

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Patrícia Renck Nunes

**PAPEL DO EIXO SIMPÁTICO-CRH PERIFÉRICO-HISTAMINA NA
FUNÇÃO IMUNOLÓGICA DE MACRÓFAGOS DE RATO**

Porto Alegre
2011

Patrícia Renck Nunes

**PAPEL DO EIXO SIMPÁTICO-CRH PERIFÉRICO-HISTAMINA NA
FUNÇÃO IMUNOLÓGICA DE MACRÓFAGOS DE RATO**

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Área de concentração: Fisiologia Geral

Orientador: Prof. Dr. Paulo Ivo Homem de Bittencourt Júnior

Porto Alegre
2011

“- Poirot, – disse eu – estive pensando.
- Um exercício admirável, meu caro. Continue praticando.”

Hercule Poirot em *A Casa do Penhasco*, de Agatha Christie.

Agradecimentos

Aos meus pais, por fazerem um esforço enorme para compreender minha ausência em feriados e finais de semana durante toda minha graduação;

À Priscilla Ambrosi, por ser um grande exemplo de iniciativa;

À Mariana Schünemann, pelo seu jeito calmo e pela tranquilidade que me passa nos melhores e piores momentos;

Ao Wagner Nunes, por me mostrar que minhas preocupações são totalmente irrelevantes;

A esses últimos três por rirem e chorarem comigo;

À Leila Fonini, pelos almoços e pelas risadas;

Aos meus professores de graduação, por abrirem minha mente e expandirem meus horizontes;

Aos colegas, pelas discussões, pelas críticas e por tornarem as partes “ruins” dessa fase muito menos cansativas;

Aos colegas de laboratório e ao meu orientador, pela sabedoria, pela paciência e pelos ensinamentos;

A todos aqueles que, de alguma forma e mesmo sem saber, contribuíram para a conclusão desse trabalho.

Sumário

Resumo	6
Introdução e Revisão Bibliográfica.....	7
Artigo Científico.....	Erro! Indicador não definido.
Introdução.....	Erro! Indicador não definido.
Resultados.....	Erro! Indicador não definido.
Discussão	Erro! Indicador não definido.
Materiais e Métodos	Erro! Indicador não definido.
Agradecimentos.....	Erro! Indicador não definido.
Referências	Erro! Indicador não definido.
Conclusões e Perspectivas.....	40
Referências.....	41

Resumo

Os componentes do eixo simpático-CRH (hormônio liberador de corticotropina) periférico-histamina atuam uns sobre os outros e podem influenciar de maneiras distintas o sistema imunológico tanto *in vivo* quanto *in vitro*, embora muitas vezes seus efeitos não sejam tão claros. Para avaliar o efeito da epinefrina, norepinefrina, histamina e CRH sobre o sistema imune inato *in vitro*, macrófagos peritoneais de ratos Wistar machos (200g – 250g, n=8) foram isolados e cultivados na presença de partículas de zimosan previamente opsonizadas por 30 minutos. Avaliou-se o efeito dos componentes do eixo nas suas concentrações fisiológicas com ou sem a coestimulação das células com forbol-miristato acetato (PMA) sobre a atividade fagocítica dos macrófagos. O número de partículas fagocitadas por cada célula num total de 50 células foi contado em microscópio de contraste de fase em aumento de 640X. Os resultados de fagocitose foram expressos pelo índice de Hishikawa. O efeito sobre a expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) foi verificado após 6 horas de cultura dos macrófagos em contato com os componentes estudados através de Western Blot. Todos os tratamentos foram capazes de aumentar o imunoconteúdo de iNOS. Sobre a fagocitose, a epinefrina e a norepinefrina tiveram efeitos sinérgicos ao PMA (aumentando a fagocitose em 63% e 72%, respectivamente) assim como a histamina, embora esta também tenha apresentado efeito menor (46% de aumento). O CRH não alterou o índice de fagocitose de zimosan. Enquanto o CRH parece ter influência somente em médio prazo sobre a atividade imunológica (expressão proteica), as catecolaminas e a histamina mostraram efeitos também em curto prazo (fagocitose).

Palavras-chave: CRH, epinefrina, fagocitose, histamina, macrófago, zimosan.

Introdução e Revisão Bibliográfica

Em adição à barreira física constituída pela pele, o organismo de mamíferos é protegido pelo sistema imune inato e adquirido, que possuem componentes humorais e celulares. Os componentes humorais são proteínas como imunoglobulinas específicas ou não, proteínas do sistema complemento, proteínas de fase aguda de inflamação e substâncias bactericidas como lisozimas, entre outros. Já os componentes celulares são os diferentes leucócitos responsáveis pelas respostas imunológicas tanto inatas quanto adquiridas (Goldsby 2007).

O sistema imune inato é a primeira linha de defesa do organismo, agindo de forma rápida e estereotipada, sem a formação de memórias imunológicas como a imunidade adquirida. As células do sistema imune inato compõem a barreira fagocítica do organismo, pois internalizam antígenos e patógenos para digeri-los, matá-los e/ou apresentá-los a outras células imunológicas como os linfócitos. As células responsáveis por essa resposta fagocítica são monócitos/macrófagos, neutrófilos e, eventualmente, eosinófilos. Dentre esses, os macrófagos são as células com localização tecidual que apresentam essa atividade mais desenvolvida. Eles derivam de monócitos, células circulantes que migram para um determinado tecido no momento da inflamação e se diferenciam em macrófagos. Uma vez ativadas nos tecidos, essas células secretam citocinas e fagocitam patógenos, restos celulares e células mortas. Além de se originarem de monócitos durante o processo inflamatório, os macrófagos também estão presentes constitutivamente (chamados de macrófagos residentes) em diversos tecidos, onde podem receber denominações específicas, como as células de Küpffer no fígado e osteoclastos na medula óssea (Goldsby 2007).

O processo de fagocitose leva os macrófagos a um aumento no metabolismo celular, na motilidade (emissão de pseudópodes), produção de citocinas e outros mediadores imunomoduladores, secreção de enzimas citoplasmáticas e produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de

nitrogênio (ERN). As citocinas liberadas pelos macrófagos podem atuar como quimiocinas (recrutando mais células para o processo inflamatório local) e podem ativar e estimular outros leucócitos. As espécies reativas, por sua vez (peróxido de hidrogênio, óxido nítrico, radical hidroxil, etc), causam danos a lipídios e proteínas dos patógenos. Uma das principais espécies reativas produzidas pelo sistema imunológico é o óxido nítrico (NO[•]) que, além de causar oxidação de substâncias também atua como mediador de diversos processos fisiológicos e patológicos, incluindo vasodilatação, neurotransmissão e inflamação. O NO[•] é produzido pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), que catalisa a conversão de L- arginina a NO[•] e L- citrulina. Essa enzima existe em diferentes isoformas: a endotelial (eNOS), a neuronal (nNOS) e a induzível (iNOS). Esta última está presente em diversas células do sistema imunológico, incluindo os macrófagos ativados (Wang and Marsden 1995). A atividade da iNOS é estimulada por citocinas como interferon-gama (IFN- γ), fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interleucina-beta (IL- β), lipopolissacarídeos (LPS) e outros agentes imunologicamente relevantes. Enquanto isso, IL-6 e IL-8 parecem ter um efeito mais inibitório sobre sua atividade (Niess, Dickhuth et al. 1999). A transcrição de iNOS, por sua vez, tem dois sítios regulatórios: um para o fator de transcrição k-B (NF-kB) e outro para IRF-1 (*interferon regulated factor*), induzido pelo IFN- γ (De Stefano, Maiuri et al. 2006).

O NF-kB é um fator de transcrição que atua promovendo a transcrição de genes de resposta imunológica, de proliferação celular e inflamatória como os genes da IL-2, do TNF- α , do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) (Droge, Schulze-Osthoff et al. 1994) e da própria enzima iNOS, estando envolvido em diversos processos inflamatórios como um mediador imediato da resposta imune (Rossi, Elia et al. 1997). A translocação do NF-kB para o núcleo é dependente de fosforilação de proteínas inibitórias I κ B, geralmente I κ B α , o que pode ser regulado por diversos fatores e proteínas, incluindo LPS e as proteínas de choque térmico (HSPs).

As HSPs são chaperonas moleculares distribuídas em diferentes famílias de acordo com seu peso molecular: 40 kDa, 60 kDa, 70 kDa, 90

kDa, 100 kDa e pequenas HSPs. A família de 70 kDa possui duas formas citoplasmáticas: uma constitutiva e de indução lenta (hsp73 ou hsc70) e uma forma rapidamente induzível (hsp72 ou hsp70). A HSP70 participa de reparo ao dano tecidual e é essencial para a citoproteção durante o estresse oxidativo, inclusive aquele gerado pelo aumento de metabolismo celular (Pedersen, Rohde et al. 1998). Sua expressão é induzida por diversos agentes estressores como choque térmico, febre, metais pesados, desequilíbrio redox e exercício físico. Sabe-se também que as HSPs intracelulares são capazes de bloquear a ação do NF-κB e que possuem, portanto, ação intracelular anti-inflamatória (Feinstein, Galea et al. 1996). Por outro lado, quando encontrada no meio extracelular, a HSP70 tem papel pró-inflamatório, pois ativa o NF-κB, aumenta a expressão de citocinas pró-inflamatórias e interage com receptores *Toll-like* (TLR) 2 e 4 (Asea, Rehli et al. 2002).

Dentre os vários fatores responsáveis pelo aumento de expressão de HSP70 tanto sérica (Febbraio, Ott et al. 2002) quanto muscular (Tupling, Bombardier et al. 2007) encontra-se o exercício físico moderado. Estudos em nosso laboratório também mostram que o exercício é capaz de elevar a concentração intracelular de HSP70 em diferentes células do sistema imune (Schöler et al.; Heck et al.; dados não publicados).

Durante o exercício, é observado um aumento na atividade imunológica de macrófagos quanto à fagocitose, capacidade oxidativa e produção de NO• via ativação do NF-κB. O exercício físico moderado eleva as concentrações séricas de catecolaminas como adrenalina e noradrenalina, que poderiam estimular macrófagos via receptores beta adrenérgicos e posteriormente ativar o NF-κB (Silveira, Rodrigues et al. 2007).

Entretanto, estudos *in vitro* mostram que a adrenalina tem efeito inibitório sobre a resposta imunológica a LPS de macrófagos pela diminuição na produção de NO• (Zinyama, Bancroft et al. 2001) e que isso ocorre através da ativação de receptores beta adrenérgicos (Sigola and Zinyama 2000). Deng e colaboradores concordaram que concentrações altas de adrenalina (10^{-6} M a 10^{-8} M) são capazes de inibir a produção de TNF-α,

mas também mostraram que concentrações mais baixas (10^{-9} M e 10^{-12} M) não o fazem (Deng, Muthu et al. 2004). Enquanto isso, diversos estudos *in vivo*, como os realizados com ciclistas, também mostram que a capacidade de fagocitose está correlacionada positivamente com as concentrações plasmáticas de epinefrina (Ortega Rincon, Marchena et al. 2001).

A noradrenalina (10^{-9} M) também parece ter efeito anti-inflamatório *in vitro*, uma vez que diminui a eficiência da fagocitose de macrófagos através de receptores alfa e beta adrenérgicos (Gosain, Muthu et al. 2007) e suprime a produção de TNF- α em macrófagos estimulados por LPS (Hu, Goldmuntz et al. 1991). Interessantemente, concentrações mais baixas de noradrenalina são capazes de aumentar a produção de TNF- α (Spengler, Allen et al. 1990). Essa resposta variada às catecolaminas pode ser devida aos diferentes receptores adrenérgicos e suas afinidades pelos agonistas (Spengler, Chensue et al. 1994), mas ainda está pouco elucidada.

Enquanto o exercício estimula várias funções imunológicas dos macrófagos como quimiotaxia (Forner, Collazos et al. 1994; Ortega, Forner et al. 1997), aderência (Michna 1988), fagocitose (Fehr, Lotzerich et al. 1988; Fehr, Lotzerich et al. 1989; de la Fuente, Martin et al. 1990; Ortega, Collazos et al. 1992; Ortega, Forner et al. 1993; Forner, Barriga et al. 1996; Silveira, Rodrigues et al. 2007) e expressão de iNOS (Silveira, Rodrigues et al. 2007), o mesmo também é capaz de ativar o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA). O hipotálamo libera o hormônio liberador de corticotropina (CRH), que estimula a secreção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) pela hipófise e este, por sua vez, aumenta a liberação de cortisol pela medula adrenal. Essa via é influenciada pelo ritmo circadiano (Keller, Mazuch et al. 2009), estresse, retroalimentação e citocinas inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF- α . Um dos estresses que aumenta a liberação desses hormônios é o exercício físico prolongado: uma hora de exercício aeróbico seguida de exercício exaustivo causa a elevação dos níveis plasmáticos de CRH, de ACTH e, conseqüentemente, de cortisol (Inder, Hellemans et al. 1998).

