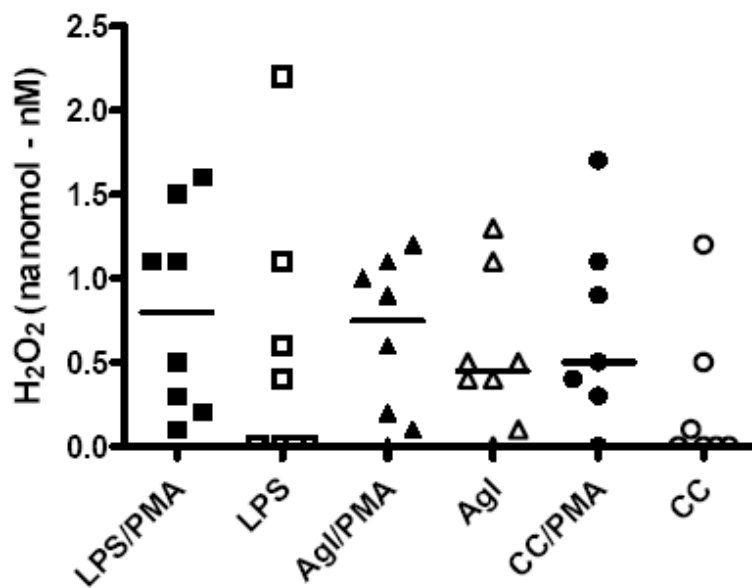


Figura 6. Liberação de H_2O_2 por MØ peritoneais de camundongos *nude* inoculados com *M. leprae*, intraperitonealmente (G3). A barra representa a mediana da quantidade de H_2O_2 produzida por 1×10^5 células do lavado peritoneal

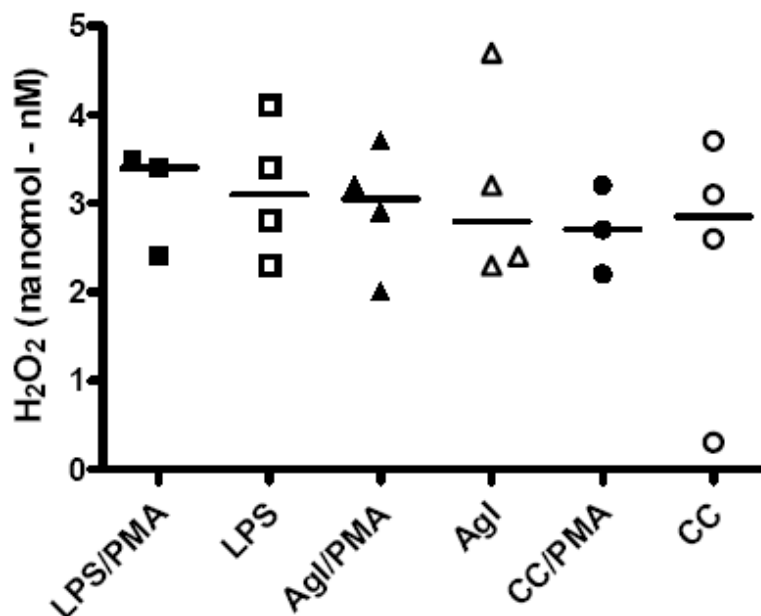


Figura 7. Liberação de H_2O_2 por MØ peritoneais de camundongos suíços e *nude* sadios (G1 e G2) e *nude* inoculados com *M. leprae*, intraperitonealmente (G3). Os resultados estão expressos em mediana da quantidade de H_2O_2 produzida por 1×10^5 células do lavado peritoneal.

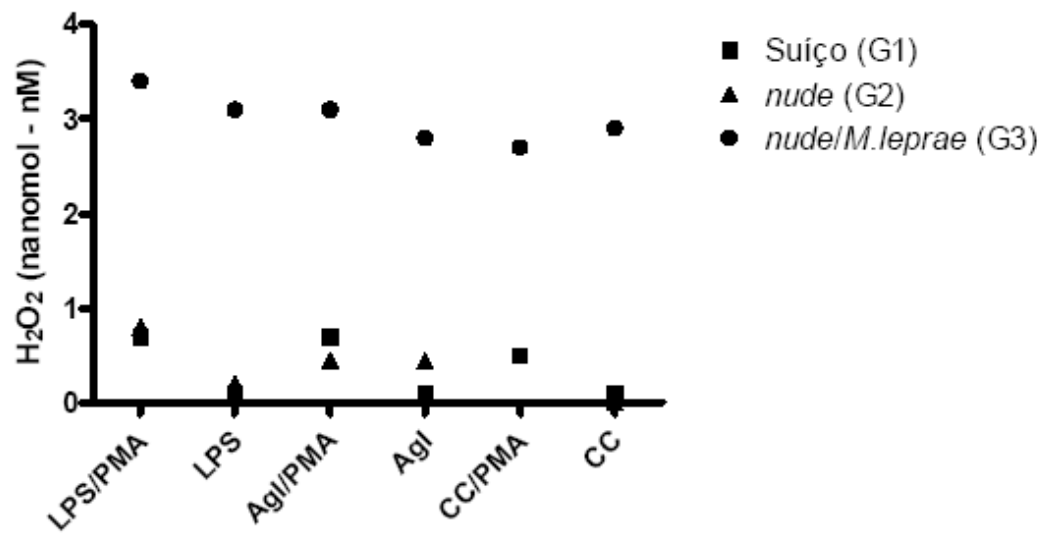


Tabela 1. Quantificação dos metabólitos do oxigênio e do nitrogênio em cultura de macrófagos peritoneais marinhos.

