



BENEDITO PEREIRA

**“REGULAÇÃO HORMONAL DA ATIVIDADE DE ENZIMAS ANTIOXIDANTES
EM ÓRGÃOS LINFÓIDES E MACRÓFAGOS DE RATOS”**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Benedito Pereira
e aprovada pela Comissão Julgadora.
26/11/98

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas, UNICAMP, para obtenção de
título de Doutor em Ciências, área de
Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Rui Curi

Campinas, 1998

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	UNICAMP
V.	Ex.
TOMBO BC/	36448
PROC.	229/99
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	03/02/99
N.º CPD	

CM-00120664-6

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Pereira, Benedito

P414r Regulação hormonal da atividade de enzimas e antioxidantes em órgãos linfóides e macrófagos de ratos/Benedito Pereira. -- Campinas, SP: [s.n.], 1998.
55.:ilus.

Orientador: Rui Curi

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Hormônios. 2. Antioxidantes. 3. Insulina. I. Curi, Rui .
- II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
- III. Título.

Campinas, 26 de novembro de 1998

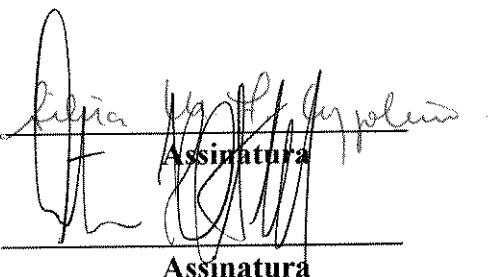
Banca examinadora

Titulares:

**Prof. Dr. Rui Curi
(Orientador)**


Assinatura

Profa.Dra. Silvia Cozzolino


Assinatura

Prof. Dr. Antônio Herbet Lancha Jr.


Assinatura

Prof. Dr. Everardo Magalhães Carneiro


Assinatura

Prof. Dr. Antônio Carlos Boschero

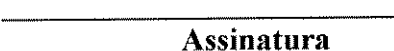

Assinatura

Suplentes:

Profa. Dra. Helena Coutinho Franco


Assinatura

Profa. Dra. Maria Alice Rostom de Melo


Assinatura

Esta tese foi realizada nos Laboratórios de Fisiologia Celular do Instituto de Ciências Biomédicas (Dr. Rui Curi) e de Bioquímica do Instituto de Química (Dr. EJH Bechara) da Universidade de São Paulo, com auxílio financeiro da CAPES, CNPq, FAPESP e Sandoz Foundation For Gerontological Research.

Ao meu orientador Prof. Dr. Rui Curi (ICB-USP), obrigado pela orientação sempre criteriosa, segura e objetiva com que conduziu o desenvolvimento deste trabalho.

A todos dos Laboratórios de Fisiologia Celular do Instituto de Ciências Biomédicas (Dr. Rui Curi) e Laboratório de Bioquímica do Instituto de Química (Dr. EJH. Bechara) da Universidade de São Paulo, que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, meu muito obrigado.

"The task is not so much to see what no one has seen yet,
but to think what nobody has thought yet,
about that what everybody sees."
(Schopenhauer)

SUMÁRIO

	Páginas
Lista de abreviaturas	6
Tabelas	7
Resumo	9
Introdução	10
Objetivo	17
Justificativa e Relevância do Trabalho	18
Materiais e Métodos	20
Resultados	27
Discussão	38
Conclusão	44
Summary	45
Referências Bibliográficas	46
Anexos	55

LISTA DE BREVIATURAS

ADM - Adrenodesmedulação
CuZn-SOD - Superóxido dismutase dependente de cobre/zinco
DEXA - Dexametasona
DTNB - 5'5'- ditio-bis-(2-ácido nitrobenzóico)
EC-SOD - Superóxido dismutase extracelular
EROs - Espécies reativas de oxigênio
GPX - Glutathione peroxidase
GR - Glutathione reductase
GSH - Glutathione reduzida
GSSG - Glutathione oxidada
T⁺ - Hipertireoidismo
T⁻ - Hipotireoidismo
IL-1 - Interleucina 1
IL-2 - Interleucina 2
LNM - Linfonodo mesentérico
MDA - Malondialdeído
Mn-SOD - Superóxido dismutase dependente de manganês
NAD⁺ - Nicotinamida adenina dinucleotídio oxidada
NADH - Nicotinamida adenina dinucleotídio reduzida
NADP⁺ - Nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato oxidada
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídio fosfato reduzida
SIDA - Síndrome da imunodeficiência adquirida
SOD - Superóxido dismutase
TBARs - Substâncias que reagem com o ácido tiobarbitúrico (" thiobarbituric acid reactant substances" [TBARs]).
T₃ - Triiodotironina
T₄ - Tiroxina

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Efeito de várias disfunções hormonais sobre a atividade de enzimas antioxidantes e produção de H_2O_2 em macrófagos residentes.

TABELA 2: Efeito da insulina, hormônios tireoidianos e dexametasona sobre a atividade de enzimas antioxidantes e produção de H_2O_2 em macrófagos cultivados por 24 h.

TABELA 3: Atividade da CuZn-SOD de órgãos linfóides de ratos diabéticos induzidos por aloxana, diabéticos tratados com insulina (D + I) e diabéticos jejuados por 24 h (D + J). Os valores estão expressos como a média \pm desvio padrão de oito ratos por grupo.

TABELA 4: Atividade da Mn-SOD de órgãos linfóides de ratos diabéticos induzidos por aloxana, diabéticos tratados com insulina (D + I) e diabéticos jejuados por 24 h (D + J). Os valores estão expressos como a média \pm desvio padrão de oito ratos por grupo.

TABELA 5: Atividade da catalase de órgãos linfóides de ratos diabéticos induzidos por aloxana, diabéticos tratados com insulina (D + I) e diabéticos jejuados por 24 h (D + J). Os valores estão expressos como a média \pm desvio padrão de oito ratos por grupo.

TABELA 6: Atividade da GPX de órgãos linfóides de ratos diabéticos induzidos por aloxana, diabéticos tratados com insulina (D + I) e diabéticos jejuados por 24 h (D + J). Os valores estão expressos como a média \pm desvio padrão de oito ratos por grupo.

TABELA 7: Atividade da CuZn-SOD de órgãos linfóides de ratos hipertiroideos (T^+) e hipotiroideos (T^-). Os valores estão expressos como a média \pm desvio padrão de oito ratos por grupo.

TABELA 8: Atividade da Mn-SOD de órgãos linfóides de ratos hipertiroideos (T^+) e hipotiroideos (T^-). Os valores estão expressos como a média \pm desvio padrão de oito ratos por grupo.

TABELA 9: Atividade da catalase de órgãos linfóides de ratos hipertiroideos (T^+) e hipotiroideos (T^-). Os valores estão expressos como a média \pm desvio padrão de oito ratos por grupo.

TABELA 10: Atividade da GPX de órgãos linfóides de ratos hipertiroideos (T^+) e hipotiroideos (T^-). Os valores estão expressos como a média \pm desvio padrão de oito ratos por grupo.

TABELA 11: Atividade da CuZn-SOD e Mn-SOD de órgãos linfóides de ratos tratados com dexametasona (DEXA). Os valores estão expressos como a média \pm desvio padrão de oito ratos por grupo.

TABELA 12: Atividade da catalase e GPX de órgãos linfóides de ratos tratados com dexametasona (DEXA). Os valores estão expressos como a média \pm desvio padrão de oito ratos por grupo.

TABELA 13: Atividade da CuZn-SOD de órgãos linfóides de ratos adrenodesmedulados (ADM). Os valores estão expressos como a média \pm desvio padrão de oito ratos por grupo.