O cortisol, principal glicocorticoide encontrado em humanos, é secretado pela medula adrenal e circula principalmente ligado a proteínas plasmáticas (globulinas ligantes de glicocorticoides). Os glicocorticoides

possuem funções no metabolismo de carboidratos, proteínas e gorduras, são críticos para funções do sistema nervoso central, dos sistemas digestivos, hematopoiéticos, renal e reprodutivo (Katzung 2004), e regulam o sistema imune. O cortisol, por ser um hormônio esteroide, possui receptores no meio intracelular (receptores de glicocorticoides - GR) e atua através de ligação ao DNA e regulação da transcrição gênica. Desse modo, o cortisol modula a ação de leucócitos, suprimindo a produção de citocinas e quimiocinas, inibindo a ativação do NF-kB e alterando o tempo de vida dessas células (Lu, Wardell et al. 2006; Silveira, Rodrigues et al. 2007).

O cortisol inibe a função e diferenciação de monócitos humanos (derivados da linhagem U937) em macrófagos, mesmo na presença de PMA (forbol-12-miristato acetato), um forte indutor deste (Baybutt and Holsboer 1990) e de vários outros processos através da ativação da proteína cinase C (PKC) (Blumberg 1980; McBane, Santerre et al. 2009), cuja atividade é necessária nos estágios iniciais da fagocitose (Heale and Speert 2001; Gopinath, Musa et al. 2006) e para a adesão de macrófagos (de la Fuente, Delgado et al. 1994). Estudos recentes mostram, ainda, que o cortisol não atua somente interferindo na transcrição gênica, mas também por vias não-genômicas, uma vez que a inibição da fagocitose de macrófagos pode ser observada em 15 minutos a partir da administração do hormônio *in vitro*. Roy e colaboradores sugerem que exista um receptor para cortisol tipo GR citoplasmático na membrana plasmática e que esse receptor faça a transdução do sinal do cortisol através da via monofosfato cíclico de adenosina (AMPC)/PKA (Roy and Rai 2009).

Apesar de o cortisol ser o hormônio mais conhecido do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), o CRH também atrai bastante atenção no que diz respeito à sua ação sobre o sistema imune. A função proposta para o CRH é a de imunossupressor indireto, pois este causa o aumento nos níveis plasmáticos de cortisol, hormônio imunossupressor. Entretanto, estudos *in vitro* e *in vivo* mostram que o CRH é capaz de aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α , IL-1 β e IL-6 no desafio com LPS (Agelaki, Tsatsanis et al. 2002), assim como é capaz de aumentar a atividade fagocítica de macrófagos de ratos (Huang Jian 2006) e a

produção de ânion superóxido (Koshida and Kotake 1994). Sugeriu-se então que o hormônio atuaria na fase aguda do estresse como imunoestimulador, enquanto seu produto indireto, o cortisol, faria a imunossupressão nos estágios mais tardios do mesmo. Esses estudos, entretanto, utilizam concentrações de CRH que variam de 10^{-9} M a 10^{-8} M, o que não é consistente com as concentrações encontradas *in vivo* (10^{-13} M) (Hashimoto, Nishioka et al. 1993). Sendo assim, ainda não se sabe exatamente o papel direto desse hormônio na função imunológica, até porque o CRH é encontrado também em diversos tecidos e pode ser produzido não somente pela glândula adrenal, mas também pelos próprios macrófagos (Baker, Richards et al. 2003). Além disso, a administração intracerebroventricular de CRH é capaz de aumentar a pressão arterial, a frequência cardíaca e as concentrações plasmáticas de adrenalina e noradrenalina, podendo influenciar o sistema imune por mais essa via (Korte, Bouws et al. 1993).

Fora os eixos adrenérgicos e o HHA, o exercício físico também pode influenciar o sistema imunológico através da histamina, uma amina com propriedades vasoativas e muito conhecida por seu papel determinante em reações alérgicas. O exercício causa o aumento das concentrações plasmáticas de histamina (Anderson, Bye et al. 1981), o que está associado à anafilaxia induzida pelo exercício (Silvers 1992; Terrell, Hough et al. 1996) e à hipotensão e síncope que ocorrem em atletas após o exercício devido à sua ação vasodilatadora (Halliwill 2006). Já foi sugerido que a liberação de histamina por basófilos pode ser dependente de hiperosmolaridade plasmática (Barg, Wolanczyk-Medrala et al. 2008), porém o mecanismo exato pelo qual o exercício físico causa a liberação de histamina ainda não está claro. Graham e colaboradores mostraram que administrações *in vivo* de adrenalina, noradrenalina, DOPA e dopamina, assim como o exercício, aumentam as concentrações de histamina no pulmão, pele e músculo esquelético de camundongos (Graham, Kahlson et al. 1964), sugerindo que o aumento das concentrações plasmáticas de catecolaminas durante o exercício físico também poderia causar o aumento na liberação de histamina. Por outro lado, a adrenalina também age revertendo alguns efeitos da histamina, tanto que injeções subcutâneas, intramusculares ou até intravenosas desse composto podem ser essenciais para reverter uma

reação anafilática. Entre os efeitos desejados da adrenalina nessa situação estão a vasoconstrição, levando à diminuição da hipotensão, e a broncodilatação (Gilman 2005).

A secreção de histamina é feita principalmente por mastócitos e basófilos, mas também pode ser produzida e secretada por macrófagos peritoneais através da enzima histidina descarboxilase (Oh, Suzuki et al. 1988). Essa histamina produzida pelos próprios macrófagos estimula a produção de IL-1 (pró-inflamatória) e esse efeito é bloqueado na presença de antagonistas de receptores H₂ (Okamoto and Nakano 1990). Contudo, alguns estudos mostram que a histamina exógena faz uma regulação negativa da atividade imunológica de macrófagos peritoneais, através da inibição da quimiotaxia, fagocitose, produção ERO, TNF- α e IL-12 (Azuma, Shinohara et al. 2001). De fato, a histamina é capaz de inibir a produção de IL-12 e levar células dendríticas a efetuarem respostas do tipo Th2 (Caron, Delneste et al. 2001), mas o efeito direto da histamina sobre a função imunológica de macrófagos parece ser dose-dependente. Concentrações baixas de histamina (aproximadamente 10⁻¹⁰ M) são capazes de aumentar a fagocitose (Csaba and Darvas 1992), causar a migração de macrófagos com maior capacidade fagocítica (Darvas, Madarasz et al. 1999; Schiess, Csaba et al. 2001), enquanto altas concentrações (10⁻⁷ M a 10⁻⁵ M) inibem a fagocitose (Azuma, Shinohara et al. 2001). Sendo que as concentrações fisiológicas de histamina não chegam a ultrapassar 10⁻⁸ M, o efeito imunossupressor da histamina parece ser biologicamente irrelevante quando comparado ao imunoestimulador.

Devido a essas divergências de resultados *in vitro* e *in vivo* e o impasse entre doses fisiológicas e farmacológicas de agonistas do eixo simpático-CRH periférico-histamina (SCH), o estudo da função imunológica inata permanece um desafio.

Um dos métodos mais utilizados para se avaliar a atividade imunológica de células da imunidade inata é a técnica de fagocitose. Para tanto, partículas de diferentes tipos podem ser colocadas em contato com macrófagos para serem fagocitadas. Entre elas encontram-se microesferas, partículas de látex, emulsões oleosas, eritrócitos de ovelhas (Griffin, Griffin

et al. 1975) e zimosan, derivado da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e, portanto, imunologicamente estranha.

Os macrófagos utilizados nesses estudos podem ser derivados de monócitos, de células-tronco retiradas da medula óssea do animal, oriundas de locais ricos em macrófagos, como o peritônio, ou mesmo derivadas de linhagens celulares, como a U937. Caso as células sejam provenientes do peritônio, pode-se estimular a migração de macrófagos para o local com a administração subcutânea ou intraperitoneal de adjuvantes que estimulam a imunidade celular. Um exemplo é o adjuvante de Freund composto por uma emulsão de óleo mineral em água que, em sua forma completa, carrega um antígeno de *Mycobacterium* inativado (geralmente *M. tuberculosis*) (Jensen, Savary et al. 1998).

Um passo decisivo, entretanto, para que ocorra a fagocitose das partículas é a opsonização das mesmas. O processo de opsonização facilita a ação do sistema imunológico por fixar opsoninas na superfície do patógeno ou antígeno para facilitar sua fagocitose (Abbas, Lichtman et al. 2007) ou simplesmente para bloquear sítios de interação importantes do mesmo com o organismo invadido. As principais opsoninas são constituintes do sistema complemento, um conjunto formado por mais de 20 proteínas (solúveis ou associadas à membrana plasmática) produzidas pelo fígado, fibroblastos e macrófagos. Os componentes do sistema complemento, quando ativados, possuem capacidade proteolítica capaz de ativar os próximos componentes da cascata. Esses componentes ativados possuem diversas funções imunomodulatórias como alteração da permeabilidade vascular, quimiotaxia de células do sistema fagocitário, relaxamento de músculo liso, degranulação de mastócitos e basófilos, vasodilatação, formação do complexo de ataque à membrana (que pode levar à lise celular) e opsonização de patógenos (Marder, Chenoweth et al. 1985; Schumacher, Fantone et al. 1991; Ehrnthaller, Ignatius et al. 2011).

O sistema complemento pode ser ativado pela via clássica, pela alternativa e pela via da lectina. Outras vias de ativação recém-descobertas ainda estão em estudo, mas apontam para a interação entre o sistema complemento e sistemas de proteases séricas e as vias de coagulação

(intrínseca e extrínseca) (Huber-Lang, Sarma et al. 2006; Amara, Rittirsch et al. 2008; Santizo, Zenteno et al. 2009). A via clássica pode ser iniciada pela adesão de anticorpos IgM ou IgG na superfície do patógeno ou pela presença de proteína C reativa (PCR), proteínas virais, amiloide, poliânions (DNA, RNA, LPS), fragmentos mitocondriais, células necróticas ou apoptóticas (Gewurz, Ying et al. 1993; Barrington, Zhang et al. 2001; Gasque 2004). A via alternativa também é ativada por sinais de perigo ao organismo, como PCR, bactérias, leveduras, células infectadas por vírus, proteína A, fator de veneno de cobra, polissacarídeos e dano tecidual, embora também possa ser iniciada por hidrólise espontânea de C3 (Gasque 2004; Thurman and Holers 2006; Ganter, Brohi et al. 2007). Já a via da lectina é ativada quando a lectina ligadora de manose (MBL, do inglês *mannose-binding lectin*) liga-se a patógenos que contêm manose em sua superfície (Matsushita, Thiel et al. 2000; Hajela, Kojima et al. 2002). Todas essas vias causam a clivagem de diversos componentes do sistema complemento, entre eles o C3 e o C5, cujos subprodutos C3b e C5b podem opsonizar o patógeno. A via clássica e da lectina causam ainda a hidrólise de C4 em C4a e C4b, que também atua como opsonina. A via final comum da ativação do sistema complemento inicia-se com a formação do complexo C5 convertase, que leva à formação do complexo de ataque à membrana (Ehrnthaller, Ignatius et al. 2011).

Depois de opsonizados, os patógenos podem ser carregados para o baço e fígado para serem eliminados. Isso é possível graças à presença do receptor de complemento 1 (CR1), que reconhece o C3b e o C4b, em eritrócitos. Outro receptor, o CR2, em linfócitos B, é capaz de reconhecer o C3d (fragmento do C3b) e causar a produção de anticorpos específicos e a diferenciação do linfócito em células B de memória. Já o CR3, também chamado de CD11b/CD18 ou Mac-1, está presente em neutrófilos, células NK (do inglês, *natural killer*) e macrófagos. CR3 é capaz de reconhecer patógenos opsonizados por C3b e causar a fagocitose e destruição dos mesmos (Arnaout 1990; Todd 1996; Vetvicka, Thornton et al. 1996).

Embora não se tivesse esses conhecimentos nem a observação de que partículas não opsonizadas não se ligam às células imunológicas

(Walter, Berlin et al. 1980), as técnicas de avaliação de atividade fagocítica *in vitro* começaram a ser desenhadas de modo que a partícula a ser fagocitada ficasse em contato com o sistema complemento (geralmente o soro de um animal) para ser opsonizada antes de se proceder ao ensaio de fagocitose propriamente dito. Isso ocorreu no momento em que os índices de fagocitose começaram a ser relacionados às opsoninas séricas (Simon 1907; Walker 1907). Ao contrário do esperado, porém, as técnicas de fagocitose geralmente privam os macrófagos de soro homólogo (e, conseqüentemente, do sistema complemento) durante os ensaios. A avaliação da fagocitose dá-se em meio de cultura (RPMI 1640, DMEM, entre outros) ou soluções salinas como PBS (tampão salina fosfato) ou HBSS (solução salina balanceada de Hank), as quais podem ser adicionadas de albumina bovina deslipidada, soro fetal bovino (inativado por calor) ou não recebem nenhum aditivo (Pugine, Faria et al. 2005; Brandt, de Castro et al. 2006; Córdova 2009; Fritzenwanger, Jung et al. 2011).