		H_2O_2 (nM)						O_2 (nM)						NO (μ M)		
		LPS/ PMA		Agl/ PMA		CC/ PMA		LPS/ PMA		Agl/ PMA		CC/ PMA		LPS	Agl	CC
		LPS	Agl	LPS	Agl	LPS	Agl	LPS	Agl	LPS	Agl	LPS	Agl	CC	LPS	Agl
Suíço Sadio (G1)	Mediana	0,70	0,10	0,70	0,10	0,50	0,10	3,80	3,80	3,85	3,80	3,80	3,85	1,00	0,40	0,40
	Média	0,79	0,23	0,63	0,36	0,51	0,24	3,75	3,73	3,75	3,78	3,78	3,83	1,25	0,61	0,51
	Desvio padrão	±0,41	±0,28	±0,71	±0,49	±0,54	±0,29	±0,25	±0,24	±0,33	±0,21	±0,29	±0,28	±0,74	±0,40	±0,35
Nude Sadio (G2)	Mediana	0,80	0,20	0,75	0,45	0,50	0,00	3,85	3,60	3,90	3,60	3,80	3,45	2,20	0,70	0,50
	Média	0,80	0,54	0,64	0,54	0,70	0,26	3,95	3,62	4,02	3,62	3,87	3,55	6,28	1,26	0,68
	Desvio padrão	±0,60	±0,78	±0,48	±0,45	±0,57	±0,45	±0,23	±0,17	±0,26	±0,18	±0,28	±0,26	±6,36	±1,43	±0,58
Nude inoculado com <i>M. leprae</i> (G3)	Mediana	3,40	3,10	3,10	2,80	2,70	2,90	NR	NR	NR	NR	NR	NR	37,20	11,50	2,70
	Média	3,10	3,15	2,95	3,15	2,70	2,43	NR	NR	NR	NR	NR	NR	43,80	13,10	7,73
	Desvio padrão	±0,61	±0,78	±0,71	±1,11	±0,50	±1,49	NR	NR	NR	NR	NR	NR	±28,9	±11,8	±10,9

LPS: lipopolissacáride; PMA: forbol miristato acetato; AgI: antígeno inteiro do *M. leprae*; CC: cultura controle (produção espontânea); NR: não realizado.

Quanto à produção de O_2^- , os resultados mostraram que nos camundongos suíços (G1) não houve diferença na liberação deste metabólito quando se adicionou o PMA aos estímulos (LPS e AgI). Também não houve diferença na liberação espontânea, estimulada ou não com PMA (Figura 8). Nos camundongos *nude* sadios (G2), embora a adição do PMA nas culturas estimuladas com LPS e AgI pareça ter induzido maior produção de O_2^- , os resultados não foram significantes (Figura 9). Os resultados mostraram, também, que não houve diferença na produção de O_2^- entre camundongos sadios (G1 e G2), conforme representado na Figura 10 e Tabela 1. A produção de O_2^- não foi avaliada em camundongos *nude* inoculados com *M. leprae*.

Figura 8. Liberação de O_2^- por MØ peritoneais de camundongos suíços (G1). A barra representa a mediana da quantidade de O_2^- produzida por 1×10^5 células do lavado peritoneal.

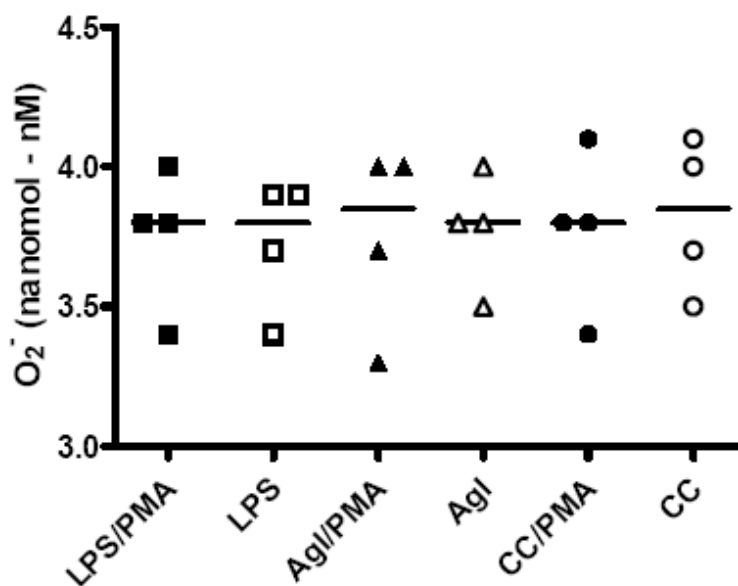


Figura 9. Liberação de O_2^- por MØ peritoneais de camundongos *nude* (G2). A barra representa a mediana da quantidade de O_2^- produzida por 1×10^5 células do lavado peritoneal.