TABELA 14: Atividade da Mn-SOD de órgãos linfóides de ratos adrenodesmedulados (ADM). Os valores estão expressos como a média \pm desvio padrão de oito ratos por grupo.

TABELA 15: Atividade da catalase de órgãos linfóides de ratos adrenodesmedulados (ADM). Os valores estão expressos como a média \pm desvio padrão de oito ratos por grupo.

TABELA 16: Atividade da GPX de órgãos linfóides de ratos adrenodesmedulados (ADM). Os valores estão expressos como a média \pm desvio padrão de oito ratos por grupo.

RESUMO

O efeito da insulina, hormônios tireoidianos, glicocorticóides (dexametasona) e catecolaminas na atividade de enzimas antioxidantes (CuZn- e Mn- superóxido dismutase - SOD, catalase e glutathione peroxidase - GPX) em macrófagos intraperitoneais residentes de ratos e órgãos linfóides (linfonodo mesentérico - LNM, timo e baço) foi investigado. Para tanto, ratos adultos foram submetidos à várias disfunções hormonais: diabetes, hiper e hipotireoidismo, tratamento com dexametasona e adrenodesmedulação. O efeito dos hormônios em macrófagos cultivados também foi avaliado. Além dos estudos sobre atividade de enzimas antioxidantes, a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por macrófagos foi determinada *in vivo* e *in vitro*. Em macrófagos: 1) a insulina aumentou a atividade da CuZn-SOD, catalase e GPX mas reduziu a da Mn-SOD, 2) os hormônios tireoidianos elevaram a atividade da CuZn- e Mn-SOD mas diminuiu a da GPX, enquanto que a dexametasona reduziu a da Mn-SOD e GPX, 3) a remoção da medula adrenal promoveu diminuição da atividade da Mn-SOD e GPX, 4) a produção de H_2O_2 foi aumentada pela insulina mas reduzida pelos hormônios tireoidianos e dexametasona. A indução do diabetes causou as seguintes mudanças de atividade das enzimas antioxidantes em órgãos linfóides: redução (exceto para GPX) no baço, aumento (exceto para a Mn-SOD) no timo, queda da Mn-SOD e catalase mas aumento da GPX no LNM; todas essas alterações foram revertidas pelo tratamento com insulina e permaneceu inalterada pela normoglicemia. O hipertireoidismo provocou elevação das atividades da CuZn- e Mn-SOD e diminuição da atividade da catalase nos órgãos linfóides. O tratamento com dexametasona causou: 1) queda da atividade da CuZn-SOD em todos os órgãos linfóides e da Mn-SOD no LNM, 2) redução da atividade da catalase no LNM e timo e aumento no baço, 3) aumento da atividade da GPX no LNM, timo e baço. A adrenodesmedulação elevou a atividade da CuZn-SOD em todos os órgãos linfóides, diminuiu a atividade da Mn-SOD no LNM e baço mas elevou no timo, enquanto que a atividade da catalase foi reduzida no LNM e timo e a atividade da GPX tornou-se indetectável nestas condições. Esses dados indicam que a atividade das enzimas antioxidantes é alterada pela insulina, hormônios tireoidianos, glicocorticóides e adrenalina. Essas alterações enzimáticas e metabólicas são tecido-específicas e podem desempenhar papel importante nas modificações da funcionalidade imunitária que geralmente acompanham as disfunções endócrinas envolvendo esses hormônios.

INTRODUÇÃO

Conceito de estresse oxidativo

Como o deus romano Janus, a molécula de oxigênio (O_2) possui duas faces: uma benígna e outra maligna. A face benígna diz respeito às características que a tornam um oxidante ideal para os sistemas biológicos: apresenta alto potencial de oxidação, barreira cinética para as reações de que participa e forma CO_2 e H_2O , metabólitos finais pouco reativos. Sua face maligna envolve a formação de oxi-radicais: superóxido (O_2^-), radical hidroxil (OH^\cdot) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) nas células de organismos aeróbios. Estas espécies químicas, oriundas da redução parcial do O_2 , podem causar danos oxidativos em biomoléculas, promovendo, em última instância, perda de funcionalidade. O alto potencial de oxidação do O_2 pode ser verificado comparando-se a eficiência com que as reações do metabolismo anaeróbico (não-oxidante) e aeróbico (oxidante) liberam a energia contida nos nutrientes. Por exemplo, o consumo de glicose em condições anaeróbicas (glicólise anaeróbica) libera menos que 10% da energia obtida pela via aeróbica, mesmo com a utilização do glicogênio muscular. Portanto, em termos energéticos, o metabolismo aeróbico apresenta enormes vantagens sobre o anaeróbico. A barreira cinética, apresentada pelo O_2 , é importante porque, caso não existisse, os nutrientes e o próprio organismo como um todo poderiam ser totalmente oxidados.

Dois fatores limitam a reatividade do O_2 com biomoléculas (proteínas, lípides e carboidratos): o primeiro envolve o carácter triplete dessa molécula. Esta propriedade da molécula de O_2 resulta de sua configuração eletrônica com dois orbitais π -antiligantes externos, cada qual com um elétron solitário (desemparelhados), ambos com o mesmo spin. Desta forma, quando o O_2 oxida outro átomo ou molécula, recebendo um par de elétrons, estes deveriam ter spins paralelos para poderem ocupar cada um dos espaços vazios nos orbitais. Contudo, as biomoléculas que reagem com o O_2 possuem ligação covalente com dois elétrons com spins opostos ocupando o orbital molecular. Portanto, a reação direta do O_2 com biomoléculas é restringida pela "proibição de spins" (Regra de Hund). O segundo fator que limita a velocidade de reação do O_2 com biomoléculas tem a ver com o potencial negativo apresentado pelo orbital π -antiligante, cujo valor é de -0,33 V. Portanto, a adição de um elétron neste orbital pode resultar em repulsão eletrônica. Além disso, apesar de o O_2 ser um forte oxidante em solução ácida ($E^0 = + 1,23$ V), em solução neutra há restrição eletrônica porque o seu potencial de oxidação é de + 0,28 V (Halliwell & Gutteridge, 1989; Ingraham & Meyer, 1985).

Devido a essas características, as biomoléculas são bastante estáveis na presença do O_2 . Contudo, pode ocorrer aumento da reatividade do O_2 quando um dos seus elétrons desemparelhados é movido para o outro orbital π -antiligante degenerado. O resultado é uma diminuição da restrição de spins. Esse processo requer energia e gera o estado singlete do O_2 . Neste caso, os dois elétrons passam a ter spins opostos. Outro meio de ativação do O_2 é pela sua redução unieletrônica. Quando o O_2 recebe um elétron obtém-se o ânion O_2^- . O potencial de oxidação desta molécula é positivo ($E^0 = + 0,89$ V). Isto poderia torná-la um

forte oxidante pela via de redução unieletrônica. Entretanto, o O_2^- não apresenta tendência de reagir como um oxidante forte porque o próximo elétron a ser adicionado no orbital pode ser repellido devido à carga negativa já presente na molécula. Quando o ânion O_2^- recebe um elétron, obtém-se o íon peróxido (O_2^{2-}), aumentando a distância entre os dois átomos de oxigênio da molécula de O_2 . Como a ligação entre os dois átomos de oxigênio (O-O) é relativamente fraca, o H_2O_2 (íon peróxido protonado) decompõe-se facilmente na presença de redutores como o ferro (Fe^{2+}), cobre (Cu^+) e ascorbato. O resultado final do processo de decomposição do H_2O_2 , na presença destes redutores, é a formação do radical hidroxil (OH^\cdot) (Reação de Fenton). Estes produtos de redução do O_2 (O_2^- , H_2O_2 e OH^\cdot) recebem a denominação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (Traber, 1997; Pompella, 1997).