A partir dessas observações, a proposta do presente trabalho foi verificar a influência da suplementação dos meios de cultura com diferentes aditivos, incluindo soro homólogo contendo proteínas do sistema complemento, na fagocitose de zimosan e avaliar o papel dos principais componentes do eixo SCH em concentrações fisiológicas na função imunológica de macrófagos peritoneais de rato *in vitro*.

Artigo Científico

O presente trabalho será apresentado nas normas da revista *Immunology and Cell Biology*, Nature Publishing Group. Por ser parte de um trabalho de conclusão de curso da UFRGS e por apresentar resultados ainda parciais, entendemos adequado apresentar o texto em português. As normas da revista estão disponíveis em http://mts-icb.nature.com/cgi-bin/main.plex?form_type=display_auth_instructions.

Título: Papel do eixo simpático-CRH periférico-histamina na função imunológica de macrófagos de ratos

Título corrente: Papel do eixo SCH na função imunológica

Autores: Patrícia Renck Nunes; Paulo Ivo Homem de Bittencourt Júnior.

Endereço: Laboratório de Fisiologia celular; Departamento de Fisiologia; Instituto de Ciências Básicas da Saúde; Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Rua Sarmento Leite, número 500; 2º andar, laboratório 02. Porto Alegre, RS.

Telefone: (51) 3308-3151; fax: (51) 3308-4555; e-mail: fisiologia.celular@ufrgs.br.

Autor Correspondente: Patrícia Renck Nunes; Laboratório de Fisiologia celular; Departamento de Fisiologia; Instituto de Ciências Básicas da Saúde; Universidade Federal do Rio Grande do Sul; Rua Sarmento Leite, número 500; 2º andar, laboratório 02. Porto Alegre, RS.

Telefone: (51) 3308-3151; fax: (51) 3308-4555; e-mail: patriciarenck@gmail.com.

Resumo

Os componentes do eixo simpático-CRH (hormônio liberador de corticotropina) periférico-histamina atuam uns sobre os outros e podem influenciar de maneiras distintas o sistema imunológico tanto *in vivo* quanto *in vitro*, embora muitas vezes seus efeitos não sejam tão claros. Para avaliar o efeito da epinefrina, norepinefrina, histamina e CRH na imunidade inata *in vitro*, macrófagos peritoneais de ratos Wistar machos (200g – 250g, n=8) foram isolados e cultivados em contato com partículas de zimosan previamente opsonizadas por 30 minutos. Avaliamos o efeito dos componentes do eixo nas suas concentrações fisiológicas com ou sem o coestímulo do forbol-12- miristato acetato (PMA). O número de partículas fagocitadas por cada célula num total de 50 células foi contado em microscópio de contraste de fase em aumento de 640X. O efeito sobre a expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) foi verificado após 6 horas de cultura dos macrófagos em contato com os componentes estudados por Western blot. Todos os tratamentos foram capazes de aumentar a expressão de iNOS. Sobre a fagocitose, a epinefrina e a norepinefrina tiveram efeitos sinérgicos ao PMA, aumentando a fagocitose em 63% e 72%, respectivamente. A histamina também apresentou efeito sinérgico, embora menor (46% de aumento), enquanto que o CRH não alterou o índice de fagocitose do zimosan. O CRH parece ter influência somente em médio prazo sobre a atividade imunológica (expressão proteica) enquanto as catecolaminas e a histamina mostraram efeitos também em curto prazo (fagocitose).

Palavras-chave: CRH, epinefrina, fagocitose, histamina, macrófago, zimosan.

Introdução

O eixo simpático-CRH periférico-histamina (SCH) engloba componentes de diversas vias paralelas que influenciam umas às outras e têm o estresse como principal agente de integração. O estresse pode atuar no eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA), causando a secreção de CRH (hormônio liberador de corticotropina) pelo hipotálamo, o qual causa a liberação de cortisol tendo o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) hipofisário como intermediário (1). O CRH também pode aumentar as concentrações plasmáticas de catecolaminas (2), as quais, por sua vez, são capazes de elevar os níveis de histamina (3). Além disso, o estresse, seja ele psicológico ou físico (intoxicações, infecções, febre, exercício físico, por exemplo), pode, por si só, levar ao aumento dos níveis circulantes dessas substâncias (4, 5), as quais influenciam de maneiras distintas o sistema imunológico (figura 1).

O sistema imune de mamíferos pode ser classificado em inato e adquirido. O sistema imune adquirido, ou adaptativo, é constituído por linfócitos T e B e seus derivados (plasmócitos e anticorpos). O sistema imune inato é constituído pelas barreiras física do corpo, como a pele e mucosas, proteínas como o sistema complemento e lisozima, e células da linhagem mieloide, entre elas neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e macrófagos. Enquanto as células da imunidade adquirida atuam através da regulação do processo inflamatório, da produção de anticorpos específicos, da citotoxicidade e da formação de memória imunológica, o sistema imune inato atua primordialmente através da eliminação rápida e estereotipada dos patógenos através da fagocitose e do dano oxidativo (6).

Em tecidos normais, as células encarregadas de fagocitar partículas, sejam elas imunologicamente estranhas, sejam restos celulares oriundos da renovação normal dos tecidos, são os macrófagos residentes. Eles estão presentes normalmente em diversos tecidos, onde podem inclusive receber nomes específicos (osteoclastos no tecido ósseo, células de Küpffer no fígado), mas em situações de infecção ou inflamação local, monócitos podem ser recrutados do sangue, fazer diapedese e se diferenciar em macrófagos, auxiliando assim na resolução do processo inflamatório (6).

Enquanto *in vivo* o exercício físico tem efeito positivo sobre o sistema imunológico estimulando a quimiotaxia (7, 8), a aderência (9) e a fagocitose (10-16), diversos estudos que avaliam *in vitro* as principais substâncias liberadas na circulação durante o exercício mostram que elas têm efeitos muitas vezes opostos ao observado *in vivo*. É o caso de pesquisas que mostram que a histamina diminui a fagocitose (17), que a epinefrina diminui a produção de óxido nítrico (18), (19) e que a noradrenalina diminui a eficiência da fagocitose (20).

As divergências entre esses estudos podem estar nas concentrações utilizadas *in vitro* pelos autores, as quais superam consideravelmente as concentrações encontradas *in vivo* tanto em condições basais quanto em situações de estresse como o exercício, em que há um aumento nas concentrações plasmáticas de CRH (4), de histamina (21) e de catecolaminas (16).

A partir dessas observações e do fato de que concentrações exageradamente aumentadas de agonistas podem levar à ativação de receptores celulares pouco específicos (22), nosso trabalho visa mostrar os efeitos de concentrações fisiológicas de histamina, adrenalina, noradrenalina e CRH na função imunológica (fagocitose) de macrófagos peritoneais de ratos *in vitro*.

Resultados

Primeiramente, verificamos as condições ideais para a execução dos ensaios de fagocitose. Muitas técnicas utilizam somente soluções salinas (como HBSS) para a incubação das células, mesmo havendo meios de cultura específicos para leucócitos disponíveis que melhor suprem as necessidades metabólicas dos mesmos. Do mesmo modo, diferentes aditivos podem ser adicionados à cultura para estabilizar o mesmo. Os mais utilizados são a albumina deslipídada (AD) a 2% ou soro fetal bovino (SFB) a 10%. Sendo o ensaio de fagocitose extremamente dependente de componentes séricos (proteínas do sistema complemento) não encontrados na albumina nem no soro fetal bovino, o qual é previamente inativado por calor, verificamos também a utilização de soro coletado do rato de onde

foram extraídos os macrófagos peritoneais. Desse modo, preservamos as características proteicas do soro e evitamos reações imunes adversas que poderiam ocorrer se utilizássemos soro normal de outro animal. A utilização do soro homólogo também se justifica pelo fato de que, para serem fagocitadas, as partículas de zimosan são incubadas com esse mesmo soro a fim de serem opsonizadas. Esses ensaios também foram realizados na presença de PMA. A figura 2 mostra dois grupos representativos com diferentes atividades fagocíticas para ilustrar como foi feita a avaliação dos resultados.

Não foi observado aumento na capacidade fagocítica de células cultivadas em HBSS com PMA (um indutor de fagocitose e *burst* oxidativo (23)) quando comparadas ao seu controle (figura 3). Enquanto isso, as células cultivadas em meio específico para leucócitos responderam à presença de PMA com aumento na fagocitose. Cabe ressaltar que as células que apresentaram aumento mais expressivo foram aquelas incubadas com soro homólogo (SH) a 10%.

A partir desses resultados, os próximos ensaios foram realizados nas condições otimizadas para fagocitose, ou seja, meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SH.

Nos ensaios para avaliação da influência dos componentes do eixo SCH na fagocitose, todos os grupos, salvo o histamina, responderam à presença de PMA na cultura com o aumento na fagocitose de partículas de zimosan (figura 4). A adição de catecolaminas, histamina ou CRH à cultura não causou, por si só, o aumento na fagocitose. Por outro lado, a adição dessas substâncias concomitantemente com PMA teve efeito sinérgico nesse parâmetro, sendo que os maiores aumentos nos índices de fagocitose deram-se na presença de epinefrina (63%) e norepinefrina (72%), seguidas pela histamina (46%). O CRH diretamente não causou aumento significativo na fagocitose, embora sabe-se que sua liberação no organismo pode ter efeitos indiretos no sistema imune, através da modulação de outros hormônios do eixo SCH.

Quanto à expressão de iNOS, a forma induzível da enzima óxido nítrico sintase, observamos um aumento de expressão em todos os grupos, inclusive no tratado com CRH, após 6 horas de cultura (figura 5).

Discussão

Nossos resultados mostram que o uso de soro homólogo no ensaio de fagocitose, juntamente com o uso de meio de cultura específico para leucócitos (RPMI 1640), é capaz de facilitar a resposta normal dos macrófagos à presença de partículas de zimosan opsonizadas na cultura de células. Os primeiros ensaios de fagocitose, que datam do início do século XX, foram realizados em soluções salinas, como o HBSS, e as partículas a serem fagocitadas eram “sensibilizadas” antes dos ensaios (24). Essa sensibilização era feita incubando-se as partículas com soro normal, procedimento que, agora sabemos, levava à opsonização das mesmas. Os próximos incrementos na técnica acompanharam as mudanças nos procedimentos de cultura celular, com a suplementação dos meios de cultura com soro fetal bovino, o qual possuía importantes fatores para a manutenção e crescimento das células. Alternativamente, alguns autores utilizavam somente albumina nos ensaios de fagocitose para evitar a possível influência de outros componentes do soro nos resultados. A justificativa para o emprego da albumina, em vez da total exclusão de aditivos na técnica, eram suas propriedades antioxidantes, de estabilização de fluidos, de promoção de crescimento e de carregamento de ácidos graxos (25, 26). Como esses ácidos graxos poderiam influenciar as respostas em certos ensaios, alguns autores optaram por conduzir diversos ensaios em meios de cultura com albumina deslipidada, ou defatada. A intenção de minimizar interferências, entretanto, afastava cada vez mais os ensaios *in vitro* do *in vivo*.

Os meios de cultura comerciais também foram de grande importância para a manutenção de culturas de longo prazo e para mimetizar com maior veracidade o ambiente do qual as células provêm. Nossos resultados mostram que, independentemente do suplemento utilizado (albumina deslipidada, soro fetal bovino ou soro homólogo), todos os grupos de células

incubadas em RPMI 1640 responderam à presença de PMA no meio de cultura através do aumento da atividade fagocítica conforme esperado, o que não foi observado nos grupos incubados com HBSS. Nesse sentido, optamos por usar o meio de cultura RPMI 1640, específico para leucócitos, nos próximos ensaios de fagocitose. Esse meio, ao contrário das soluções salinas comumente empregadas, oferece aminoácidos, vitaminas e outros sais, permitindo às células executarem suas funções biológicas com bom desempenho (27).

Dentre os suplementos utilizados no meio RPMI 1640, aquele no qual as células foram capazes de responder melhor ao PMA foi o soro homólogo. Este soro, retirado do mesmo rato de origem dos macrófagos, foi o mesmo utilizado para opsonizar as partículas de zimosan, não sendo inativado por calor ou por proteases. Assim, o soro adicionado ao meio de cultura continha diversas proteínas necessárias para o processo de fagocitose não encontradas nos outros suplementos, entre elas o sistema complemento e imunoglobulinas inespecíficas (28), o que pode ter facilitado a resposta de fagocitose. Ainda não se sabe, entretanto, qual a via do sistema complemento está mais ativada nem qual a opsina mais relevante para a fagocitose do zimosan.

Estabelecidas as condições ótimas (RPMI 1640 suplementado com 10% de soro homólogo) e, concomitantemente, mais fisiológicas para a avaliação da atividade imunológica de fagocitose dos macrófagos, partimos para a avaliação da influência dos componentes do eixo SCH.