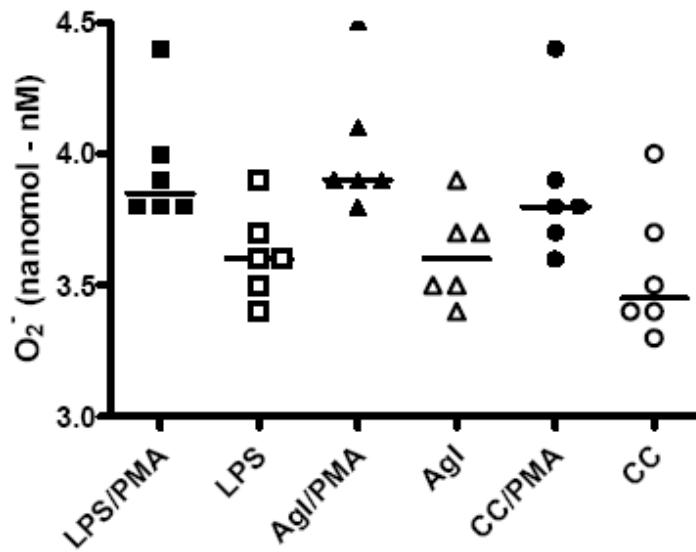
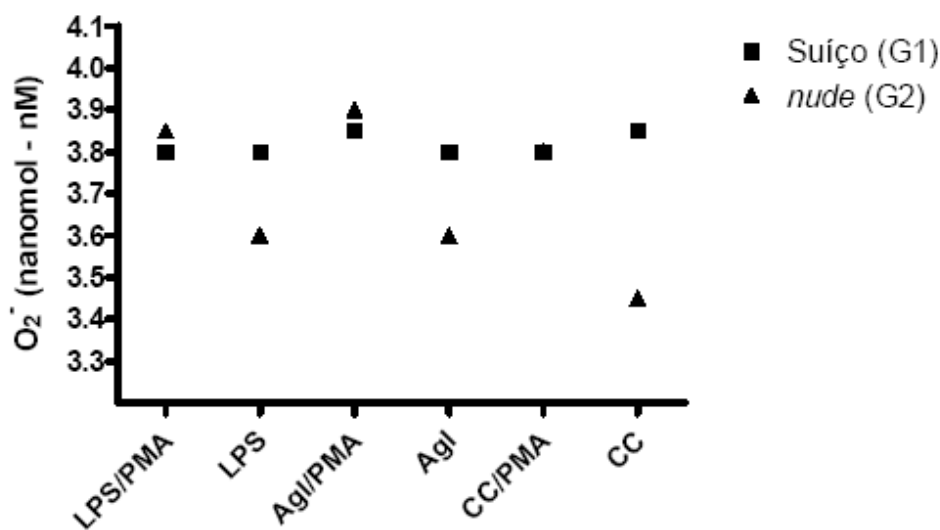


Figura 10. Liberação de O_2^- por MØ peritoneais de camundongos suíços (G1) e *nude* (G2) sadios. Os resultados estão expressos em mediana da quantidade de O_2^- produzida por 1×10^5 células do lavado peritoneal.



A produção de NO revelou que a adição de LPS nas culturas estimulou maior produção deste metabólito. A comparação entre camundongos sadios mostrou que não houve diferença na produção de NO (Figuras 11 e 12 e Tabela 1). Com relação aos animais inoculados, os resultados revelaram níveis maiores após estimulação com LPS e AgI, quando comparados à produção espontânea de NO (Figura 13). A comparação entre animais sadios e inoculados revelou níveis elevados nos camundongos inoculados, independentemente do estímulo (Figura 14 e Tabela 1).

Figura 11. Liberação de NO por MØ peritoneais de camundongos suíços (G1). A barra representa a mediana da quantidade de NO produzida por 1×10^5 células do lavado peritoneal.

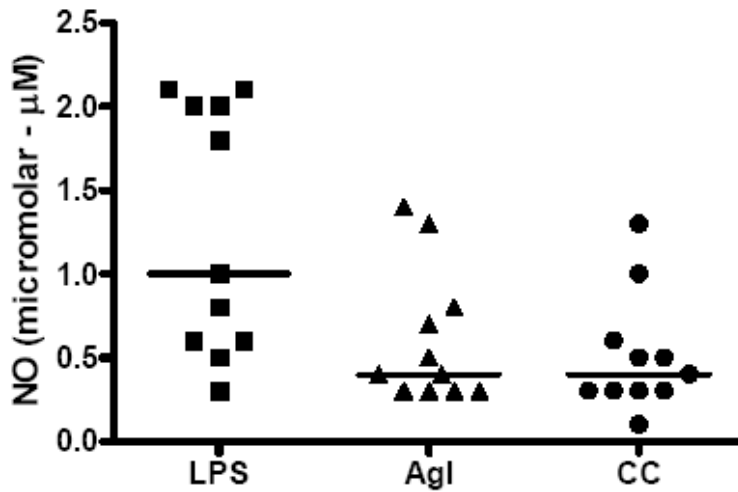


Figura 12. Liberação de NO por MØ peritoneais de camundongos *nude* (G2). A barra representa a mediana da quantidade de NO produzida por 1×10^5 células do lavado peritoneal.

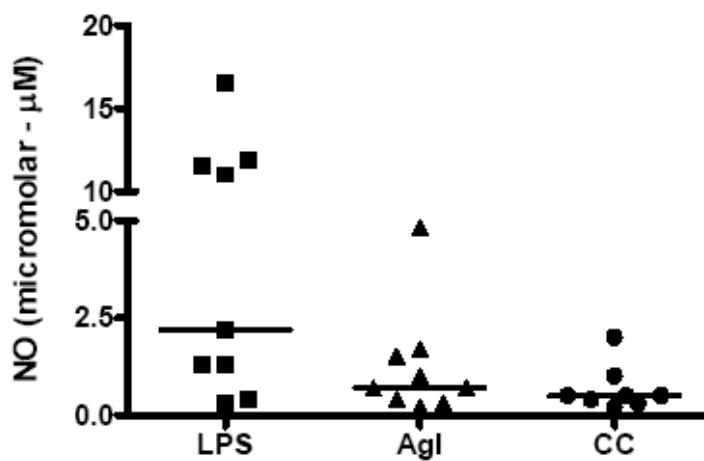


Figura 13. Liberação de NO por MØ peritoneais de camundongos *nude* inoculados com *M. leprae*, intraperitonealmente (G3). A barra representa a mediana da quantidade de NO produzida por 1×10^5 células do lavado peritoneal.