O H_2O_2 por não possuir elétrons desemparelhados, como o O_2^- e o OH^\cdot , não é um radical livre. É, portanto, uma molécula menos reativa que as demais. Um radical livre é definido como qualquer átomo, molécula ou fragmento de molécula contendo um ou mais elétrons desemparelhados nas suas camadas de valência (Traber, 1997; Pompella, 1997). As três principais vias metabólicas envolvidas na formação de EROs *in vivo* que podem ser ativadas gerando EROs em excesso são: 1) mitocondrial, envolvendo a redução da coenzima Q a semiquinona com posterior formação de EROs; 2) citoplasmática, envolvendo a ativação da enzima xantina oxidase e, 3) participação de ferro e cobre (Reação de Fenton) (Halliwell & Gutteridge, 1989). Algumas situações em que os organismos e células são submetidos e se detecta elevação da formação de EROs incluem: ativação de fagócitos (neutrófilos, macrófagos, monócitos e eosinófilos) por micro-organismos, hiperóxia, contaminação por xenobióticos, radiação ionizante, isquemia seguida de reperfusão e exercício físico (Traber, 1997; Pompella, 1997; Yu, 1994; Benzi, 1993).

A maior reatividade apresentada pelos radicais livres, comparativamente aos não radicais, pode ser evidenciada pelo menor tempo de vida média que possuem (Yu, 1994). O radical OH^\cdot e o ânion O_2^- possuem tempo de vida média respectivamente de 1×10^{-9} e 1×10^{-6} segundos, enquanto que o do H_2O_2 é superior a 10^{-2} segundos. Apesar de o O_2 ser um radical livre, na verdade um di-radical livre, a sua reatividade também é muito baixa (tempo de vida média superior a 10^2 segundos) pelas razões já expostas (“proibição de spins”) (Yu, 1994). Este tempo de vida extremamente curto, apresentado pelos radicais livres, é devido à maior instabilidade eletrônica que possuem. Isto resulta na possibilidade de oxidarem rapidamente outras moléculas com as quais venham a colidir, promovendo formação de outros radicais livres; como por exemplo, os radicais peroxil (ROO^\cdot) e alcoxil (RO^\cdot), formados durante a peroxidação dos lipídeos das membranas celulares (Traber, 1997; Pompella, 1997). Uma vez que praticamente todas as biomoléculas são susceptíveis à oxidação, a peroxidação destes lipídeos é apenas um exemplo de lesão biológica que pode ser promovida pelas EROs (Traber, 1997; Pompella, 1997). Abaixo estão resumidos alguns dos principais alvos e consequências das lesões oxidativas promovidas por EROs (Traber, 1997; Pompella, 1997; Halliwell & Gutteridge, 1989).

1. Danos em DNA: mutação, câncer e morte celular,
2. Destruição ou mudanças no estado redox de NADPH e NADH,

3. Lesões oxidativas em proteínas e enzimas, principalmente nos aminoácidos tirosina, metionina, triptofano, lisina, histidina e cisteína, com perda ou não de atividade,
4. Peroxidação lipídica, com consequente mudança na estrutura e funcionalidade da membrana celular. Os produtos secundários (lipoperóxidos e aldeídos) causam distúrbios à distância, inclusive alterando biomoléculas e promovendo imunossupressão,
5. Danos em proteínas de membranas implicam alterações no transporte celular e recepção de estímulos hormonais,
6. Lesões em polissacarídeos, incluindo o ácido hialurônico do líquido sinovial, podem resultar em inflamações articulares.

Para se protegerem contra as EROs, os organismos dispõem de mecanismos químicos e enzimáticos (Traber, 1997; Pompella, 1997). No primeiro caso, várias moléculas com propriedades antioxidantes consumidas na dieta (antioxidantes químicos) como o α -tocoferol, β -caroteno, selênio, ácido ascórbico e glutathione reduzida (GSH) diminuem a ação tóxica das EROs produzidas intra e extracelularmente (Yu, 1994). No segundo caso, quando são expostos às EROs, os organismos sintetizam proteínas (enzimas) antioxidantes como as superóxido dismutases (SOD), catalase e glutathione peroxidase (GPX). Estas três enzimas são encontradas em diferentes locais da célula e podem ter papéis complementares. De fato, as superóxido dismutases, diméricas, dependentes de cobre e zinco (CuZn-SOD), são encontradas principalmente no citossol. Uma segunda e terceira isoenzima ocorrem nas mitôcondrias (dependentes de manganês – Mn-SOD) e no meio extracelular (tetraméricas, dependentes de cobre e zinco -EC-SOD). Estas enzimas degradam, respectivamente, o O_2^- , H_2O_2 e H_2O_2 /lipoperóxidos (Yu, 1994). Apesar de essas defesas antioxidantes reduzirem os riscos de lesões oxidativas por EROs, os organismos podem ser expostos a situações onde estas são insuficientes para protegê-los. Quando isso acontece, dizemos que os organismos estão sob estresse oxidativo, como citado anteriormente (Traber, 1997; Pompella, 1997). Além de os fagócitos produzirem grandes quantidades de EROs quando são ativados (Tapia *et alii.*, 1997), outras células, como os fibroblastos, linfócitos B e células endoteliais também liberam O_2^- e H_2O_2 (Maly, 1990; Murrell *et alii.*, 1990). As EROs produzidas por estas células, quando ativadas por micro-organismos patogênicos, atuam como bactericidas, sendo, portanto, um importante meio de proteção contra o desenvolvimento de infecções (Tapia *et alii.*, 1997). Portanto, a manutenção das defesas antioxidantes químicas e enzimáticas em equilíbrio dinâmico com a formação de EROs no organismo é fundamental para a sobrevivência.

Apesar de as células e tecidos possuírem meios de ampliarem as suas defesas antioxidantes enzimáticas quando o organismo está sob estresse oxidativo, os fatores controladores desse processo ainda não foram totalmente esclarecidos (Traber, 1997; Harris, 1992). Além disso, a maior parte da informação disponível sobre as bases moleculares que controlam a síntese e a atividade destas enzimas só foi bem caracterizada em procariotos, existindo pouca informação sobre tecidos de mamíferos. De fato, Harris (1992) e Storz *et alii.* (1990) relataram que o H_2O_2 estimula a atividade da catalase e GPX através da ativação do gene OxiR. Esses autores relataram que o sinal pode ser traduzido em aproximadamente 5 min pelo aparato genético da *Salmonella typhi*. e *E. Coli*. Foi também demonstrado que o gene OxiR não exerce qualquer efeito sobre a expressão das isoenzimas da SOD. A Mn-

SOD é classificada como proteína induzível enquanto que a CuZn-SOD como constitutiva (White, 1993). Além disso, deve ser salientado que o mecanismo de expressão gênica da Mn-SOD foi melhor caracterizado que o da CuZn-SOD, sendo que essa última parece ser expressa em altos níveis em mamíferos e é menos induzível que a Mn-SOD (Tannahill *et alii.*, 1997; Wagner, 1994; White, 1993). Foi relatado que o gene SoxR de procariotos controla a expressão de nove proteínas em resposta à exposição destas células ao O_2^- , fazendo parte dessas a Mn-SOD e a glicose-6-fosfato desidrogenase (Harris, 1992). Ji (1993) sugeriu que se esses resultados obtidos com procariotos puderem ser transferidos para eucariotos e células de mamíferos, as modificações detectadas nas atividades das enzimas antioxidantes em diversas situações experimentais, deve resultar da ação do O_2^- e H_2O_2 sobre esses genes. A via de tradução de sinal em que os oxidantes e antioxidantes atuam sobre os genes OxiR e SoxR pode envolver a ativação do fator nuclear (FN)- $\kappa\beta$, uma vez que o H_2O_2 e lipoperoxídeos ativam esse complexo (Traber, 1997).