Sem a adição de PMA à cultura não houve diferença significativa nos índices de fagocitose quando da adição dos componentes do eixo SCH. É importante notar que, no organismo, os macrófagos estão cercados por diversas substâncias simultaneamente e sua resposta é uma soma de vários estímulos com ações sinérgicas ou antagônicas. Em nosso estudo, havia a influência somente de uma ou outra substância sobre os macrófagos, o que não foi suficiente para desencadear uma resposta imunológica aumentada.

O estímulo com PMA foi capaz de aumentar a fagocitose no grupo controle e nos tratados com epinefrina (40 nM), norepinefrina (14 nM) e CRH (30 pg/mL). Vale ressaltar que este é um composto sintético que foi usado em alta concentração justamente com o propósito de estimular a atividade

imunológica dos macrófagos, enquanto o mesmo não pode ser dito das outras substâncias testadas, compostos biológicos muitas vezes instáveis e utilizados em suas baixas concentrações fisiológicas.

Enquanto isso, a presença de histamina juntamente com o PMA não causou aumento na fagocitose em relação ao grupo tratado somente com histamina. Uma possível explicação para o fato é que tanto a histamina quanto o PMA causam a ativação da PKC δ através da fosforilação dessa enzima nos mesmos sítios (Tirosina³¹¹ e Treonina⁵⁰⁵) (29), sendo que esta via já pode ter sido saturada pela administração da histamina.

Mostramos também que a epinefrina, a norepinefrina e a histamina possuem efeitos sinérgicos ao PMA, aumentando os índices de fagocitose em relação ao grupo tratado somente com PMA. As catecolaminas foram as substâncias que causaram os maiores aumentos no índice de fagocitose (63% e 72% para epinefrina e norepinefrina, respectivamente), possivelmente por utilizarem vias de sinalização distintas do PMA. As catecolaminas ativam receptores adrenérgicos acoplados à proteína G, elevam as concentrações intracelulares de AMPc e ativam proteínas cinases A (PKA), podendo ainda ativar o NF-kB (16). Enquanto isso, o PMA liga-se a seus receptores citoplasmáticos, os quais se associam à proteína cinase C. A PKC, por sua vez, forma um complexo associado à membrana celular onde fosforila elementos localizados em sua proximidade, levando às respostas celulares associadas ao PMA (30).

Apesar de o grupo tratado com histamina e PMA não apresentar maior atividade fagocítica que o tratado somente com histamina, ele apresenta maior atividade em comparação com o controle tratado somente com PMA. Enquanto o PMA atua sobre a PKC, a histamina pode atuar também através de receptores H1, elevando as concentrações intracelulares de inositol 1,4,5-trifosfato 3 (IP3) através da ativação da enzima fosfolipase C. O IP3, por sua vez, causa o aumento das concentrações intracelulares de cálcio (Ca²⁺), o que pode explicar diversos efeitos da histamina nas células, como produção de óxido nítrico, acúmulo de AMPc (como o observado com as catecolaminas) e GMPc, e a ativação de fosfolipase A₂ e D (31). O mecanismo exato pelo qual a atividade dessas enzimas e as concentrações de moléculas de sinalização intracelulares, principalmente o AMPc, entram

em equilíbrio para ativar ou inibir o complexo processo de fagocitose permanece não elucidado.

O CRH, por sua vez, não aumentou a fagocitose de zimosan sozinho nem na presença de PMA. Entretanto, este hormônio pode influenciar indiretamente os outros componentes do eixo SCH e HHA e, assim, ter efeito *in vivo* sobre a fagocitose.

Outro modo de avaliação da atividade imunológica dos macrófagos é pela produção de espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio. O óxido nítrico (NO), além de vasodilatador e sinalizador intracelular, atua também como composto tóxico (em alta concentração) com ação antibactericida, antiparasitária e antiviral (32-34). O NO é produzido a partir da L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Essa enzima existe em diferentes isoformas, sendo que a presente em macrófagos classicamente ativados é a NOS-2 ou NOS induzível (iNOS) (35).

Após 6 horas de cultura dos macrófagos com epinefrina, norepinefrina, histamina e CRH, as células aumentaram seu imunoconteúdo de iNOS, indicando que essas substâncias não tem somente efeito imediato sobre a resposta imune dos macrófagos, como também um papel mais duradouro, aumentando a expressão de uma enzima importante para a função imune. O gene da iNOS possui dois sítios regulatórios: o IRF-1 (para interferon-gama) e outro para o fator de transcrição kB (NF-kB), o qual pode ser ativado diretamente pelas catecolaminas (16), pela histamina (36) e pelo CRH (37) devido às vias de sinalização intracelular que utilizam. Entretanto, não podemos descartar a possibilidade de que a transcrição de iNOS tenha sido aumentada indiretamente pela ação de citocinas produzidas pelos macrófagos em cultura em resposta aos componentes do eixo SCH, já que a transcrição dos genes da iNOS também pode ser ativada por citocinas pró-inflamatórias (35). O mesmo comentário pode ser feito para estudos *in vivo*, onde temos ainda mais interações e a presença de outras proteínas de estresse, como as proteínas de choque térmico, ativadoras do NF-kB.

Assim, a epinefrina, a norepinefrina e a histamina mostraram-se substâncias imunoestimulantes a curto (fagocitose) e a médio prazo (expressão de iNOS) para os macrófagos, enquanto o CRH apresentou somente efeito a médio prazo. Esses dados corroboram com observações *in*

vivo de que o estresse, como o exercício físico, aumenta os níveis circulantes dessas substâncias e é capaz de aumentar os índices de fagocitose. Enquanto isso, alguns estudos *in vitro* que utilizam concentrações farmacológicas dos componentes do eixo SCH podem estar fazendo observações que não condizem com o real ambiente ao qual os macrófagos estariam expostos justamente pela alta concentração das substâncias nesses estudos.

Materiais e Métodos

Animais

Foram utilizados 8 ratos Wistar machos pesando entre 200 g e 250 g que estavam aclimatados no biotério do Departamento de Farmacologia da UFRGS, com ciclo claro-escuro de 12 horas (8 a.m. - 8 p.m.) a 22 – 23 °C. Em todos os experimentos, os animais foram sacrificados por decapitação entre 8h05 e 8h15, para se evitar a influência dos ciclos hormonais endógenos aos animais.

Padronização da técnica de fagocitose

O rato (n=1) foi decapitado e teve o sangue coletado (6 mL). O sangue foi centrifugado por 5 minutos a 4050 x g e o soro foi separado para opsonização do zimosan. Os macrófagos peritoneais foram coletados injetando-se 20 mL de PBS (tampão salina fosfato) intraperitonealmente. Optou-se pela não utilização de adjuvantes para indução de quimiotaxia de macrófagos para a região, uma vez que essa estimulação poderia influenciar os resultados. O abdome foi massageado por 30 segundos para causar a liberação dos macrófagos no PBS. Procedeu-se à laparotomia para coleta do PBS contendo as células com pipeta Pasteur de plástico.

50 µL de zimosan (1 mg de proteína) marcado com vermelho neutro (para facilitar sua visualização ao microscópio) foram incubados por 30 minutos a 37°C sob agitação com o mesmo volume de soro do próprio rato para que houvesse a opsonização do zimosan (38). Em seguida, a solução foi lavada 3 vezes com PBS (centrifugando-se 30 segundos a 15.000 x g) e

o precipitado final foi ressuspensão em meio de cultura (RPMI 1640 ou *Hank's Balanced Salt Solution* – HBSS).

Os macrófagos peritoneais foram novamente centrifugados (5 minutos a 300 x g) e ressuspensos em meio de cultura (RPMI 1640) adicionado de 2% de albumina deslipidada (AD), 10 % de soro fetal bovino (SFB) ou 10% do soro homólogo (SH). Os macrófagos foram semeados em placas de 24 poços na densidade de 10^5 células por poço e deixados em estufa de CO₂ 5% a 37°C por 15 minutos para aderirem à superfície da placa. Aquelas células que seriam incubadas posteriormente com HBSS estavam em meio RPMI 1640 com 10% de SFB para adesão. O meio de cultura foi aspirado, e as células foram lavadas com PBS e receberam HBSS com 2% de albumina deslipidada, 10% de SFB ou 10% de soro homólogo (v/v).

Em seguida, adicionou-se forbol-12-miristato acetato (PMA, 200 nM) ou etanol (controle) às células, as quais foram incubadas em estufa por mais 15 minutos (tabela 1).

Adicionou-se a solução de zimosan (10% v/v) a todos os poços e incubou-se por 30 minutos para ocorrer a opsonização. A reação foi interrompida pela aspiração do meio e lavagem das células 3 vezes com PBS gelado. Ao final das lavagens, as células de cada poço são mantidas 0,5 mL de PBS gelado e a placa é mantida no gelo.

Cada grupo experimental foi avaliado em microscópio de inversão com aumento de 640X. Para tanto, contaram-se 50 células por grupo e o número de partículas fagocitadas por cada célula. Os resultados são expressos pelo índice de Hishikawa (39):

$$\text{Índice de Hishikawa} = (\text{Média do número de partículas fagocitadas por células}) \times (\text{proporção de células com partículas}) \times 100$$

Influência da epinefrina, norepinefrina, histamina e CRH na fagocitose

Todos os ensaios foram conduzidos com as células em meio RPMI 1640 adicionado de 10% de soro homólogo. Os macrófagos peritoneais isolados de ratos Wistar machos (n=7) foram deixados em estufa para adesão por 15 minutos, adicionou-se etanol ou PMA (200 nM) e/ou

epinefrina (40 nM (40)), norepinefrina (14 nM (40)), histamina (4,5 ng/mL (41)) ou CRH (30 pg/mL (42)) nas suas concentrações fisiológicas e as células foram incubadas por mais 15 minutos. Adicionou-se a solução de zimosan por 30 minutos, lavaram-se as células 3 vezes com PBS gelado e procedeu-se à avaliação da fagocitose conforme descrito acima. Os resultados do índice de Hishikawa foram normalizados dentro de cada experimento em relação ao grupo que apresentou menor atividade fagocítica.

Influência da epinefrina, norepinefrina, histamina e CRH na expressão de iNOS

Os macrófagos peritoneais (n=1) foram ressuspensos em meio de cultura RPMI 1640 com 10% de soro homólogo, semeados em placas de 6 poços (10^7 células por poço) e incubados por 15 minutos para adesão. Em seguida, adicionou-se epinefrina (40 nM (40)), norepinefrina (14 nM (40)), histamina (4,5 ng/mL (41)) ou CRH (30 pg/mL (42)). As células foram mantidas em estufa de CO₂ 5% a 37°C por 6 horas para que ocorresse a expressão das proteínas.

O meio de cultura foi descartado, as células foram retiradas da placa com raspador de borracha e homogeneizadas em sonicador na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) 0,1% e inibidores de proteases (2 µg/mL de leupeptina, 2 µg/mL de aprotinina, 20 µM de cloridrato de N-tosil-l-lisina clorometil cetona, 0,1 mM de fluoreto de fenil-metil sulfonila).

Dosou-se a concentração de proteína pelo método de Bradford (43), procedeu-se à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% para separação das proteínas e à eletrotransferência para uma membrana de nitrocelulose. Foi feita a técnica de Western blotting (44) no equipamento a vácuo *Snap* I.D. (Millipore). Brevemente, a membrana foi bloqueada com solução de bloqueio (leite em pó desnatado 0,5%), incubada (10 minutos) com um anticorpo primário anti-iNOS à diluição de 1:500 (sc-651 IgG de coelho), lavada, incubada com o anticorpo secundário (anti-IgG de coelho biotilado), lavada e incubada com streptavidina. O sinal é revelado com solução de luminol e ácido p-coumárico em sala escura e captado por uma

câmera VDS. Os resultados foram normalizados pela quantidade de β -actina (anticorpo Sigma A3854 1:10.000) e são expressos em unidades arbitrárias de iNOS.

Análise Estatística

Os dados de resposta à presença de PMA na cultura foram avaliados por teste-*t* de *Student* não pareado de duas vias. Comparações entre o efeito dos diferentes componentes do eixo simpático-CRH periférico-histamina e a influência do PMA foram realizadas através de ANOVA de duas vias seguida do teste *post-hoc* Newman-Keuls. Um *p* menor que 0,05 foi considerado significativo.

Agradecimentos

Agradecemos ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Hormônios das Mulheres, à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de São Paulo, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, à Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pelo suporte financeiro.