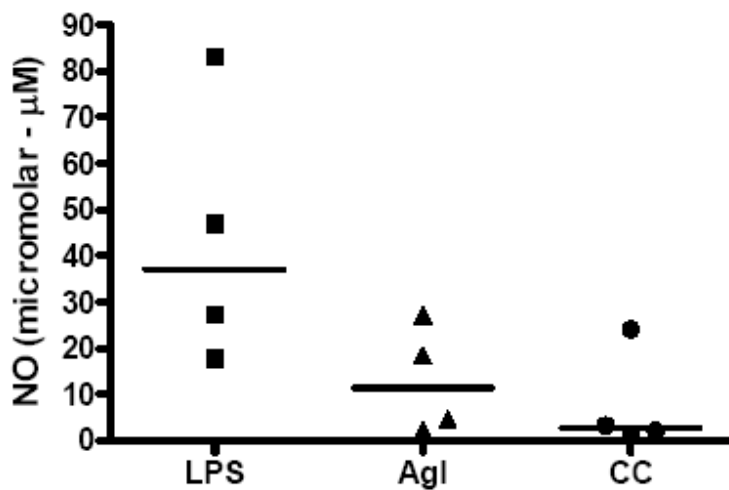
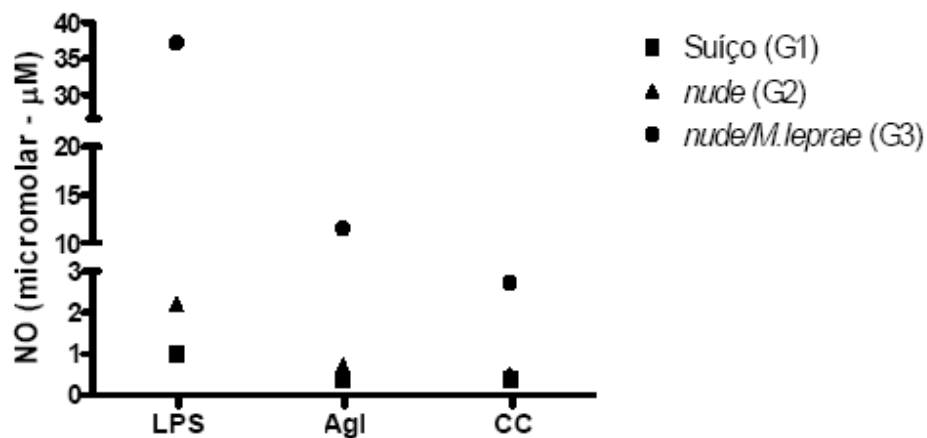


Figura 14. Liberação de NO por MØ peritoneais de camundongos suíços e *nude* sadios (G1 e G2) e *nude* inoculados com *M. leprae*, intraperitonealmente (G3). Os resultados estão expressos em mediana da quantidade de NO produzida por 1×10^5 células do lavado peritoneal.



Discussão



8. DISCUSSÃO

Os MØ são células comumente associadas aos mecanismos de defesa do hospedeiro contra microrganismos invasores. Essas células além de defenderem o hospedeiro através da fagocitose e digestão celular, também interagem e estimulam linfócitos a participarem dos mecanismos de defesa, desempenhando, deste modo, papel fundamental na resposta imune específica. Os MØ ao serem ativados apresentam uma série de alterações morfológicas, funcionais e metabólicas quando comparados aos não ativados. Essas células tornam-se maiores, aumentam sua capacidade de aderência e espraiamento em superfícies, aumentam a formação de pseudópodos e o número de vesículas pinocíticas.⁽⁴⁶⁾ Funcionalmente, ocorre a *explosão respiratória*, resultando em aumento no consumo de oxigênio e na geração dos ROI, como a H_2O_2 e O_2^- ; além disso, ocorre maior expressão da enzima iNOS e produção dos RNI, como o NO .^(2, 16) Esses reativos antimicrobianos são importantes na eliminação de patógenos e sua produção pode ser mensurada por diferentes métodos colorimétricos.⁽⁴³⁻⁴⁵⁾ Neste estudo implantamos as técnicas de dosagem de H_2O_2 , O_2^- e NO com a finalidade de empregá-las em estudos futuros visando avaliar o estado funcional de macrófagos na hanseníase e na doença de Jorge Lobo.

Considerando que pretendemos desenvolver esses estudos empregando modelos experimentais murinos, utilizamos para tanto MØ peritoneais de camundongos das linhagens Swiss e *nude*. Os camundongos *nude*, provenientes de nosso biotério, são resultantes do cruzamento de camundongos suíços (fêmea) e *nude* (machos); deste modo, empregamos estas duas linhagens de camundongos na padronização das técnicas.

Tivemos a oportunidade, também, de avaliar a produção dos metabólitos do oxigênio e nitrogênio em MØ obtidos de quatro camundongos *nude* inoculados com *M. leprae*, via intraperitoneal. Cabe salientar que a literatura não registra estudos com camundongos *nude* inoculados intraperitonealmente com o bacilo, de modo que este trabalho é inédito e os resultados são muito promissores, embora o número de animais avaliados seja pequeno. Sendo assim, é nossa intenção dar continuidade ao estudo.

No desenvolvimento das técnicas para quantificação dos metabólitos do oxigênio empregamos como estímulo o ester de forbol, PMA. Esse agente ativa a proteína quinase C, uma enzima dependente de íons Ca^{2+} e fosfolípidos, amplamente distribuída em vários tipos celulares, levando deste modo, a *explosão respiratória* com conseqüente produção de metabólitos tóxicos do oxigênio, como a H_2O_2 .⁽⁴⁷⁾ Outros estímulos como zymosan,

partículas de látex, ionóforos, IL-1, IL-8, fator ativador de plaquetas (PAF), TNF e fator C5a do complemento são capazes de ativar os fagócitos e desencadear a *explosão respiratória*.⁽⁴⁸⁾

O PMA utilizado neste estudo foi diluído, inicialmente, em três concentrações diferentes a partir de uma solução estoque de 1 mg/ml: 1:500, 1:250 e 1:100. Na quantificação de H₂O₂ obtivemos melhores resultados com a diluição 1:100, deste modo, optamos por esta diluição. Quanto à quantificação de O₂⁻, quando utilizamos a diluição 1:100, não obtivemos maior produção desse metabólito, pois tanto em culturas de MØ de camundongos suíços saudáveis quanto *nude* saudáveis não houve diferença significativa. É possível que, neste caso, o PMA deveria ser empregado em uma concentração maior, entretanto, considerando que tivemos dificuldade na aquisição de um dos reagentes (citocromo C) utilizado na dosagem deste metabólito, isto deverá ser objeto de estudo futuro. Além disso, não foi possível quantificarmos o O₂⁻ em cultura de MØ de camundongos *nude* inoculados, pois conforme relatado, ainda não tínhamos o reagente na época do sacrifício dos animais.