A importância da presença de cofatores (metais de transição e selênio) e de substratos na regulação da atividade das enzimas antioxidantes foi bastante estudada (Yu, 1994). Há, contudo, estudos com outros moduladores potenciais da expressão gênica e da atividade da Mn-SOD: a endotoxina bacteriana, fatores de necrose tumoral α e β , interleucinas 1 α e β , ester de forbol e estrógenos (Antras-Ferry *et alii.*, 1997; Tannahill *et alii.*, 1997; Harris, 1992). Estes fatores, além de terem induzido a expressão gênica da Mn-SOD, também estimularam a atividade da catalase e GPX nos tecidos de ratos e hamster tratados, sem afetar a expressão da CuZn-SOD (White, 1993). Esse resultado confirma que a CuZn-SOD é, de fato, uma proteína expressa constitutivamente (Harris, 1992). Deve-se salientar que o TNF- α , linfotoxinas, IL-1, lipopolissacarídeos, ativadores da proteína quinase C (ester de forbol) e inibidores de fosfatases 1 e 2 ativam o complexo FN- $\kappa\beta$ (Traber, 1997). Apesar de esses resultados obtidos com procariotos serem importantes para a compreensão dos processos controladores e reguladores da síntese e atividade das enzimas antioxidantes, sua transferência para outros animais superiores e humanos deve ser feita com restrições, principalmente porque a regulação da atividade dessas enzimas nos tecidos e órgãos destes animais está sujeita à influência de vários fatores: especificidade orgânica e tecidual, estágio de desenvolvimento e disponibilidade ou ausência de cofatores na dieta (Harris, 1992).

Regulação hormonal de enzimas antioxidantes

Uma vez que vários hormônios (insulina, tiroxina, tri-iodotironina, cortisol e adrenalina) alteram a atividade do metabolismo celular e aumentam o consumo de O_2 , esses também poderiam modificar a atividade e a concentração das enzimas antioxidantes, principalmente em situações em que suas concentrações plasmáticas encontram-se alteradas. Além disso, o mecanismo da expressão das enzimas antioxidantes também poderia ser influenciado por esses hormônios. Vários trabalhos demonstraram que esses hormônios ou substâncias análogas são capazes de modificar a atividade e expressão de enzimas antioxidantes. Por exemplo, ratos tratados com estreptozotocina ou aloxana apresentaram atividade reduzida de CuZn-SOD no fígado, rim e eritrócitos (Loven *et alii.*, 1986). A

atividade da GPX aumentou no rim, mas não houve alteração no pulmão, fígado e eritrócitos de ratos tratados com aloxana (Gupta *et alii.*, 1990). A atividade da catalase mostrou-se reduzida na aorta de ratos diabéticos mas não se modificou nos rins (Dohi *et alii.*, 1987). Esta condição foi acompanhada de aumento da concentração plasmática de produtos de peroxidação lipídica (TBARs) (Dohi *et alii.*, 1987). Portanto, pode-se afirmar que há redução da capacidade antioxidante enzimática dos tecidos e órgãos de ratos devido à deficiência de insulina. Exceto para o eritrócito, as atividades anormais da CuZn-SOD e GPX, observadas no diabetes, foram restabelecidas pelo tratamento com insulina (Tagami *et alii.*, 1992; Gupta *et alii.*, 1990). As atividades da CuZn-SOD, catalase e GPX de eritrócitos estão diminuídas em diabéticos sedentários e nos que se submetem ao treinamento físico aeróbio diariamente (Atalay *et alii.*, 1997). Outros autores demonstraram que a dieta rica em frutose induz resistência à insulina em tecidos de ratos e menor eficiência do sistema de proteção antioxidante enzimática destes tecidos (Faure *et alii.*, 1997). Isto foi evidenciado pelo alto índice sanguíneo de peroxidação lipídica, concentração de GSSG e baixa atividade da CuZn-SOD encontrados nos eritrócitos de animais tratados com dieta rica em frutose comparado com o controle (Faure *et alii.*, 1997).

O estado hipermetabólico provocado pelo hipertireoidismo pode acelerar a produção de EROs intramitocondrialmente e induzir mudanças no sistema de defesa antioxidante dos tecidos de ratos (Tapia *et alii.*, 1997; Nishida *et alii.*, 1997; Asayama *et alii.*, 1990). Assim, ratos submetidos ao hipertireoidismo mostraram atividade metabólica mitocondrial intensificada (maior atividade da fumarase e citocromo oxidase) provocando lipoperoxidação no coração e músculo sóleo destes animais. Além disso, as atividades da GPX e catalase diminuíram e a da Mn-SOD aumentou em todos os tecidos dos ratos (Asayama *et alii.*, 1987). Entretanto, não foi observada qualquer alteração no fígado, rim e no músculo *digitorum longus*. Estes resultados demonstram que a estimulação do metabolismo oxidativo e a concomitante queda da atividade da GPX nos músculos sóleo e cardíaco, devido ao hipertireoidismo, podem explicar a ocorrência de miopatias nestes tecidos nesta condição. Comparativamente ao hipertireoidismo, estudos com hipotireoidismo não encontraram qualquer reação adversa mediada por EROs em vários tecidos de ratos (Asayama *et alii.*, 1987). Por outro lado, os hormônios tireoidianos elevaram a atividade produtora de EROs das células de Kupffer (macrófagos presentes no fígado) (Tapia *et alii.*, 1997). Estes autores concluíram que isso pode ser responsável pela maior peroxidação lipídica encontrada no fígado de animais com hipertireoidismo. O conteúdo e a atividade da Mn-SOD da glândula tireóide aumentou em ratos tratados com hormônio estimulador da tireóide (TSH) e em tireócitos cultivados em meio contendo TSH (Nishida *et alii.*, 1997). Desta forma, assim como no diabetes, pode-se assumir que o sistema de defesa antioxidante contra EROs é modificado pelo hipertireoidismo em vários tecidos e órgãos de animais que apresentam concentração plasmática elevada de hormônios tireoidianos.

Existem várias evidências de que os glicocorticóides também alteram a capacidade antioxidante enzimática de vários tecidos e órgãos: 1) a dexametasona modula de maneira diferenciada a capacidade que o TNF- α e a IL-1 β têm de induzir a transcrição hepática do gene da Mn-SOD (Antras-Ferry *et alii.*, 1997); 2) os glicocorticóides aumentam a eficiência com que o estresse oxidativo promove morte neuronal no hipocampo *in vitro* (Behl *et alii.*,

1997); 3) outros estudos, nesta mesma linha, evidenciaram que o cérebro de ratos adultos tratados com glicocorticóides em altas concentrações apresenta diminuição da atividade da GPX em 50% (Behl *et alii.*, 1997) e; 4) o cortisol inibe a produção de EROs por macrófagos e neutrófilos (Dweik *et alii.*, 1997; Maridonneau-Parini *et alii.*, 1989). De acordo com Munck (1984), esse último efeito faz com que o cortisol não deva ser considerado somente um agente imuno-inibitório mas, o seu aumento no plasma em situação de estresse prolongado, pode servir para proteger o organismo contra a ativação excessiva das suas defesas imunológicas. Portanto, apesar de a resposta imunológica insuficiente levar ao desenvolvimento de infecções, o aumento da produção de EROs devido à ativação excessiva dos macrófagos e neutrófilos pode lesar o próprio organismo. Como exemplo extremo, grande parte da mortalidade associada ao choque séptico relaciona-se à ativação excessiva do sistema imunológico contra infecção (Parillo *et alii.*, 1990). A produção excessiva de IL-1 e IL-2 e prostaglandinas, nesta condição, causa colapso do tônus vascular periférico enquanto que a produção de EROs e a liberação de proteases de leucócitos ativados provocam necrose e morte tissular (Behl *et alii.*, 1997). Entretanto, os glicocorticóides, por inibirem a produção de EROs por macrófagos e neutrófilos, atuam como um agente antioxidante indireto.