Referências

1. Guyton H. Tratado de Fisiologia Médica. 10th ed: Mc Graw-Hill; 2001.
2. Korte SM, Bouws GA, Bohus B. Central actions of corticotropin-releasing hormone (CRH) on behavioral, neuroendocrine, and cardiovascular regulation: brain corticoid receptor involvement. *Horm Behav.* 1993 Jun;27:167-83.
3. Graham P, Kahlson G, Rosengren E. Histamine Formation in Physical Exercise, Anoxia and under the Influence of Adrenaline and Related Substances. *J Physiol.* 1964 Aug;172:174-88.
4. Inder WJ, Hellemans J, Swanney MP, Prickett TC, Donald RA. Prolonged exercise increases peripheral plasma ACTH, CRH, and AVP in male athletes. *J Appl Physiol.* 1998 Sep;85:835-41.
5. Berkin KE, Walker G, Inglis GC, Ball SG, Thomson NC. Circulating adrenaline and noradrenaline concentrations during exercise in patients with exercise induced asthma and normal subjects. *Thorax.* 1988 Apr;43:295-9.
6. Goldsby TJKBAORA. *Kuby Immunology.* 6th ed2007.
7. Forner MA, Collazos ME, Barriga C, De la Fuente M, Rodriguez AB, Ortega E. Effect of age on adherence and chemotaxis capacities of peritoneal macrophages. Influence of physical activity stress. *Mech Ageing Dev.* 1994 Sep;75:179-89.
8. Ortega E, Forner MA, Barriga C. Exercise-induced stimulation of murine macrophage chemotaxis: role of corticosterone and prolactin as mediators. *J Physiol.* 1997 Feb 1;498:729-34.
9. Michna H. The human macrophage system: activity and functional morphology. *Bibl Anat.* 1988:1-84.
10. Forner MA, Barriga C, Ortega E. Exercise-induced stimulation of murine macrophage phagocytosis may be mediated by thyroxine. *J Appl Physiol.* 1996 Mar;80:899-903.
11. de la Fuente M, Martin MI, Ortega E. Changes in the phagocytic function of peritoneal macrophages from old mice after strenuous physical exercise. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 1990;13:189-98.
12. Fehr HG, Lotzerich H, Michna H. The influence of physical exercise on peritoneal macrophage functions: histochemical and phagocytic studies. *Int J Sports Med.* 1988 Feb;9:77-81.
13. Fehr HG, Lotzerich H, Michna H. Human macrophage function and physical exercise: phagocytic and histochemical studies. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1989;58:613-7.
14. Ortega E, Collazos ME, Barriga C, De la Fuente M. Stimulation of the phagocytic function in guinea pig peritoneal macrophages by physical activity stress. *Eur J Appl Physiol Occup Physiol.* 1992;64:323-7.
15. Ortega E, Forner MA, Barriga C, De la Fuente M. Effect of age and of swimming-induced stress on the phagocytic capacity of peritoneal macrophages from mice. *Mech Ageing Dev.* 1993 Aug 1;70:53-63.
16. Silveira EM, Rodrigues MF, Krause MS, Vianna DR, Almeida BS, Rossato JS, et al. Acute exercise stimulates macrophage function: possible role of NF-kappaB pathways. *Cell Biochem Funct.* 2007 Jan-Feb;25:63-73.
17. Azuma Y, Shinohara M, Wang PL, Hidaka A, Ohura K. Histamine inhibits chemotaxis, phagocytosis, superoxide anion production, and the production of TNFalpha and IL-12 by macrophages via H2-receptors. *Int Immunopharmacol.* 2001 Sep;1:1867-75.
18. Zinyama RB, Bancroft GJ, Sigola LB. Adrenaline suppression of the macrophage nitric oxide response to lipopolysaccharide is associated with differential regulation of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-10. *Immunology.* 2001 Dec;104:439-46.

19. Sigola LB, Zinyama RB. Adrenaline inhibits macrophage nitric oxide production through beta1 and beta2 adrenergic receptors. *Immunology*. 2000 Jul;100:359-63.
20. Gosain A, Muthu K, Gamelli RL, DiPietro LA. Norepinephrine suppresses wound macrophage phagocytic efficiency through alpha- and beta-adrenoreceptor dependent pathways. *Surgery*. 2007 Aug;142:170-9.
21. Anderson SD, Bye PT, Schoeffel RE, Seale JP, Taylor KM, Ferris L. Arterial plasma histamine levels at rest, and during and after exercise in patients with asthma: effects of terbutaline aerosol. *Thorax*. 1981 Apr;36:259-67.
22. David L. Nelson MMC. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 4th ed 2004.
23. Rossi S, Sa-Rocha VM, Kinoshita D, Genoy-Puerto A, Zwarg T, Werneck MR, et al. Flow cytometry as a tool in the evaluation of blood leukocyte function in *Chelonia mydas* (Linnaeus, 1758) (Testudines, Cheloniidae). *Braz J Biol*. 2009 Aug;69:899-905.
24. Walker RE. Observations on Phagocytosis in Relation to the Opsonic Index. *J Med Res*. 1907 Jul;16:521-6.
25. Roche M, Rondeau P, Singh NR, Tarnus E, Bourdon E. The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Lett*. 2008 Jun 11;582:1783-7.
26. Nilausen K. Role of fatty acids in growth-promoting effect of serum albumin on hamster cells in vitro. *J Cell Physiol*. 1978 Jul;96:1-14.
27. Moore GE, Gerner RE, Franklin HA. Culture of normal human leukocytes. *JAMA*. 1967 Feb 20;199:519-24.
28. Weir DM, Pinckard RN, Elson CJ, Suckling DE. Naturally occurring anti-tissue antibodies in rat sera. *Clin Exp Immunol*. 1966 Oct;1:433-42.
29. Mizuguchi H, Terao T, Kitai M, Ikeda M, Yoshimura Y, Das AK, et al. Involvement of Protein Kinase C δ /Extracellular Signal-regulated Kinase/Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 (PARP-1) Signaling Pathway in Histamine-induced Up-regulation of Histamine H1 Receptor Gene Expression in HeLa Cells. *J Biol Chem*. 2011 Sep 2;286:30542-51.
30. Nishihira J, O'Flaherty JT. Phorbol myristate acetate receptors in human polymorphonuclear neutrophils. *J Immunol*. 1985 Nov;135:3439-47.
31. Seifert R, Hoer A, Offermanns S, Buschauer A, Schunack W. Histamine increases cytosolic Ca²⁺ in dibutylryl-cAMP-differentiated HL-60 cells via H1 receptors and is an incomplete secretagogue. *Mol Pharmacol*. 1992 Aug;42:227-34.
32. Lowenstein CJ, Hill SL, Lafond-Walker A, Wu J, Allen G, Landavere M, et al. Nitric oxide inhibits viral replication in murine myocarditis. *J Clin Invest*. 1996 Apr 15;97:1837-43.
33. Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL, Sher A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *Eur J Immunol*. 1992 Oct;22:2501-6.
34. Feng HM, Walker DH. Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha exert their antirickettsial effect via induction of synthesis of nitric oxide. *Am J Pathol*. 1993 Oct;143:1016-23.
35. Wang Y, Marsden PA. Nitric oxide synthases: gene structure and regulation. *Adv Pharmacol*. 1995;34:71-90.
36. Minami T, Kuroishi T, Ozawa A, Shimauchi H, Endo Y, Sugawara S. Histamine amplifies immune response of gingival fibroblasts. *J Dent Res*. 2007 Nov;86:1083-8.
37. Zhao J, Karalis KP. Regulation of nuclear factor-kappaB by corticotropin-releasing hormone in mouse thymocytes. *Mol Endocrinol*. 2002 Nov;16:2561-70.
38. Burchill BR, Oliver JM, Pearson CB, Leinbach ED, Berlin RD. Microtubule dynamics and glutathione metabolism in phagocytizing human polymorphonuclear leukocytes. *J Cell Biol*. 1978 Feb;76:439-47.

39. Kurisu K, Hishikawa Y, Miura T, Kanno H, Okamoto E. Radiotherapy of postoperative residual tumor of bile duct carcinoma. *Radiat Med.* 1991 Mar-Apr;9:82-4.
40. Jin WL, Azuma K, Mita T, Goto H, Kanazawa A, Shimizu T, et al. Repetitive hypoglycaemia increases serum adrenaline and induces monocyte adhesion to the endothelium in rat thoracic aorta. *Diabetologia.* 2011 Apr 16.
41. Irman-Florjanc T, Stanovnik L. Tricyclic antidepressants change plasma histamine kinetics after its secretion induced by compound 48/80 in the rat. *Inflamm Res.* 1998;47 Suppl 1:S26-7.
42. Nunez H, Ruiz S, Soto-Moyano R, Navarrete M, Valladares L, White A, et al. Fetal undernutrition induces overexpression of CRH mRNA and CRH protein in hypothalamus and increases CRH and corticosterone in plasma during postnatal life in the rat. *Neurosci Lett.* 2008 Dec 19;448:115-9.
43. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976 May 7;72:248-54.
44. Burnette WN. "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem.* 1981 Apr;112:195-203.

Anexos do artigo científico

Legendas das Figuras

Figura 1: O estresse, aqui representado pelo exercício físico, causa aumento nas concentrações plasmáticas de CRH, catecolaminas e histamina e, ao mesmo tempo, é um potente indutor do processo de fagocitose. O CRH, por sua vez, também aumenta os níveis circulantes de catecolaminas e, essas últimas, aumentam os níveis de histamina, substâncias que participam do processo inflamatório. Entretanto, o CRH também eleva os níveis de ACTH e, indiretamente, de cortisol, que apresenta efeito inibitório sobre a fagocitose. Até o momento, entretanto, os efeitos diretos das catecolaminas, da histamina e do CRH sobre a fagocitose ainda não são bem compreendidos.

Figura 2: Fotos representativas da fagocitose de um grupo com baixa atividade (A, Controle) e de um com alta atividade fagocítica (B, Epinefrina com PMA). Flechas amarelas indicam partículas de zimosan não fagocitadas. Flechas pretas indicam macrófagos que não fagocitaram as partículas. * indica macrófagos com partículas fagocitadas.

Figura 3: Comparação entre diferentes meios de cultura (*HBSS – Hank's balanced salt solution* ou RPMI 1640) e aditivos (*AD- albumina deslipidada; SFB – soro fetal bovino; SH – soro homólogo; PMA - forbol-12-miristato acetato*) na atividade fagocítica de macrófagos peritoneais.

Figura 4: Comparação entre o efeito na capacidade fagocítica dos diferentes componentes do eixo HHA na presença e na ausência de PMA. Não houve diferença entre os grupos não estimulados concomitantemente com PMA. Naqueles estimulados com PMA, “a” é diferente dos grupos controle, “Norepinefrina”, “Histamina” e “CRH” ($p < 0,05$); “b” é diferente dos grupos controle e “CRH” ($p < 0,01$). * é diferente de seu respectivo grupo sem a adição de PMA ($p < 0,05$).

Figura 5: Expressão de iNOS por macrófagos peritoneais de ratos cultivados em estufa de CO₂ 5% a 37°C por 6h na presença ou ausência de

epinefrina (40 nM), norepinefrina (14 nM), histamina (4,5 ng/mL) ou CRH (30 pg/mL). Após a cultura, as células foram homogeneizadas em SDS 0,1% com inibidores de protease e o imunoconteúdo de iNOS foi avaliado através de eletroforese, eletrotransferência e Western blot com anticorpo primário anti-iNOS (sc-651).

Tabelas

Tabela 1: Esquema dos meios e complementos utilizados para padronização e otimização da técnica de fagocitose *in vitro*.

Meio de Cultura	HBSS						RPMI 1640					
Suplemento	2% AD		10% SFB		10% SH		2% AD		10% SFB		10% SH	
Aditivo	Etanol	PMA	Etanol	PMA	Etanol	PMA	Etanol	PMA	Etanol	PMA	Etanol	PMA

Figuras

Figura 1:

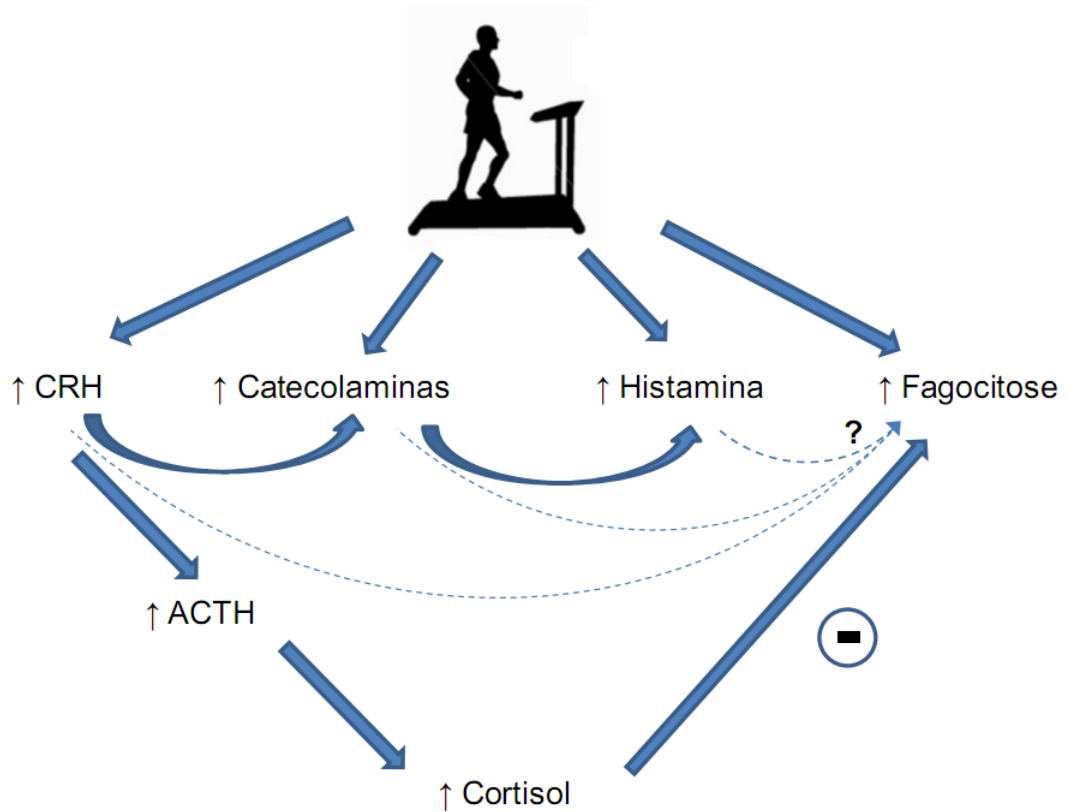


Figura 2:

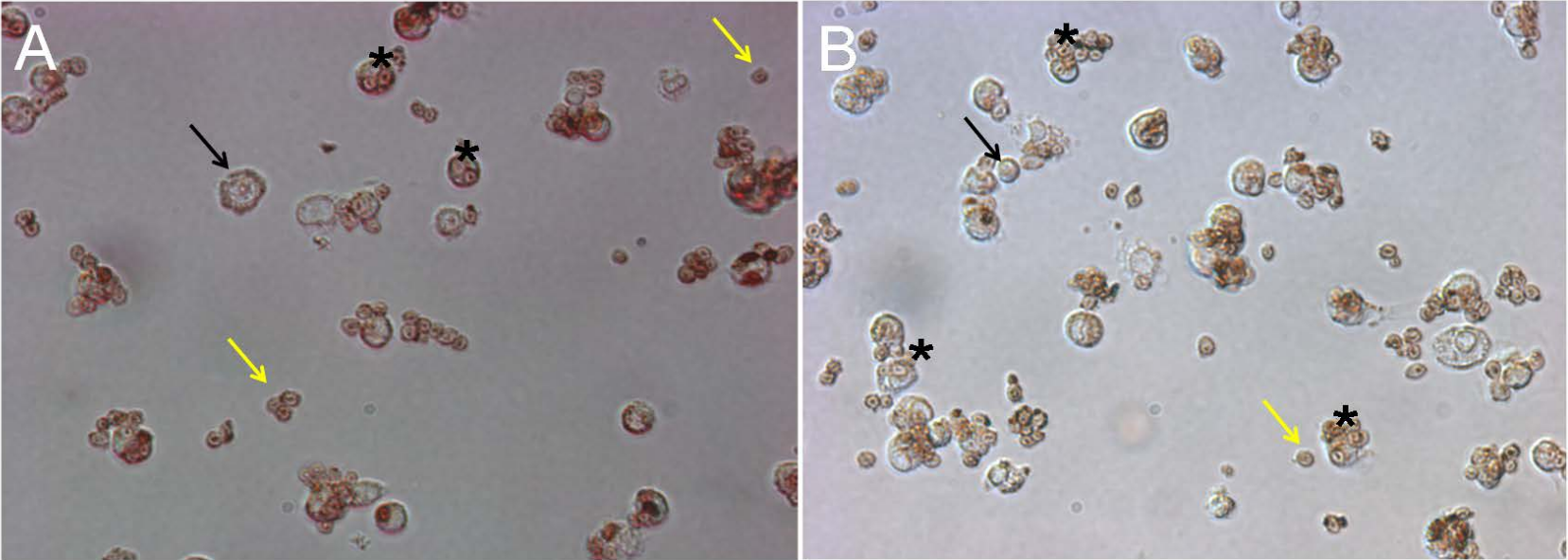


Figura 3:

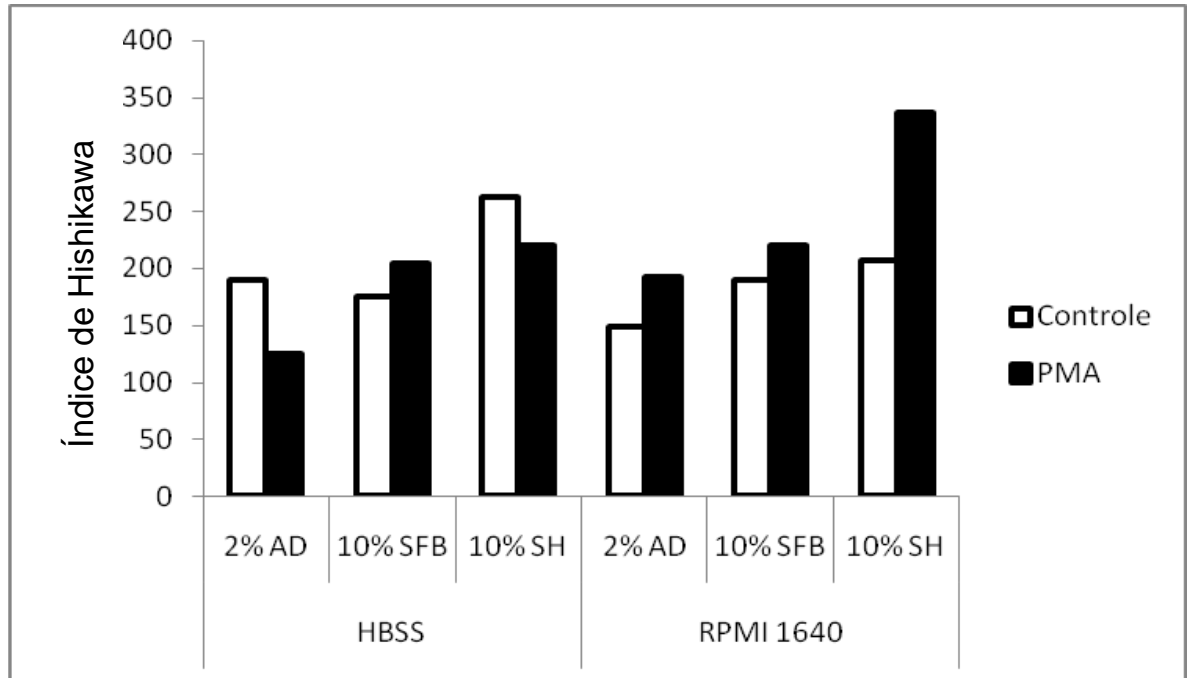


Figura 4:

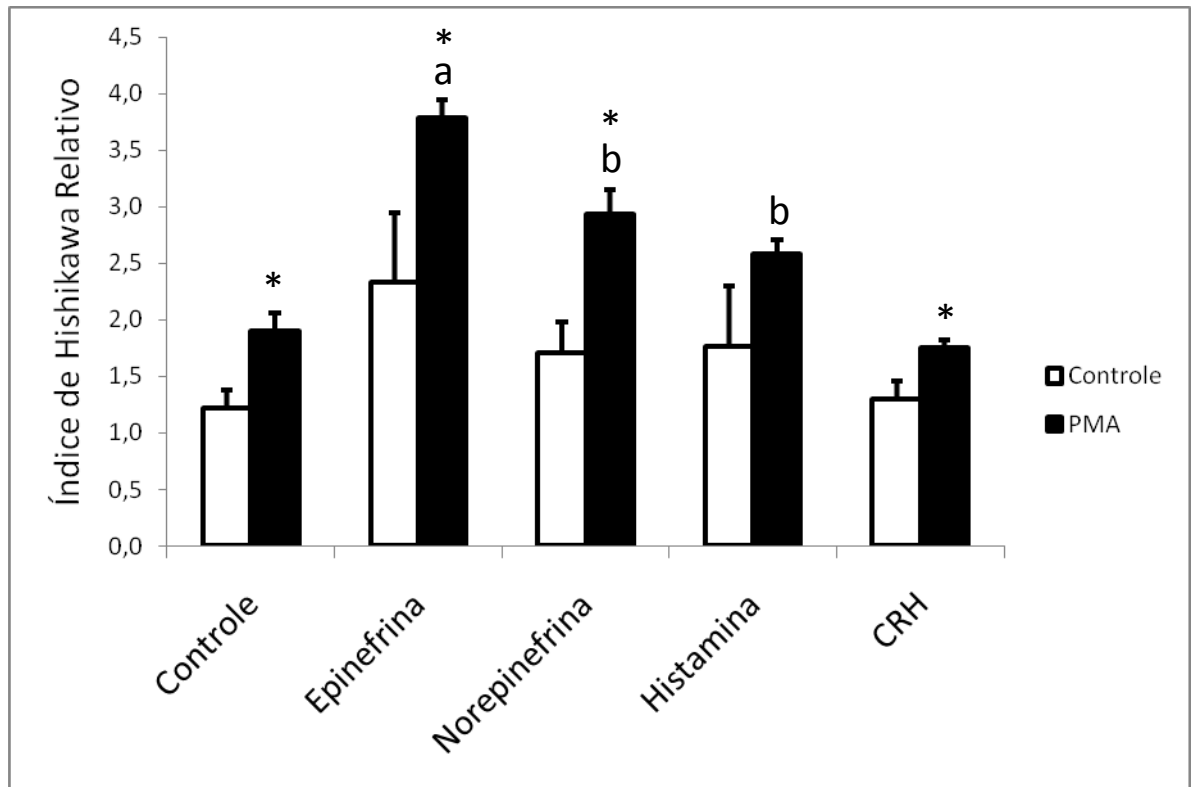
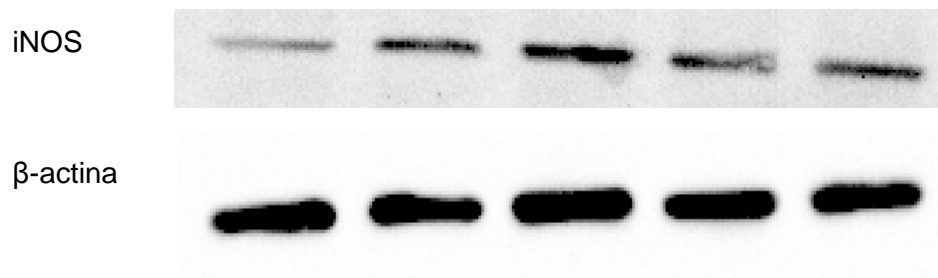
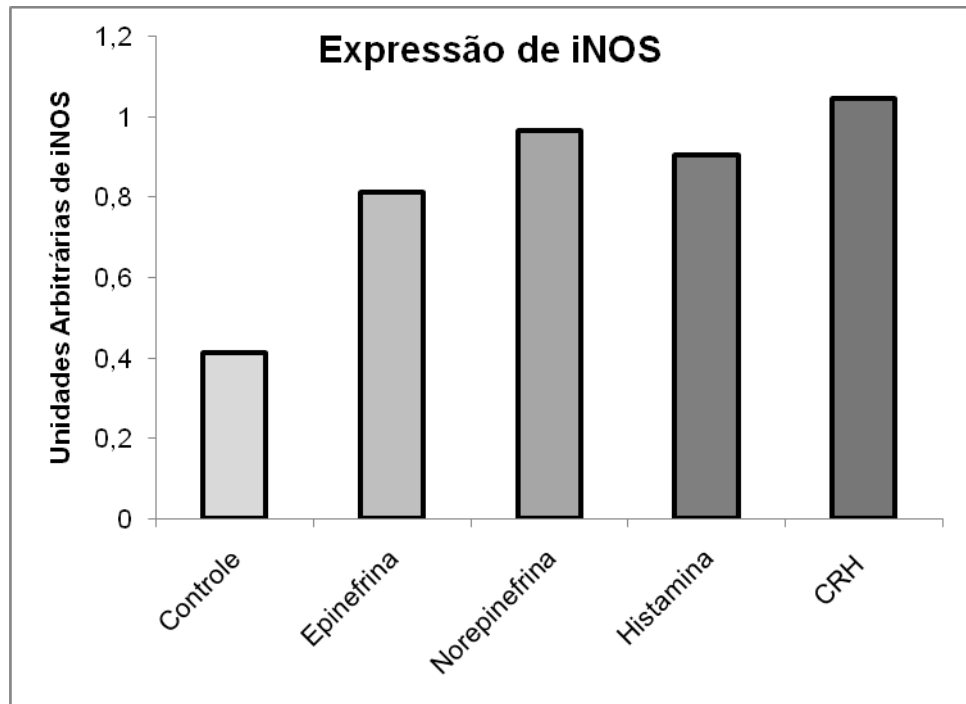


Figura 5:



Conclusões e Perspectivas

Em concentrações fisiológicas, os componentes do eixo SCH influenciam a resposta imune de macrófagos de ratos. A epinefrina, a norepinefrina e a histamina são capazes de aumentar a fagocitose de macrófagos estimulados por PMA assim como a expressão intracelular de iNOS. O CRH não influenciou a fagocitose das células, mas foi capaz de aumentar seu imunoconteúdo de iNOS.