Ao analisarmos os resultados da liberação de H₂O₂ por MØ de camundongos inoculados e saudáveis, verificamos maior produção desse metabólito nos animais inoculados com o bacilo. Na literatura consultada não encontramos nenhum estudo avaliando a produção de H₂O₂ em camundongos inoculados com *M. leprae*, via intraperitoneal, independentemente da linhagem de camundongo, o que impossibilita os estudos comparativos. Na hanseníase humana, Sharp & Banerjee estudaram a produção de H₂O₂ e O₂⁻ por monócitos cultivados *in vitro* de pacientes tuberculóides (TT) e virchovianos (LL) e não encontraram diferenças na produção desses metabólitos quando comparados aos indivíduos saudáveis. Assim, sugeriram que os macrófagos dos pacientes hansenianos eram competentes na produção dos ROI.⁽⁴⁹⁾ Nathan et al., porém, relataram que os macrófagos de pacientes LL eram deficientes no metabolismo oxidativo e conseqüentemente, na função microbicida.⁽⁵⁰⁾

Klebanoff & Shepard demonstraram que o *M. leprae*, *in vitro*, é susceptível a morte mediada pela H₂O₂-mieloperoxidase. Eles sugeriram que como os MØ são desprovidos de grânulos contendo mieloperoxidase, um possível mecanismo de destruição do *M. leprae* via H₂O₂-mieloperoxidase, poderia ser através da ingestão do bacilo com mieloperoxidase aderida na sua superfície. Esta mieloperoxidase seria proveniente de eosinófilos ou monócitos.⁽⁵¹⁾

Com relação à produção de O₂⁻, não encontramos diferença entre camundongos *nude* e suíços saudáveis; do mesmo, a produção de H₂O₂ foi semelhante nessas duas linhagens de camundongos. Nossos resultados diferem daqueles encontrados por Sharp & Colston que

encontraram maior produção dos metabólitos do oxigênio em cultura de MØ peritoneais de camundongos *nude* em comparação a camundongos normais, isto é, providos de timo. ⁽⁵²⁾ Cabe salientar que este foi o único trabalho que encontramos onde os autores quantificaram H_2O_2 e O_2^- em culturas de MØ peritoneais de camundongos *nude*. Julgamos que mais estudos são necessários para investigar essa questão mais profundamente.

Cabe ressaltar que o *M. leprae* parece possuir uma capacidade inata para resistir aos efeitos tóxicos do O_2^- . Neste sentido, foi demonstrado que o bacilo possui a enzima superóxido dismutase que juntamente com o glicolípido fenólico-1 (PGL-1), componente da parede celular, atuam como inibidores do O_2^- . Além disso, Chan et al. demonstraram que a presença do lipopolissacarídeo da parede celular, a lipoarabinomanana (LAM), promoveria a diminuição da liberação do O_2^- e desativação da retirada do radical hidroxila (OH \cdot). ⁽⁵³⁾ Desse modo, o bacilo estaria bem equipado para se proteger do O_2^- , entretanto não possuiria mecanismos protetores contra a H_2O_2 , conforme demonstrado por Sharp et al. ⁽⁵⁴⁾ Os autores, observaram perda da viabilidade do *M. leprae* em culturas de MØ peritoneais de camundongos *nude* e sugeriram que este metabólito seria responsável pela morte dos bacilos, *in vitro*. Entretanto, eles não foram capazes de explicar o porquê deste mecanismo de morte não ser eficiente nos MØ de camundongos *nude*, *in vivo*. Os autores sugeriram que mecanismos supressores *in vivo*, impediriam os MØ de desempenharem sua capacidade microbicida e isto necessitaria de investigações.

Na padronização da técnica do O_2^- efetuamos leituras em diferentes tempos com a finalidade de avaliar se a produção do ânion poderia sofrer alterações. Verificamos que não houve diferença entre os tempos: 15, 30 e 60 min; deste modo, optamos pela leitura aos 15 min. Conforme mencionado anteriormente, o PMA não aumentou a produção de O_2^- nas culturas de MØ peritoneais de camundongos *nude* e suíços saudáveis. Consultando a literatura, não encontramos estudos avaliando a concentração de O_2^- em MØ peritoneais de camundongos *nude* ou suíços estimulados com PMA. Encontramos, apenas, o trabalho de Holzer et al. que relataram níveis maiores de O_2^- em culturas estimuladas com PMA; entretanto, esse estudo foi realizado com MØ peritoneais de camundongos BALB/c. ⁽⁵⁵⁾

Com relação ao NO, nossos resultados revelaram maior produção nos camundongos inoculados com o bacilo em comparação aos animais saudáveis, a semelhança do que foi observado com a H_2O_2 . Esses resultados sugerem que a via intraperitoneal de inoculação do *M. leprae* parece estimular a produção desses metabólitos e poderá ser empregada na avaliação do estado funcional de MØ. Salientamos que esses resultados foram obtidos com

um pequeno número de animais, sendo necessário uma casuística maior, o que será objeto de estudo futuro.