Estudos realizados por Hidalgo *et alii.* (1991) mostraram que, de fato, os glicocorticóides podem desempenhar papel antioxidante importante quando suas concentrações plasmáticas encontram-se aumentadas. Estes autores relataram que os glicocorticóides exercem efeito inibitório sobre a produção hepática de lipoperóxidos. Os resultados obtidos por Behl *et alii.* (1997) com o hipocampo de ratos contradiz os de Hidalgo *et alii.* (1991) ou então o efeito dos glicocorticóides é tecido específico. De fato, Behl *et alii.* (1997) demonstraram que os glicocorticóides promovem queda em 50% da atividade da GPX e amplia o processo de morte celular promovido por EROs no hipocampo de ratos, enquanto que Hidalgo *et alii.* (1991) encontraram menor lipoperoxidação no fígado de animais tratados com glicocorticóides. Outros experimentos realizados com animais deficiente em corticosterona demonstraram claramente que o tratamento com esse hormônio reverte o efeito da adrenalectomia, que é responsável pela elevação da concentração de lipoperóxidos no fígado (Hidalgo *et alii.*, 1991).

Cabe salientar que existem evidências de que outros hormônios também atuam modificando a capacidade antioxidante dos tecidos de humanos e de animais. O 17 β -estradiol, por exemplo, é um neuroprotetor efetivo contra a indução de morte celular pelo estresse oxidativo (Behl *et alii.*, 1997). Behl *et alii.* (1997) também relataram que o aumento da expressão gênica da GPX e catalase é suficiente para conferir proteção contra a morte neuronal promovida pelo estresse oxidativo. Isso mostra que o estradiol também pode modular a atividade da GPX. Estes dados podem ter alguma relação com a menor incidência de danos oxidativos envolvendo fêmeas quando são submetidas a isquemia experimental comparativamente aos machos (Kume-Kick *et alii.*, 1996). De fato, Kume-Kick *et alii.* (1996) demonstraram que o estresse oxidativo, monitorado pela perda de ascorbato após isquemia, é maior em machos do que em fêmeas. Outros estudos com mulheres que utilizaram contraceptivos apresentaram alta atividade de GPX no sangue em comparação às que não utilizaram (Kanaley & Ji, 1991). Foi relatado que o seu consumo por tempo

prolongado eleva a atividade da GPX em comparação à utilização por tempo inferior à seis meses. O aumento da concentração plasmática de lipoperóxidos também foi detectado nestas mulheres, principalmente nas que utilizaram estrógenos (Kanaley & Ji, 1991). Contrariando esses estudos, outros pesquisadores demonstraram que atletas com amenorréia apresentam alta atividade de GPX no sangue, estando pouco relacionada ao β -estradiol e positivamente associada ao cortisol plasmático durante o exercício físico prolongado (Kanaley & Ji, 1991).

OBJETIVO

Nosso objetivo nesta tese foi o de apresentar evidências de que a ação celular e tecidual da insulina, hormônios tireoidianos (tiroxina e triiodotironina), glicocorticóides (dexametasona) e catecolaminas altera a atividade de enzimas antioxidantes (CuZn – e Mn-SOD, catalase e GPX) em macrófagos e órgãos linfóides (linfonodo mesentérico, timo e baço) de ratos. Estas células e órgãos foram retirados de ratos submetidos a diversas disfunções hormonais: diabetes, hiper e hipotireoidismo, tratamento com dexametasona e desmedulação das adrenais. Além desses estudos, realizamos experimentos em cultura com macrófagos retirados do peritônio de ratos. Avaliamos também a funcionalidade dos macrófagos através da produção de H_2O_2 .

JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA DO TRABALHO

Estudos sobre o metabolismo dos macrófagos focalizaram a sua atenção até o momento principalmente os eventos associados à fagocitose ou ao “burst” respiratório (Risholl *et alii.*, 1995). O primeiro aspecto diz respeito à sua capacidade de fagocitar e digerir microorganismos patogênicos, enquanto que o segundo, diz respeito, exclusivamente, à sua capacidade pró-oxidante, cuja função principal é bactericida. O segundo aspecto refere-se a uma ativação excessiva, gerando EROs em grande quantidade, a ponto de o próprio macrófago ser lesado. Portanto, os macrófagos precisam se proteger contra a ação tóxica das EROs formadas. Esta auto-proteção é obtida por antioxidantes químicos e enzimáticos. O conteúdo de α -tocoferol de macrófagos e de monócitos é aproximadamente dez vezes superior ao encontrado em plaquetas e hemácias e, o de ácido ascórbico, cento e cinquenta vezes superior ao do plasma (Bendich, 1990). Além disso, existem evidências de que quando os macrófagos são incubados com bactéria na presença de antioxidantes químicos, a bactéria é destruída eficientemente e o macrófago não é lesado (Bendich, 1990). Contudo, quando o macrófago é exposto a EROs ou durante a sua ativação, o conteúdo desses antioxidantes é significativamente reduzido (Bendich, 1990). Além disso, Butterick (1983) observou que o α -tocoferol em excesso pode inibir a NADPH oxidase de fagócitos, resultando em menor produção de EROs. Sharmanov *et alii.* (1990) confirmaram estes dados demonstrando maior formação de EROs por macrófagos retirados do peritônio de ratos deficientes de α -tocoferol. Outra alteração encontrada na carência de α -tocoferol foi a queda das defesas antioxidantes enzimáticas (SOD e GPX) que, segundo Sharmanov *et alii.* (1990), foi a causa das modificações estruturais e funcionais apresentadas por macrófagos. Portanto, para que o macrófago desempenhe as suas funções de maneira apropriada, deve possuir um equilíbrio dinâmico entre ambos antioxidantes. Desta forma, pode-se afirmar que a redução do conteúdo de antioxidantes químicos (ácido ascórbico e α -tocoferol) durante a ativação dos macrófagos impõe que a sua capacidade antioxidante enzimática seja elevada para protegê-los durante esse processo.

Estas considerações reforçam a importância da realização de estudos envolvendo macrófagos e possíveis fatores controladores da atividade de suas enzimas antioxidantes. Apesar disso, poucos estudos foram realizados com esse propósito, principalmente envolvendo a ausência ou o excesso de hormônios na regulação da atividade destas enzimas de macrófagos ou de órgãos linfóides. O fato que comprova a importância de se estudar o metabolismo antioxidante e pró-oxidante de macrófagos em condição de disfunção hormonal é que essas células, assim como os linfócitos e neutrófilos, possuem receptores para vários hormônios como os glicocorticóides, insulina e catecolaminas (Rishol *et alii.*, 1995; Griswold, 1993; Plaut, 1987). Além disso, esses hormônios são sabidamente controladores da função imunitária e resposta inflamatória e existem evidências de que o estresse oxidativo está envolvido no processo (Hassan & Douglas, 1990). Portanto, isto é uma indicação de que os macrófagos podem ter as suas enzimas antioxidantes alteradas quando submetidos à disfunções hormonais.