Como o exercício físico aumenta as concentrações dessas substâncias e também aumenta os índices de fagocitose dos macrófagos, mostramos como os componentes do eixo SCH poderiam participar dessa resposta *in vivo*.

Nossas perspectivas são de continuar os trabalhos *in vitro* para verificação dos receptores celulares e as vias de sinalização responsáveis pelos efeitos observados, assim como iniciar estudos *in vivo* utilizando o exercício físico como ativador do eixo SCH.

Referências

- Abbas, A. K., A. H. Lichtman, et al. (2007). Cellular and molecular immunology. Philadelphia, Saunders Elsevier.
- Agelaki, S., C. Tsatsanis, Gravanis, A., Margioris, A. N. (2002). "Corticotropin-releasing hormone augments proinflammatory cytokine production from macrophages in vitro and in lipopolysaccharide-induced endotoxin shock in mice." Infect Immun **70**(11): 6068-6074.
- Amara, U., D. Rittirsch, Flierl, M., Bruckner, U., Klos, A., Gebhard, F., Lambris, J. D., Huber-Lang, M. (2008). "Interaction between the coagulation and complement system." Adv Exp Med Biol **632**: 71-79.
- Anderson, S. D., P. T. Bye, Schoeffel, R. E., Seale, J. P., Taylor, K. M., Ferris, L. (1981). "Arterial plasma histamine levels at rest, and during and after exercise in patients with asthma: effects of terbutaline aerosol." Thorax **36**(4): 259-267.
- Arnaut, M. A. (1990). "Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18." Blood **75**(5): 1037-1050.
- Asea, A., M. Rehli, Kabingu, E., Boch, J. A., Bare, O., Auron, P. E., Stevenson, M. A., Calderwood, S. K. (2002). "Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4." J Biol Chem **277**(17): 15028-15034.
- Azuma, Y., M. Shinohara, Wang, P. L., Hidaka, A., Ohura, K. (2001). "Histamine inhibits chemotaxis, phagocytosis, superoxide anion production, and the production of TNFalpha and IL-12 by macrophages via H2-receptors." Int Immunopharmacol **1**(9-10): 1867-1875.
- Baker, C., L. J. Richards, Dayan, C. M., Jessop, D. S. (2003). "Corticotropin-releasing hormone immunoreactivity in human T and B cells and macrophages: colocalization with arginine vasopressin." J Neuroendocrinol **15**(11): 1070-1074.
- Barg, W., A. Wolanczyk-Medrala, Obojski, A., Wytrychowski, K., Panaszek, B., Medrala, W. (2008). "Food-dependent exercise-induced anaphylaxis: possible impact of increased basophil histamine releasability in hyperosmolar conditions." J Investig Allergol Clin Immunol **18**(4): 312-315.
- Barrington, R., M. Zhang, Fischer, M., Carroll, M. C. (2001). "The role of complement in inflammation and adaptive immunity." Immunol Rev **180**: 5-15.
- Baybutt, H. N. and F. Holsboer (1990). "Inhibition of macrophage differentiation and function by cortisol." Endocrinology **127**(1): 476-480.
- Berkin, K. E., G. Walker, Inglis, G. C., Ball, S. G., Thomson, N. C. (1988). "Circulating adrenaline and noradrenaline concentrations during exercise in patients with exercise induced asthma and normal subjects." Thorax **43**(4): 295-299.
- Blumberg, P. M. (1980). "In vitro studies on the mode of action of the phorbol esters, potent tumor promoters: part 1." Crit Rev Toxicol **8**(2): 153-197.

- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Brandt, C. T., C. M. de Castro, de Lavor, S. M., de Castro, F. M. (2006). "[Phagocytes rate and cellular viability of the monocytes in patients with hepatosplenic schistosomiasis mansoni who underwent splenectomy and auto-implantation of spleen tissue]." Rev Soc Bras Med Trop **39**(5): 439-445.
- Burchill, B. R., J. M. Oliver, Pearson, C. B., Leinbach, E. D., Berlin, R. D. (1978). "Microtubule dynamics and glutathione metabolism in phagocytizing human polymorphonuclear leukocytes." J Cell Biol **76**(2): 439-447.
- Burnette, W. N. (1981). "'Western blotting': electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A." Anal Biochem **112**(2): 195-203.
- Caron, G., Y. Delneste, Roelandts, E., Duez, C., Bonnefoy, J. Y., Pestel, J. Jeannin, P. (2001). "Histamine polarizes human dendritic cells into Th2 cell-promoting effector dendritic cells." J Immunol **167**(7): 3682-3686.
- Bombarda, J.; Melo, J. C., de Souza, E. R., Nóbrega, O. T., Córdova, C. (2009). "Exercício abaixo do limiar anaeróbio aumenta as atividades fagocítica e microbicida de neutrófilos em ratos Wistar." Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.
- Csaba, G. and Z. Darvas (1992). "Insulin antagonizes the phagocytosis stimulating action of histamine in Tetrahymena." Biosci Rep **12**(1): 23-27.
- Darvas, Z., B. Madarasz, Laszlo, V. (1999). "Study of histamine effects on phagocytosis and enzyme secretion of Tetrahymena pyriformis." Acta Biol Hung **50**(4): 325-334.
- David L. Nelson, M. M. C. (2004). Lehninger Principles of Biochemistry.
- de la Fuente, M., M. Delgado, et al. (1994). "Vasoactive intestinal peptide modulation of adherence and mobility in rat peritoneal lymphocytes and macrophages." Peptides **15**(7): 1157-1163.
- de la Fuente, M., M. I. Martin, Ortega, E. (1990). "Changes in the phagocytic function of peritoneal macrophages from old mice after strenuous physical exercise." Comp Immunol Microbiol Infect Dis **13**(4): 189-198.
- De Stefano, D., M. C. Maiuri, Iovine, B., Ialenti, A., Bevilacqua, M. A., Carnuccio, R. (2006). "The role of NF-kappaB, IRF-1, and STAT-1alpha transcription factors in the iNOS gene induction by gliadin and IFN-gamma in RAW 264.7 macrophages." J Mol Med (Berl) **84**(1): 65-74.
- Deng, J., K. Muthu, Gamelli, R., Shankar, R., Jones, S. B. (2004). "Adrenergic modulation of splenic macrophage cytokine release in polymicrobial sepsis." Am J Physiol Cell Physiol **287**(3): C730-736.
- Droge, W., K. Schulze-Osthoff, Burke, R. E., Mihm, S., Galter, D., Schenk, H., Eck, H. P., Roth, S., Gmunder, H. (1994). "Functions of glutathione and glutathione disulfide in immunology and immunopathology." FASEB J **8**(14): 1131-1138.

- Ehrnthaller, C., A. Ignatius, Gebhard, F., Huber-Lang, M. (2011). "New insights of an old defense system: structure, function, and clinical relevance of the complement system." Mol Med **17**(3-4): 317-329.
- Febbraio, M. A., P. Ott, Nielsen, H. B., Steensberg, A., Keller, C., Krstrup, P., Secher, N. H., Pedersen, B. K. (2002). "Exercise induces hepatosplanchnic release of heat shock protein 72 in humans." J Physiol **544**(Pt 3): 957-962.
- Fehr, H. G., H. Lotzerich, Michna, H. (1988). "The influence of physical exercise on peritoneal macrophage functions: histochemical and phagocytic studies." Int J Sports Med **9**(1): 77-81.
- Fehr, H. G., H. Lotzerich, Michna, H. (1989). "Human macrophage function and physical exercise: phagocytic and histochemical studies." Eur J Appl Physiol Occup Physiol **58**(6): 613-617.
- Feinstein, D. L., E. Galea, Aquino, D. A., Li, G. C., Xu, H., Reis, D. J. (1996). "Heat shock protein 70 suppresses astroglial-inducible nitric-oxide synthase expression by decreasing NFkappaB activation." J Biol Chem **271**(30): 17724-17732.
- Feng, H. M. and D. H. Walker (1993). "Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha exert their antirickettsial effect via induction of synthesis of nitric oxide." Am J Pathol **143**(4): 1016-1023.
- Forner, M. A., C. Barriga, Ortega, E. (1996). "Exercise-induced stimulation of murine macrophage phagocytosis may be mediated by thyroxine." J Appl Physiol **80**(3): 899-903.
- Forner, M. A., M. E. Collazos, Barriga, C., De la Fuente, M., Rodriguez, A. B., Ortega, E. (1994). "Effect of age on adherence and chemotaxis capacities of peritoneal macrophages. Influence of physical activity stress." Mech Ageing Dev **75**(3): 179-189.
- Fritzenwanger, M., C. Jung, Goebel, B., Lauten, A., Figulla, H. R. (2011). "Impact of short-term systemic hypoxia on phagocytosis, cytokine production, and transcription factor activation in peripheral blood cells." Mediators Inflamm **2011**: 429501.
- Ganter, M. T., K. Brohi, Cohen, M. J., Shaffer, L. A., Walsh, M. C., Stahl, G. L., Pittet, J. F. (2007). "Role of the alternative pathway in the early complement activation following major trauma." Shock **28**(1): 29-34.
- Gasque, P. (2004). "Complement: a unique innate immune sensor for danger signals." Mol Immunol **41**(11): 1089-1098.
- Gazzinelli, R. T., I. P. Oswald, Hieny, S., James, S. L., Sher, A. (1992). "The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta." Eur J Immunol **22**(10): 2501-2506.
- Gewurz, H., S. C. Ying, Jiang, H., Lint, T. F. (1993). "Nonimmune activation of the classical complement pathway." Behring Inst Mitt(93): 138-147.
- Gilman, A. G. (2005). As Bases Farmacológicas da Terapêutica. Rio de Janeiro, Mcgraw-hill.
- Goldsby, T. J. K. B. A. O. R. A. (2007). Kuby Immunology.
- Gopinath, V. K., M. Musa, Samsudin, A. R., Sosroseno, W. (2006). "Role of protein kinase C in hydroxyapatite- induced phagocytosis by a murine macrophage cell line (RAW264.7)." Immunopharmacol Immunotoxicol **28**(3): 485-489.

- Gosain, A., K. Muthu, Gamelli, R. L., DiPietro, L. A. (2007). "Norepinephrine suppresses wound macrophage phagocytic efficiency through alpha- and beta-adrenoreceptor dependent pathways." Surgery **142**(2): 170-179.
- Graham, P., G. Kahlson, Rosengren, E. (1964). "Histamine Formation in Physical Exercise, Anoxia and under the Influence of Adrenaline and Related Substances." J Physiol **172**: 174-188.
- Griffin, F. M., Jr., J. A. Griffin, Leider, J. E., Silverstein, S. C. (1975). "Studies on the mechanism of phagocytosis. I. Requirements for circumferential attachment of particle-bound ligands to specific receptors on the macrophage plasma membrane." J Exp Med **142**(5): 1263-1282.
- Guyton, H. (2001). Tratado de Fisiologia Médica, Mc Graw-Hill.
- Hajela, K., M. Kojima, Ambrus, G., Wong, K. H., Moffatt, B. E., Ferluga, J., Hajela, S., Gal, P., Sim, R. B. (2002). "The biological functions of MBL-associated serine proteases (MASPs)." Immunobiology **205**(4-5): 467-475.
- Halliwill, J. (2006). "Histamine tied to changes in blood pressure during exercise-recovery period." 2011.
- Hashimoto, K., T. Nishioka, Numata, Y., Ogasa, T., Kageyama, J., Suemaru, S. (1993). "Plasma levels of corticotropin-releasing hormone in hypothalamic-pituitary-adrenal disorders and chronic renal failure." Acta Endocrinol (Copenh) **128**(6): 503-507.
- Heale, J. P. and D. P. Speert (2001). "Protein kinase C agonists enhance phagocytosis of *P. aeruginosa* by murine alveolar macrophages." J Leukoc Biol **69**(1): 158-160.
- Hu, X. X., E. A. Goldmuntz, Brosnan, C. F. (1991). "The effect of norepinephrine on endotoxin-mediated macrophage activation." J Neuroimmunol **31**(1): 35-42.
- Huang Jian, Q. H.-I., HUANG Xian-kai, et al (2006). "Effect of CRH on phagocytosis of rat enterocoelia macrophage." Trauma Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, China.
- Huber-Lang, M., J. V. Sarma, Zetoune, F. S., Rittirsch, D., Neff, T. A., McGuire, S. R., Lambris, J. D., Warner, R. L., Flierl, M. A., Hoesel, L. M., Gebhard, F., Younger, J. G., Drouin, S. M., Wetsel, R. A., Ward, P. A. (2006). "Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway." Nat Med **12**(6): 682-687.
- Inder, W. J., J. Hellems, Swanney, M. P., Prickett, T. C., Donald, R. A. (1998). "Prolonged exercise increases peripheral plasma ACTH, CRH, and AVP in male athletes." J Appl Physiol **85**(3): 835-841.
- Irman-Florjanc, T. and L. Stanovnik (1998). "Tricyclic antidepressants change plasma histamine kinetics after its secretion induced by compound 48/80 in the rat." Inflamm Res **47 Suppl 1**: S26-27.
- Jensen, F. C., J. R. Savary, Diveley, J. P., Chang, J. C. (1998). "Adjuvant activity of incomplete Freund's adjuvant." Adv Drug Deliv Rev **32**(3): 173-186.
- Jin, W. L., K. Azuma, Mita, T., Goto, H., Kanazawa, A., Shimizu, T., Ikeda, F., Fujitani, Y., Hirose, T., Kawamori, R., Watada, H. (2011). "Repetitive hypoglycaemia increases serum adrenaline and induces monocyte adhesion to the endothelium in rat thoracic aorta." Diabetologia.