Na hanseníase experimental existem alguns estudos avaliando o papel do NO sobre o *M. leprae*. Neste sentido, Adams et al. verificaram que o NO produzido por MØ peritoneais murinos, ativados pelo IFN- γ , inibia a multiplicação do bacilo e sugeriram que os RNI se constituiriam em um possível sistema antimicrobiano de macrófagos ativados contra o *M. leprae*.⁽⁵⁶⁾ Mais recentemente, Adams et al. avaliaram a viabilidade do bacilo a partir de culturas de MØ peritoneais de camundongos nocaute para a enzima iNOS, ativados ou não com IFN- γ e LPS. Os autores verificaram que houve multiplicação do *M. leprae*, embora menor que nas culturas de MØ obtidos de camundongos normais. Assim, sugeriram que o controle da infecção pelo bacilo, *in vivo*, poderia ser mantida na ausência deste sistema antimicrobiano e que uma via alternativa importante deveria ser considerada, isto é, a produção dos ROI. Eles salientaram que os MØ de camundongos nocaute para a enzima iNOS não são deficientes na produção dos metabólitos do oxigênio, entretanto, na ausência dos RNI, os ROI sozinhos não são suficientes para matar o *M. leprae*.⁽⁵⁷⁾ Os autores relataram, ainda, que camundongos nocaute para a enzima iNOS desenvolvem lesões no coxim plantar que assemelham-se as lesões de pacientes dimorfos tuberculóides (HDT) e, deste modo, poderiam ser empregados como modelo experimental para o entendimento da instabilidade que acomete os pacientes dimorfos.

Um estudo mais recente realizado por Hagge et al., em 2007, discorda dos achados de Adams et al. e reforça o papel dos metabólitos do nitrogênio na morte do *M. leprae*. Esses autores relataram que MØ de camundongos deficientes na produção de ROI quando ativados pelo IFN- γ são capazes de matar o bacilo, via RNI, e sugeriram que os metabólitos do oxigênio não seriam importantes na destruição do *M. leprae*.⁽⁵⁸⁾

Na hanseníase humana, os estudos *in situ* revelam que a enzima iNOS está expressa nas lesões cutâneas de pacientes TT e HDT⁽⁵⁹⁻⁶¹⁾ e ausente nas lesões de pacientes LL.⁽⁵⁹⁾ Considerando que a enzima iNOS pode ser empregada como marcador de resposta imune celular e indicador da produção de IFN- γ , os estudos revelam expressão da enzima iNOS em pacientes que exibem imunidade celular ao bacilo e, conseqüentemente, reduzida carga bacilar.

Nos últimos anos, pesquisadores têm direcionado seus estudos na avaliação do papel antimicrobiano da vitamina D contra diversos patógenos. Esse sistema antimicrobiano dependente da vitamina D se constitui em importante mecanismo da resposta imune inata e é mediado pelo TLR2/1 (toll-like receptor).⁽⁶²⁾ Os TLRs são receptores presentes na superfície

de monócitos/MØ que reconhecem produtos microbianos, como o LPS de bactérias Gram – e peptidoglicanas de Gram +; estes produtos microbianos que interagem com os TLRs de MØ foram denominados de PAMPs (padrões moleculares associados a patógenos).⁽⁶³⁾ A ativação da via antimicrobiana dependente da vitamina D e mediada pelo TLR2/1 gera o peptídeo catelicidina que tem atividade antimicrobiana contra patógenos, como o *M. tuberculosis*.⁽⁶⁴⁾ Esta via pode ser ativada pela IL-15, citocina que ativa monócitos/MØ resultando em aumento na apresentação antigênica e na produção de catelicidina.⁽⁶⁵⁾ Recentemente, esta via antimicrobiana vem sendo estudada na hanseníase, o que poderá possibilitar novas descobertas a respeito da morte do *M. leprae*.^(66, 67)

Em nosso estudo para implantarmos as técnicas de dosagem do NO, H₂O₂ e O₂⁻ utilizamos um estímulo inespecífico, o LPS, e um estímulo específico, o antígeno inteiro do *M. leprae*, nas culturas de MØ peritoneais. O LPS é capaz de se ligar ao receptor CD14 e TLR4 presentes na membrana de monócitos/MØ estimulando a produção de citocinas e a produção dos metabólitos do oxigênio e nitrogênio.⁽⁷⁾ O antígeno inteiro do *M. leprae* contém componentes lipídicos e protéicos da parede celular do bacilo e foi acrescentado nas culturas para avaliar a produção desses metabólitos frente a um estímulo específico, principalmente nos animais que foram inoculados intraperitonealmente com o bacilo. Verificamos que tanto nos animais saudáveis quanto nos inoculados, o LPS estimulou maior produção de NO e H₂O₂ em comparação as culturas não estimuladas (produção espontânea). Nos animais inoculados houve maior produção de NO nas culturas estimuladas com LPS e AgI, sugerindo que o antígeno foi um bom estímulo; entretanto, em estudos futuros pretendemos empregar, também, outros antígenos do *M. leprae*, além do AgI.

Tomados em conjunto, os resultados revelam que as técnicas para dosagem dos metabólitos do oxigênio e nitrogênio foram implantadas no laboratório, conforme o objetivo inicial, e poderão ser utilizadas em estudos futuros.

Conclusões



9. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste estudo nos permitem concluir que:

- as técnicas de quantificação de H_2O_2 , O_2^- e NO foram implantadas no Laboratório de Biologia e poderão ser empregadas em projetos de pesquisa que visam avaliar o estado funcional de monócitos/ MØ.
- os resultados serão utilizados como experimento piloto para o estudo da hanseníase experimental murina, via intraperitoneal.