O estudo da capacidade antioxidante dos órgãos linfóides é importante porque exercem importante papel na maturação, diferenciação e armazenamento dos diversos tipos

de linfócitos T e B do organismo. Desta forma, qualquer modificação ocorrida nesses órgãos se refletirá no número e funcionalidade destas células na circulação. Foi demonstrado que alterações funcionais e estruturais dos órgãos linfóides podem ser responsabilizadas pela imunossupressão observada na SIDA (síndrome da imunodeficiência adquirida). Essa afirmação baseia-se no fato de que o HIV replica-se principalmente nos linfonodos espalhados pelo organismo e não no sangue circulante, provocando, como consequência, destruição desses órgãos (Greene, 1993). Este mesmo autor sugeriu que a diminuição do número e funcionalidade das células CD4+ no sangue de pacientes portadores do HIV pode ser um forte indicador da ocorrência de danos nos linfonodos espalhados pelo organismo. Isso porque as células CD4+ circulantes não são o principal sítio de replicação do HIV durante a fase assintomática da infecção (Greene, 1993).

Entre os poucos estudos existentes sobre a temática desta tese, encontramos alguns que examinaram principalmente o timo e o baço (Chandra, 1990). Fatores que causam atrofia dos órgãos linfóides e diminuem a funcionalidade imunológica incluem (Chandra, 1990): 1) desnutrição proteico-calórica, 2) dieta deficiente em piridoxina, ácido fólico e vitaminas C, A e E, 3) deficiência de zinco e cobre. A deficiência de cobre e zinco, além de estar envolvida na atrofia dos órgãos linfóides, promove menor atividade secretória hormonal do timo. Chandra (1990) relatou que grande parte da queda da funcionalidade imunológica devido à má nutrição é decorrente da redução da produção dos hormônios tímicos. Foi demonstrado que a deficiência de zinco diminui esta função do timo em 80%. Alguns efeitos da presença ou ausência de antioxidantes na dieta incluem (Bendich, 1990): 1) incremento do tamanho do timo de camundongos alimentados com β -caroteno, 2) correlação significativa entre o conteúdo de vitamina E do baço e capacidade mitogênica das suas células, 3) redução da concentração de GSH no baço de camundongos envelhecidos, os quais apresentavam baixa funcionalidade imunológica. Chandra (1990) concluiu que cobre, zinco, ferro, selênio e vitaminas antioxidantes (E, A e C), β -caroteno e vitamina B₆ são imprescindíveis para a manutenção da integridade estrutural dos órgãos linfóides, funcionalidade imunológica e combate às infecções.

Chukhulovina *et alii*. (1990) e Yamaoka *et alii*. (1991) demonstraram que órgãos linfóides de ratos submetidos ao exercício físico extenuante ou por baixas doses de radiação X, apresentam redução do conteúdo de lipoperóxidos e aumento da atividade das enzimas antioxidantes. Além disso, foi demonstrado que o extrato de timo injetado em animais promove elevação da atividade das enzimas antioxidantes nos tecidos dos animais estudados. Todavia, os autores relataram ocorrência de perda de atividade da CuZn-SOD no cérebro e diminuição da sua concentração de lipoperóxidos. Relataram ainda que os hormônios tímicos podem estimular a atividade da Mn-SOD. Essas observações situam os órgãos linfóides como órgãos importantes à serem estudados em condições em que se constate a ocorrência de imunossupressão. Nesta tese, os trabalhos desenvolvidos visaram demonstrar que, além dos hormônios do timo e a deficiência de antioxidantes químicos, os glicocorticóides, catecolaminas, hormônios tireoidianos e insulina também alteram significativamente a capacidade antioxidante enzimática dos órgãos linfóides de ratos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Planejamento geral

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, machos, obtidos do Biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP). Os animais ficaram no laboratório por uma semana, previamente aos experimentos, para prevenir os efeitos decorrentes da variação ambiental. Para os experimentos com disfunção hormonal, os ratos (peso inicial entre 120-150 gramas) permaneceram no biotério com temperatura controlada e ciclo claro/escuro de 12/12 h, sendo caracterizados como: (a) ratos tratados com aloxana (diabetes experimental); (b) ratos tratados com T_3 e T_4 (hipertireoidismo); (c) ratos deficientes de T_3 e T_4 (hipotireoidismo); (d) ratos tratados com dexametasona (glicocorticóide sintético); (e) ratos submetidos à deficiência de hormônios da medula adrenal (catecolaminas) (adrenodesmedulados); (f) ratos controles específicos para cada procedimento. Macrófagos de ratos normais foram cultivados por 24 h na presença de insulina, T_3/T_4 e dexametasona.

Reagentes e enzimas

Os constituintes dos tampões foram obtidos da Reagem Quimibrás Indústria Brasileira S/A. Creatina fosfato, coenzima A, aloxana, peroxidase, SOD bovina, superóxido de potássio, catalase, 2-amino-2-metil-1-propanol foram comprados da Sigma Chemical Co. (EUA). $NADP^+$ e $NADH$ da Boehringer Mannheim (Alemanha), insulina NP-bovina da Biobrás (Brasil), hormônios tireoidianos da Aché (Brasil) e dexametasona da Sharp & Dohne (Brasil). Todas as soluções foram preparadas com água bidestilada desionizada, obtida de equipamento Milli Q Millipore.

Procedimento para obtenção das amostras de tecidos e células

Os ratos foram sacrificados por deslocamento cervical no dia seguinte ao término dos procedimentos experimentais. Os órgãos linfóides baço, timo e linfonodo mesentérico e macrófagos peritoneais foram retirados e estocados em nitrogênio líquido até o dia da análise enzimática. Para a análise, essas amostras foram homogeneizadas sob gelo e em tampão de extração específico para cada enzima, utilizando-se equipamento desenvolvido por Vieira *et alii*. (1990), na proporção 1:10 (p/v).

Indução de diabetes experimental

O diabetes experimental foi estabelecido pela administração de aloxana, substância que induz necrose das células β das ilhotas de Langerhans do pâncreas (Lukens, 1948). Os animais foram utilizados no 10º dia após a administração da droga (50 mg/kg). Os controles

correspondentes não receberam tratamento. Os animais tratados com aloxana foram utilizados após comprovação do quadro de diabetes mellitus, através da determinação da glicemia plasmática (>200 mg/dL). Para se avaliar a influência do estado hiperglicêmico, vigente no diabetes experimental, sobre os parâmetros investigados, os ratos foram submetidos ao jejum de 24 h (diabéticos normoglicêmicos), recebendo apenas água *ad libitum*, previamente aos experimentos. Os controles correspondentes foram mantidos nas mesmas condições, pelo mesmo espaço de tempo.

Tratamento com insulina

Animais normais e diabéticos receberam insulina (NPH bovina), na dose de 2 unidades por animal, por via subcutânea, por seis dias consecutivos, mantendo-se a glicemia ao redor de 50 mg/dL. Animais controles receberam quantidades idênticas de salina (0,9%), pela mesma via e durante o mesmo espaço de tempo. Imediatamente antes do sacrifício dos animais, procedeu-se a determinação da glicemia plasmática destes para comprovar o efeito da insulina administrada.

Indução de hipertiroidismo

O hipertiroidismo foi induzido pela administração diária de 60 μ g de L-tiroxina e 15 μ g de L-triiodotironina sódica (Levoid-1 Aché) durante sete dias. Os hormônios foram administrados por via oral, através de sonda gástrica. Os animais foram utilizados 24 h após a interrupção do tratamento. Os controles correspondentes receberam, através de sonda gástrica, durante 7 dias, 2 ml de água destilada, que foi o solvente utilizado para os hormônios administrados.