- Katzung, B. (2004). Basic and Clinical Pharmacology. New York, McGraw-Hill.
- Keller, M., J. Mazuch, Abraham, U., Eom, G. D., Herzog, E. D., Volk, H. D., Kramer, A., Maier, B. (2009). "A circadian clock in macrophages controls inflammatory immune responses." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(50): 21407-21412.
- Korte, S. M., G. A. Bouws, Bohus, B. (1993). "Central actions of corticotropin-releasing hormone (CRH) on behavioral, neuroendocrine, and cardiovascular regulation: brain corticoid receptor involvement." Horm Behav **27**(2): 167-183.
- Koshida, H. and Y. Kotake (1994). "Corticotropin-releasing hormone enhances the superoxide anion production of rabbit peritoneal macrophages stimulated with N-formyl-methionyl-leucyl-phenylalanine." Life Sci **54**(8): 539-543.
- Kurusu, K., Y. Hishikawa, Miura, T., Kanno, H., Okamoto, E. (1991). "Radiotherapy of postoperative residual tumor of bile duct carcinoma." Radiat Med **9**(2): 82-84.
- Lowenstein, C. J., S. L. Hill, Lafond-Walker, A., Wu, J., Allen, G., Landavere, M., Rose, N. R., Herskowitz, A. (1996). "Nitric oxide inhibits viral replication in murine myocarditis." J Clin Invest **97**(8): 1837-1843.
- Lu, N. Z., S. E. Wardell, Burnstein, K. L., Defranco, D., Fuller, P. J., Giguere, V., Hochberg, R. B., McKay, L., Renoir, J. M., Weigel, N. L., Wilson, E. M., McDonnell, D. P., Cidlowski, J. A. (2006). "International Union of Pharmacology. LXV. The pharmacology and classification of the nuclear receptor superfamily: glucocorticoid, mineralocorticoid, progesterone, and androgen receptors." Pharmacol Rev **58**(4): 782-797.
- Marder, S. R., D. E. Chenoweth, Goldstein, I. M., Perez, H. D. (1985). "Chemotactic responses of human peripheral blood monocytes to the complement-derived peptides C5a and C5a des Arg." J Immunol **134**(5): 3325-3331.
- Matsushita, M., S. Thiel, Jensenius, J. C., Terai, I., Fujita, T. (2000). "Proteolytic activities of two types of mannose-binding lectin-associated serine protease." J Immunol **165**(5): 2637-2642.
- McBane, J. E., J. P. Santerre, Labow, R. (2009). "Effect of phorbol esters on the macrophage-mediated biodegradation of polyurethanes via protein kinase C activation and other pathways." J Biomater Sci Polym Ed **20**(4): 437-453.
- Michna, H. (1988). "The human macrophage system: activity and functional morphology." Bibl Anat(31): 1-84.
- Minami, T., T. Kuroishi, Ozawa, A., Shimauchi, H., Endo, Y., Sugawara, S. (2007). "Histamine amplifies immune response of gingival fibroblasts." J Dent Res **86**(11): 1083-1088.
- Mizuguchi, H., T. Terao, Kitai, M., Ikeda, M., Yoshimura, Y., Das, A. K., Kitamura, Y., Takeda, N., Fukui, H. (2011). "Involvement of Protein Kinase C δ /Extracellular Signal-regulated Kinase/Poly(ADP-ribose) Polymerase-1 (PARP-1) Signaling Pathway in Histamine-induced Up-regulation of Histamine H1 Receptor Gene Expression in HeLa Cells." J Biol Chem **286**(35): 30542-30551.

- Moore, G. E., R. E. Gerner, Franklin, H. A. (1967). "Culture of normal human leukocytes." JAMA **199**(8): 519-524.
- Niess, A. M., H. H. Dickhuth, Northoff, H., Fehrenbach, E. (1999). "Free radicals and oxidative stress in exercise--immunological aspects." Exerc Immunol Rev **5**: 22-56.
- Nilausen, K. (1978). "Role of fatty acids in growth-promoting effect of serum albumin on hamster cells in vitro." J Cell Physiol **96**(1): 1-14.
- Nishihira, J. and J. T. O'Flaherty (1985). "Phorbol myristate acetate receptors in human polymorphonuclear neutrophils." J Immunol **135**(5): 3439-3447.
- Nunez, H., S. Ruiz, Soto-Moyano, R., Navarrete, M., Valladares, L., White, A., Perez, H. (2008). "Fetal undernutrition induces overexpression of CRH mRNA and CRH protein in hypothalamus and increases CRH and corticosterone in plasma during postnatal life in the rat." Neurosci Lett **448**(1): 115-119.
- Oh, C., S. Suzuki, Nakashima, I., Yamashita, K., Nakano, K. (1988). "Histamine synthesis by non-mast cells through mitogen-dependent induction of histidine decarboxylase." Immunology **65**(1): 143-148.
- Okamoto, H. and K. Nakano (1990). "Regulation of interleukin-1 synthesis by histamine produced by mouse peritoneal macrophages per se." Immunology **69**(1): 162-165.
- Ortega, E., M. E. Collazos, Barriga, C., De la Fuente, M. (1992). "Stimulation of the phagocytic function in guinea pig peritoneal macrophages by physical activity stress." Eur J Appl Physiol Occup Physiol **64**(4): 323-327.
- Ortega, E., M. A. Forner, Barriga, C. (1997). "Exercise-induced stimulation of murine macrophage chemotaxis: role of corticosterone and prolactin as mediators." J Physiol **498 (Pt 3)**: 729-734.
- Ortega, E., M. A. Forner, Barriga, C., De la Fuente, M. (1993). "Effect of age and of swimming-induced stress on the phagocytic capacity of peritoneal macrophages from mice." Mech Ageing Dev **70**(1-2): 53-63.
- Ortega Rincon, E., J. M. Marchena, Garcia, J. J., Schmidt, A., Schulz, T., Malpica, I., Rodriguez, A. B., Barriga, C., Michna, H., Lotzerich, H. (2001). "Phagocytic function in cyclists: correlation with catecholamines and cortisol." J Appl Physiol **91**(3): 1067-1072.
- Pedersen, B. K., T. Rohde, Ostrowski, K. (1998). "Recovery of the immune system after exercise." Acta Physiol Scand **162**(3): 325-332.
- Pugine, S. M., M. F. Faria, Maia, A. A., Valle, C. R., Boschini, C., Poleti, M. D., Silva, M. R., De Melo, M. P. (2005). "Effect of Cysticercus cellulosae fractions on the respiratory burst of pig neutrophils." Rev Inst Med Trop Sao Paulo **47**(2): 91-94.
- Roche, M., P. Rondeau, Singh, N. R., Tarnus, E., Bourdon, E. (2008). "The antioxidant properties of serum albumin." FEBS Lett **582**(13): 1783-1787.
- Rossi, A., G. Elia, Santoro, M. G. (1997). "Inhibition of nuclear factor kappa B by prostaglandin A1: an effect associated with heat shock transcription factor activation." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(2): 746-750.
- Rossi, S., V. M. Sa-Rocha, Kinoshita, D., Genoy-Puerto, A., Zwarg, T., Werneck, M. R., Sa-Rocha, L. C., Matushima, E. R. (2009). "Flow cytometry as a tool in the evaluation of blood leukocyte function in

- Chelonia mydas (Linnaeus, 1758) (Testudines, Cheloniidae)." Braz J Biol **69**(3): 899-905.
- Roy, B. and U. Rai (2009). "Genomic and non-genomic effect of cortisol on phagocytosis in freshwater teleost Channa punctatus: an in vitro study." Steroids **74**(4-5): 449-455.
- Santizo, F., E. Zenteno, Pina-Canseco, S., Hernandez-Cruz, P., Cruz, M. M., Mayoral, L. P., Perez-Campos, E., Martinez-Cruz, R. (2009). "Lectin activity of the coagulation factor VIII/von Willebrand complex." Tohoku J Exp Med **217**(3): 209-215.
- Schiess, N., G. Csaba, Kohidai, L. (2001). "Chemotactic selection with insulin, di-iodotyrosine and histamine alters the phagocytotic responsiveness of Tetrahymena." Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol **128**(4): 521-530.
- Schumacher, W. A., J. C. Fantone, Kunkel, S. E., Webb, R. C., Lucchesi, B. R. (1991). "The anaphylatoxins C3a and C5a are vasodilators in the canine coronary vasculature in vitro and in vivo." Agents Actions **34**(3-4): 345-349.
- Seifert, R., A. Hoer, Offermanns, S., Buschauer, A., Schunack, W. (1992). "Histamine increases cytosolic Ca²⁺ in dibutyryl-cAMP-differentiated HL-60 cells via H1 receptors and is an incomplete secretagogue." Mol Pharmacol **42**(2): 227-234.
- Sigola, L. B. and R. B. Zinyama (2000). "Adrenaline inhibits macrophage nitric oxide production through beta1 and beta2 adrenergic receptors." Immunology **100**(3): 359-363.
- Silveira, E. M., M. F. Rodrigues, Krause, M. S., Vianna, D. R., Almeida, B. S., Rossato, J. S., Oliveira, L. P., Jr., Curi, R., Homem de Bittencourt, P. I., Jr. (2007). "Acute exercise stimulates macrophage function: possible role of NF-kappaB pathways." Cell Biochem Funct **25**(1): 63-73.
- Silvers, W. S. (1992). "Exercise-induced allergies: the role of histamine release." Ann Allergy **68**(1): 58-63.
- Simon, C. E. (1907). "A Further Contribution to the Knowledge of the Opsonins." J Exp Med **9**(5): 487-514.
- Spengler, R. N., R. M. Allen, Remick, D. G., Strieter, R. M., Kunkel, S. L. (1990). "Stimulation of alpha-adrenergic receptor augments the production of macrophage-derived tumor necrosis factor." J Immunol **145**(5): 1430-1434.
- Spengler, R. N., S. W. Chensue, Giacherio, D. A., Blenk, N., Kunkel, S. L. (1994). "Endogenous norepinephrine regulates tumor necrosis factor-alpha production from macrophages in vitro." J Immunol **152**(6): 3024-3031.
- Terrell, T., D. O. Hough, Alexander, R. (1996). "Identifying exercise allergies: exercise-induced anaphylaxis and cholinergic urticaria." Phys Sportsmed **24**(11): 76-89.
- Thurman, J. M. and V. M. Holers (2006). "The central role of the alternative complement pathway in human disease." J Immunol **176**(3): 1305-1310.
- Todd, R. F., 3rd (1996). "The continuing saga of complement receptor type 3 (CR3)." J Clin Invest **98**(1): 1-2.

- Tupling, A. R., E. Bombardier, Stewart, R. D., Vigna, C., Aqui, A. E. (2007). "Muscle fiber type-specific response of Hsp70 expression in human quadriceps following acute isometric exercise." J Appl Physiol **103**(6): 2105-2111.
- Vetvicka, V., B. P. Thornton, Ross, G. D. (1996). "Soluble beta-glucan polysaccharide binding to the lectin site of neutrophil or natural killer cell complement receptor type 3 (CD11b/CD18) generates a primed state of the receptor capable of mediating cytotoxicity of iC3b-opsonized target cells." J Clin Invest **98**(1): 50-61.
- Walker, R. E. (1907). "Observations on Phagocytosis in Relation to the Opsonic Index." J Med Res **16**(3): 521-526.
- Walter, R. J., R. D. Berlin, Pfeiffer, J. R., Oliver, J. M. (1980). "Polarization of endocytosis and receptor topography on cultured macrophages." J Cell Biol **86**(1): 199-211.
- Wang, Y. and P. A. Marsden (1995). "Nitric oxide synthases: gene structure and regulation." Adv Pharmacol **34**: 71-90.
- Weir, D. M., R. N. Pinckard, Elson, C. J., Suckling, D. E. (1966). "Naturally occurring anti-tissue antibodies in rat sera." Clin Exp Immunol **1**(4): 433-442.
- Zhao, J. and K. P. Karalis (2002). "Regulation of nuclear factor-kappaB by corticotropin-releasing hormone in mouse thymocytes." Mol Endocrinol **16**(11): 2561-2570.
- Zinyama, R. B., G. J. Bancroft, Sigola, L. B. (2001). "Adrenaline suppression of the macrophage nitric oxide response to lipopolysaccharide is associated with differential regulation of tumour necrosis factor-alpha and interleukin-10." Immunology **104**(4): 439-446.