Referências



10 REFERÊNCIAS*

1. Blussé Van Oud Alblas A, Van Furth R. Origin, kinetics and characteristics of pulmonary macrophages in the normal steady state. *J Exp Med* 1979; 149: 1504-18.
2. Calich VLG, Vaz CAC. *Imunologia Básica*. São Paulo: Artes Médicas; 1988.
3. Goldsby RA, Kindt TJ, Osborne BA. *Kuby Imunologia*. 4 ed. Rio de Janeiro: Revinter; 2002.
4. Friedlander MA, Hilbert CM, Wu YC. Disparate cytochemical characteristics and production of cytokines and prostaglandin E₂ by human mononuclear phagocytes from the blood, lung and peritoneal cavity. *J Lab Clin Med* 1994; 123: 574-84.
5. Babior BM. The respiratory burst of phagocytes. *J Clin Invest* 1984; 73: 599-601.
6. Lewis CE, Mcgee JOD. *The macrophage: the natural immune system*. New York: Oxford University Press; 1992.
7. Aderem A, Underhill DM. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 593-623.
8. Aderem A, Wright SD, Silverstein SC, Cohn ZA. Ligated complement receptors do not activate the arachidonic acid cascade in resident peritoneal macrophages. *J Exp Med* 1985; 161: 617-22.
9. Geller P, Geller M. Citocinas e imunorregulação. *An Acad Nac Med* 1997; 157: 97-102.
10. Varella PPV, Forte WCN. Citocinas: revisão. *Rev bras alerg imunopatol* 2001; 24: 146-54.
11. Sung SS, Nelson RS, Silverstein SC. Yeast mannans inhibit binding and phagocytosis of zymozan by mouse peritoneal macrophages. *J Cell Biol* 1983; 96: 160-6.
12. Jardim RF, Andrade MEB, Wilson TA, Mello JF, Criado PR. Citocinas. *Rev Bras Alerg Imunopatol* 1994; 17: 86-98.

* International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. *Ann Intern Med* 1997; 126: 36-47.

-
13. Drath DB, Karnovsky ML. Superoxide production by phagocytic leucocytes. *J Exp Med* 1975; 141: 257-60.
 14. Ward PA, Warren JS, Johnson KJ. Oxygen radicals: inflammation and tissue injury. *Free Rad Biol Med* 1988; 5: 403-8.
 15. Parry MF, Root RK, Metcalf JA, Delaney KK, Kaplow LS, Richar WJ. Myeloperoxidase deficiency: prevalence and clinical significance. *Ann Int Med* 1981; 95: 293-301.
 16. Vespa GNR, Silva JS. Óxido nítrico (NO): produção e significado fisiológico durante as infecções. *Rev Pat Trop* 1994; 23: 1-23.
 17. Cenci E, Romani L, Mencacci A, Spaccapelo E, Schaffel AE, Puccetti P, et al. Interleukin-4 and interleukin-10 inhibit nitric oxide-dependent macrophage killing of *Candida albicans*. *Eur J Immunol* 1993; 23: 1034-8.
 18. Summersgill JT, Powell LA, Buster BL, Miller RD, Ramirez JA. Killing of *Legionella pneumophila* by nitric oxide in gamma-interferon-activated macrophages. *J Leukoc Biol* 1992; 52: 625-9.
 19. James SL, Glaven J. Macrophage cytotoxicity against schistosomula of *Schistosoma mansoni* involves arginine-dependent production of reactive nitrogen intermediates. *J Immunol* 1989; 143: 4208-12.
 20. Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James L, Sher A. The microbial activity of interferon- γ treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor- β . *Eur J Immunol* 1992; 22: 2101-6.
 21. Isobe K, Nakashima, I. Abundant production of nitric oxide from murine macrophages by direct stimulation of tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 192: 499-504.
 22. Palmer RM. The L-arginine: nitric oxide pathway. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 1993; 2: 122-8.
 23. Schon T, Hernandez-Pando RH, Negesse Y, Leekassa R, Sundqvist T, Britton S. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in borderline leprosy lesions. *Brit J Dermatol* 2001; 145: 809-15.

-
24. Ross R, Gillitzer C, Kleinz R, Schwing J, Kleinert H, Forstermann U, et al. Involvement of NO in contact hypersensitivity. *Int Immunol* 1998; 10: 61-9.
 25. Oliveira SH, Fonseca SG, Romão PR, Figueiredo F, Ferreira SH, Cunha FQ. Microbicidal activity of eosinophils is associated with activation of the arginine-NO pathway. *Parasite Immunol* 1998; 20: 405-12.
 26. Batista AC. Nitric oxide synthesis and severity of human periodontal disease. *Oral Dis* 2002; 8: 254-60.
 27. Taylor-Robinson AW, Liew FY, Severn A, Xu D, Mccorley SJ, Garside P, et al. Regulation of the immune response by nitric oxide differentially produced by T helper type 1 and T helper type 2 cells. *Eur J Immunol* 1994; 24: 980-4.
 28. Fox SW, Chow JW. Nitric oxide synthase expression in bone cells. *Bone* 1998; 23: 1-6.
 29. Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science* 1992; 258: 2898-902.
 30. Anggard E. Nitric oxide: mediator, murderer and medicine. *Lancet* 1994; 343: 1199-206.
 31. Moncada S, Higgs A. The L-arginine nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993; 27: 2002-12.
 32. Boutard V, Havouis R, Fouqueray B, Philippe C, Moulinoux JP, Baud L. Transforming growth factor-beta stimulates arginase activity in macrophages. *J Immunol* 1995; 155: 2077-84.
 33. Nathan CF, Murray HW, Wiebe ME, Rubin BY. Identification of interferon-gamma as the lymphokine that activates human macrophage oxidative metabolism and antimicrobial activity. *J Exp Med* 1983; 158: 670-89.
 34. Goodman JW. A resposta imune. In: Stites DP, Terr AI, editors. *Imunologia básica*. Rio de Janeiro: Prentice-Hall do Brasil; 1992. p.26-34.
 35. Kalish RS. Antigen processing the gateway to the immune response. *J Am Acad Dermatol* 1995; 32: 640-52.
 36. Krahenbuhl JL. Role of macrophage in resistance of leprosy. In: Hasting RC, editor. *Leprosy*. Edinburgh: Churchill Livingstone; 1994. p.137-55.