Indução de hipotiroidismo

O hipotiroidismo foi produzido por tiroidectomia bilateral, sob anestesia por hidrato de cloral, por via intraperitoneal. Após tricotomia e assepsia com álcool iodado, fez-se uma incisão longitudinal da pele e da fáscia do pescoço, afastando-se as glândulas submandibulares e os músculos esternocleidomastoídeo e o esterneioídeo, sendo expostas a traquéia e a glândula tiróide. Esta foi retirada por meio de dissecação com cotonetes de algodão. A fáscia e a pele do pescoço foram suturadas com pontos separados de algodão. Cada animal recebeu, no período pós-operatório imediato, 5 mg de ampicilina sódica por via intramuscular. A tiroidectomia é geralmente acompanhada de remoção total ou parcial das glândulas paratiróides. Para impedir o surgimento do hipoparatiroidismo, os ratos receberam, como suplementação, uma solução de lactato de cálcio 2% além da dieta normal. Os animais foram utilizados no 50º dia do período pós-operatório. Os animais submetidos ao tratamento com tiroxina e triiodotironina e à tiroidectomia foram utilizados após comprovação dos quadros de hipo e hipertiroidismo. Para tanto, determinou-se nesses animais a concentração plasmática de T_4 , a evolução ponderal e a frequência cardíaca dos

animais. Os animais controles do grupo com hipotireoidismo foi constituído de animais com um trauma cirúrgico equivalente, deixando a glândula tireóide intacta.

Remoção bilateral da porção medular das glândulas adrenais.

A remoção da porção medular das glândulas adrenais foi praticada sob anestesia por administração de hidrato de cloral a 10%, na dose de 0,4 ml/100g de peso corporal, intraperitonealmente. Após tricotomia e assepsia regional com álcool iodado, fez-se uma incisão na camada muscular, logo abaixo da última costela. As glândulas adrenais foram cuidadosamente expostas, realizando-se, então, minúscula incisão cortical com auxílio de um bisturi. Sob leve pressão, por meio de uma pinça, a porção medular foi exposta integralmente. O tecido cortical remanescente, com o pedículo e o tecido adiposo circundante, foi reposto na cavidade abdominal suturando-se os cortes cirúrgicos dos planos superficiais. Os animais foram utilizados no 35º dia do período pós-operatório. Segundo Waynforth (1980), após este período, ocorre plena restituição funcional do córtex da adrenal. Os controles para este grupo foram constituídos de animais submetidos a um trauma cirúrgico equivalente (falsa cirurgia), deixando intactas as glândulas adrenais.

Tratamento dos ratos com dexametasona

O tratamento dos ratos com dexametasona, consistiu na injeção intraperitoneal da droga na dose de 5 mg/kg de peso corporal por três dias. O grupo controle recebeu o mesmo volume (0,5 ml) de salina (0,9%) nas mesmas condições que os animais experimentais.

Obtenção de macrófagos peritoneais

Para a obtenção de células peritoneais, os animais foram anestesiados por inalação de éter e exsanguinados por decapitação. Após a remoção da pele da região abdominal, 6 ml de tampão-fosfato-salina (PBS) (pH 7,2) foram injetados na cavidade peritoneal dos animais. Trinta segundos após a administração, a cavidade peritoneal foi aberta e o fluido contendo as células foi aspirado com a utilização de pipeta Pasteur de plástico. Uma alíquota deste fluido foi retirada para a realização da contagem total e diferencial (mononuclear/polimorfonuclear) de células (com utilização de cristal violeta em ácido acético) e teste de viabilidade das células (com a utilização de "tripan blue"). As amostras apresentaram viabilidade superior a 95%. As contagens de células e o teste de viabilidade foram realizados em câmara de Neubauer, em microscópio óptico, utilizando-se a objetiva de imersão em óleo para a realização da contagem diferencial.

Cultura de macrófagos

Após a coleta dos macrófagos peritoneais, com a utilização de material estéril, inclusive tubos para centrifugação e PBS, o lavado foi centrifugado por 7 min a 750 g e 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e os macrófagos ressuspensos em 5 ml de meio Eagle, complementado com 10% de soro fetal bovino e antibiótico. Esta ressuspensão foi realizada em câmara de fluxo laminar estéril. A suspensão foi novamente centrifugada por 7 min a 150 g e 4°C. O sobrenadante foi novamente desprezado e os macrófagos incubados em placas de Petri de plástico por 4 h em 20 ml de meio Eagle complementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos. Estas placas permaneceram 4 h em incubadora a 37°C, em atmosfera a 95% ar e 5% de CO₂. Todos esses procedimentos foram realizados em câmara de fluxo laminar estéril. Após o período inicial de incubação, as placas foram lavadas vigorosamente, três vezes, com 5 ml de tampão PBS estéril (pH 7,2). Após estas lavagens, restam nas placas somente macrófagos aderidos, mantidos então por 24 h em incubadora a 37°C, sob atmosfera de 95% de ar e 5% de CO₂ na presença dos hormônios conforme descrito abaixo.

Tratamento dos macrófagos mantidos em cultura

Macrófagos peritoneais residentes obtidos de ratos controles (não tratados) foram mantidos em cultura, na presença de insulina (1 U/ml), dexametasona (2 mg/ml) ou tiroxina (120 µg/ml de tiroxina) e triiodotironina (30 µg/ml de triiodotironina) por placa. Os macrófagos mantidos nestas condições foram avaliados quanto à viabilidade celular após o período de cultura. Foi também realizada, nestas células, a determinação da atividade das enzimas antioxidantes.

Teste de viabilidade celular

Para o teste de viabilidade dos macrófagos, uma pequena alíquota das suspensões celulares, no início e no final de cada experimento, foi misturada com uma solução do corante “tripan blue” (1% em salina 0,9%) na proporção de 1:1. A integridade celular foi determinada por observação direta das preparações em câmara de Neubauer por microscopia óptica. A viabilidade celular foi sempre superior a 95%. A contagem global do número de macrófagos foi realizada após diluição das amostras na proporção de 10:1 com solução de cristal violeta em ácido acético. As células foram contadas em câmara de Neubauer, utilizando-se objetiva de imersão em óleo para contagem diferencial.

Produção de H₂O₂ por macrófagos

A produção de H₂O₂ por macrófagos foi medida por técnica modificada de Pick & Mizel (1981). As células foram incubadas em Erlenmeyers de 25 ml, previamente siliconizados (banhados com uma solução de silicone a 1% em acetona, secos em estufa a

80°C e lavados com água destilada para a retirada do excesso de silicone e restos de acetona), em 1 ml de PBS contendo glicose 5 mM e atmosfera de 5% CO₂ e 95% ar a 37°C. Após uma hora de incubação em banho maria, adicionou-se ao meio uma solução contendo fenol vermelho e peroxidase. Após 10 min, a reação foi interrompida pela adição de 100 µl de NaOH 1 N e o total de H₂O₂ formado foi quantificado espectrofotometricamente em 620 nm.

CuZn-SOD e Mn-SOD

As SODs catalisam a seguinte reação de dismutação do O₂⁻:



A determinação das SODs foi efetuada utilizando-se uma adaptação da técnica descrita por Marklund (1985), que se baseia na dismutação do O₂⁻ acompanhada espectrofotometricamente em 250 nm em espectrofotômetro DMR-10 Zeiss. O meio de extração para a SOD contém fosfato de sódio 0,1 M em pH 7,0. Esse meio de extração é o mesmo utilizado para a catalase e GPX. O ensaio foi feito no homogeneizado após centrifugação a 2.000 g por 10 min. Para o estudo da atividade da SOD total (CuZn-SOD + Mn-SOD + EC-SOD), a cubeta amostra recebeu 10 µl do homogeneizado, 20 µl de catalase, em 955 µl de tampão de ensaio (2,2-aminometilpropanol-1 50 mM, pH 10,1), em um volume final de ensaio de 1 ml. Estes mesmos volumes foram adicionados para a cubeta "referência". O espectrofotômetro foi zerado nessas condições e adicionou-se 15 µl de solução de KO₂ à cubeta "amostra", preparado no momento da leitura. A qual continha 8 mg de KO₂ em 2 ml de NaOH 50 mM em água, contendo DTPA 0,5 mM, mantida constantemente no gelo. Com a adição do KO₂, iniciou-se o registro temporal da absorbância a 250 nm.