-
37. Rabinovitch M, Menejias RE. Increased spreading of macrophages from mice treated with interferon inducers. *Cell Immunol* 1977; 29: 86-95.
 38. Flanagan SP. *Nude*, a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genetical Research* 1966; 8: 295-309.
 39. Pantelouris EM. Absence of thymus in a mouse mutant. *Nature* 1968; 217: 370-1.
 40. Prabhakaran K, Harris EB, Kirchheimer WF. Hairless mice, human leprosy and thymus-derived lymphocytes. *Experientia* 1975; 31: 784-5.
 41. Colston MJ, Kohsaka K. The nude mouse in studies of leprosy. In: Fogh J, Giovanella BC, editors. *The nude mouse in experimental and clinical research*. New York: Academic Press; 1982. p. 247-66.
 42. Chehl S, Ruby J, Job CK, Hastings RC. The growth of *Mycobacterium leprae* in nude mice. *Lepr Rev* 1983; 54: 283-304.
 43. Pick A, Misel G. Rapid microassay for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using automatic enzyme immunoassay reader. *J Immunol Methods* 1981; 46: 211-26.
 44. Russo M, Teixeira HC, Marcondes MCG, Barbuto JAM. Superoxide-independent hydrogen peroxide release by activated macrophages. *Brazilian J Med Biol Res* 1989; 22: 1271-3.
 45. Green LC. Nitrite biosynthesis in man. *Proc Natl Acad Sci* 1981; 18: 7764-8.
 46. Johnston Jr. RB. Monocytes and macrophages. *N Engl J Med* 1988; 318: 747-52.
 47. Nishizuka Y. The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature* 1984; 308: 693-8.
 48. van Eeden SF, Klut ME, Walker BA, Hogg JC. The use of flow cytometry to measure neutrophil function. *J Immunol Methods* 1999; 232: 23-43.
 49. Sharp AK, Barnerjee DK. Hydrogen peroxide and superoxide production by peripheral blood monocytes in leprosy. *Clin Exp Immunol* 1985; 60: 203-6.
 50. Nathan CF, Kaplan G, Levis WR, Nusrat A, Witmer MD, Sherwin SA, et al. Local and systemic effects of intradermal recombinant interferon gamma in patients with lepromatous leprosy. *N Engl J Med* 1986; 315: 6-15.

-
51. Klebanoff SJ, Shepard CC. Toxic effect of the peroxidase-hydrogen peroxide-halide antimicrobial system on *Mycobacterium leprae*. *Infect Immun* 1984; 44: 534-6.
 52. Sharp AK, Colston MJ. The regulation of macrophage activity in congenitally athymic mice. *Europ J Immunol* 1984; 14: 102-5.
 53. Chan J, Xing Y, Magliozzo RS, Bloom BR. Killing of virulent *Mycobacterium tuberculosis* by reactive nitrogen intermediates produced by activated murine macrophages. *J Exp Med* 1992; 175: 1111-22.
 54. Sharp AK, Colston MJ, Banerjee DK. Susceptibility of *Mycobacterium leprae* to the bactericidal activity of mouse peritoneal macrophages and hydrogen peroxide. *J Med Microbiol* 1985; 19: 77-84.
 55. Holzer TJ, Nelson KE, Schauf V, Crispin RG, Andersen BR. *Mycobacterium leprae* fails to stimulate phagocytic cell superoxide anion generation. *Infect Immun* 1986; 51: 514-20.
 56. Adams LB, Franzblau SG, Vavrin Z, Hibbs JB, Krahenbuhl JL. L-arginine-dependent macrophage effector functions inhibit metabolic activity of *Mycobacterium leprae*. *J Immunol* 1991; 147: 1642-6.
 57. Adams LB, Job CK, Krahenbuhl JL. Role of inducible nitric oxide synthase in resistance to *Mycobacterium leprae* in mice. *Infect Immun* 2000; 68: 5462-5.
 58. Hagge DA, Marks VT, Ray NA, Dietrich MA, Kearney MT, Scollard DM, et al. Emergence of an effective adaptive cell mediated immune response to *Mycobacterium leprae* is not impaired in reactive oxygen intermediate-deficient mice. *FEMS Immunol Med Microbiol* 2007; 51: 92-101.
 59. Khanolkar-Young S, Snowdon D, Lockwood DNJ. Immunocytochemical localization of nitric oxide synthase and transforming growth factor-beta (TGF- β) in leprosy lesions. *Clin Exp. Immunol* 1998; 113: 438-42.
 60. Schön T, Hernandez-Pando RH, Negesse Y, Leekassa R, Sundqvist T, Britton S. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in borderline leprosy lesions. *Brit J Dermatol* 2001; 145: 809-15.
 61. Venturini J. Hanseníase dimorfa: perfil de citocinas em sobrenadante de cultura de células mononucleares e *in situ*. [tese]. Botucatu: Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista; 2008.

-
62. Liu PT, Schenk M, Walker VP, Dempsey PW, Kanchanapoomi M, Wheelwright, et al. Convergence of IL-1 β and VDR activation pathways in human TLR2/1-induced antimicrobial responses. *PLoS ONE* 2009; 4: e5810.
63. Mackay I, Rosen FS. Innate immunity. *N Engl J Med* 2000; 343: 338-44.
64. Liu PT, Stenger S, Li H, Wenzel L, Tan BH, Krutzik SR, et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. *Science* 2006; 311: 1770-3.
65. Krutzik SR, Hewison M, Liu PT, Robles JA, Stenger S, Adams JS, et al. IL-15 links TLR2/1-induced macrophage differentiation to vitamin D-dependent antimicrobial pathway. *J Immunol* 2008; 181: 7115-20.
66. Montoya D, Cruz D, Teles RMB, Lee DJ, Ochoa MT, Krutzik SR, et al. Divergence of macrophage phagocytic and antimicrobial programs in leprosy. *Cell Host & Microbe* 2009; 6: 343-53.
67. Modlin RL. The innate immune response in leprosy. *Curr Op Immunol* 2009; 22: 1-7.