Catalase

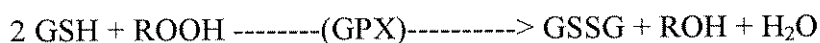
A catalase catalisa a seguinte reação de decomposição do H₂O₂:



A determinação da atividade da catalase foi realizada utilizando-se a técnica descrita por Beutler (1975), que consiste no acompanhamento espectrofotométrico da decomposição do H₂O₂ em 230 nm. O meio de ensaio consistiu de Tris-HCl 1 M, EDTA 5 mM, pH 8,0, e H₂O₂ 10 mM ao qual adicionou-se 10 µl de amostra e completou-se com água desionizada o volume final de 1 ml.

Glutathione peroxidase

A GPX catalisa a redução de hidroperóxidos orgânicos (ROOH) e H_2O_2 utilizando para isso o poder redutor da GSH e NADPH:



A determinação da atividade da GPX baseou-se na medida da velocidade de oxidação da GSH por hidroperóxido de *terc*-butila, na presença da amostra a ser ensaiada. As medidas foram realizadas acoplando-se a este sistema a redução imediata da GSSG por NADPH na presença de glutathione reductase (GRD). O decréscimo da absorbância do NADPH foi acompanhado a 340 nm (Maral *et alii.*, 1977). O meio de ensaio é composto de 20 mM NADPH, 1 mM de GSH, 5 mM de EDTA e 3 U de GRD em tampão fosfato 0,1 M em pH 7,0, ao qual adicionou-se 10 μl de hidroperóxido de *terc*-butila 0,1 mM, completando-se o volume final para 1 ml.

Cálculos

O cálculo da atividade da SOD total foi feito com base na constante de velocidade da reação de pseudo-primeira ordem do desaparecimento do O_2^- , quando sua concentração cai de 8 para 4 μM , ou seja, A_{250} cai de 0,016 para 0,008 unidades. Define-se uma unidade de SOD como a quantidade de enzima que fornece neste ensaio uma constante de velocidade de reação de $0,1 \text{ s}^{-1}$. Sendo assim, o número de unidades no ensaio pode ser calculado pela expressão abaixo:

$$U = 10 \times \frac{0,693}{t(\text{SOD})} - \frac{0,75}{t(\text{exp})} \quad (1)$$

Onde: U = é o número de unidades totais de SOD no ensaio;
t = é o tempo em segundos para a referida queda de absorbância:
reação catalisada, t(SOD), e reação espontânea, t(exp).

Para a distinção entre CuZn-SOD (citossólica), Mn-SOD (mitocondrial) e EC-SOD (extracelular) utilizou-se NaCN na concentração final de 3 mM. Essa concentração provoca inibição de 99,8% da atividade da CuZn-SOD e 99,96% da EC-SOD, respectivamente (Marklund, 1985). Considerando-se estes aspectos ligados à inibição da SOD pelo cianeto, a MnSOD pode ser calculada pela seguinte expressão:

$$\text{Mn SOD} = \frac{\text{SOD cianeto resistente} - 0,002 \times \text{SOD total}}{0,88 - 0,002} \quad (2)$$

A SOD cianeto-resistente é obtida pela equação (1); como a inibição por cianeto não é total (100%), os valores 0,002 e 0,88 são subtraídos na expressão. Portanto, a atividade da CuZn-SOD é obtida pela expressão abaixo:

$$\text{SOD total} - \text{Mn SOD} = \text{CuZn SOD} \quad (3)$$

Como não existe inibidor que discrimine eficientemente a CuZn-SOD da EC-SOD, os valores obtidos pela equação 3 representam, na verdade, a soma da CuZn-SOD e EC-SOD. Os cálculos da atividade das demais enzimas acima referidas (catalase e GPX) foram feitos conforme a equação:

$$\frac{\text{dAbs/dt} \times \text{V.T.E}}{\text{coef. ext.} \times \text{V.A}} \times \text{diluição da amostra}$$

dAbs = diferença de absorbância inicial e final; dt = diferença do tempo inicial e final; V.T.E = volume total do ensaio; V.A = volume de amostra.

Tratamento estatístico

Utilizamos análise de variância ("Two-way" ANOVA) para amostras não pareadas. Quando obtivemos diferença significativa entre as médias experimental e controle, aplicamos o teste *t* de Student para $p < 0,01$ (Mattson, 1981).

RESULTADOS

1. Estudos com macrófagos residentes

Os efeitos das disfunções hormonais induzidas em ratos sobre as atividades das enzimas CuZn-SOD, Mn-SOD, catalase e GPX de macrófagos estão mostrados na Tabela 1. A desmedulação das adrenais reduziu a atividade da Mn-SOD (54%) e GPX (38%), enquanto que a administração de dexametasona diminuiu a atividade da Mn-SOD (27%) e aumentou a da catalase (34%) e GPX (26%). O hipertireoidismo reduziu a atividade da Mn-SOD (38%), catalase (34%) e GPX (29%). Hormônios tireoidianos fornecidos em excesso aumentaram pronunciadamente a atividade da Mn-SOD (210%) mas reduziu a da GPX (68%). O diabetes induzido por aloxana promoveu redução acentuada da atividade da CuZn-SOD (61%), catalase (76%) e GPX (24%), enquanto que um incremento de atividade foi obtido com a Mn-SOD (130%). O jejum de 24 h não modificou as alterações obtidas em relação à atividade das enzimas antioxidantes de macrófagos de ratos diabéticos. A administração de insulina (2 U/kg de peso corporal) reverteu totalmente as alterações promovidas pelo diabetes. A produção de H_2O_2 por macrófagos residentes foi reduzida devido à disfunção hormonal. Comparados com ratos controles, a redução foi de 50% para desmedulação das adrenais, hipo e hipertireoidismo, 90% para ratos tratados com dexametasona e diabéticos e 34% para ratos diabéticos tratados com insulina.

Os resultados obtidos de macrófagos cultivados com hormônios estão mostrados na Tabela 2. A adição de insulina ao meio de cultura elevou a atividade da CuZn-SOD (45%), catalase (35%) e GPX (21%) e a da Mn-SOD diminuída em 46%. Hormônios tireoidianos elevaram a atividade da CuZn-SOD (58%) e Mn-SOD (56%) mas reduziram a da GPX (48%). A dexametasona adicionada ao meio de cultura reduziu a atividade da Mn-SOD e GPX em 59% e 47%, respectivamente. A produção de H_2O_2 de macrófagos cultivados foi aumentada (17%) pela adição de insulina e reduzida pelos hormônios tireoidianos (29%) e dexametasona (54%). Os experimentos com epinefrina não foram realizados porque este hormônio reage diretamente com o O_2^- . A avaliação dos efeitos da epinefrina sobre a atividade das enzimas antioxidantes de macrófagos foi desenvolvida *in vivo* pela remoção da medula das adrenais, como descrito na Tabela 2.

TABELA 1: Efeito de varias disfunções hormonais sobre a atividade de enzimas antioxidantes e produção de H_2O_2 de macrófagos residentes.

GRUPOS	CuZn-SOD	Mn-SOD	Catalase	GPX	H_2O_2
Controle	329 ± 20	3,7 ± 0,4	5,0 ± 0,5	357 ± 10	6,1 ± 0,4
ADM	355 ± 19	1,7 ± 0,2*	5,1 ± 0,5	223 ± 6*	3,0 ± 0,7*
ADM(-)	330 ± 2,5	3,5 ± 0,2	4,9 ± 0,3	343 ± 17	5,4 ± 0,3
Dexa	335 ± 19	2,7 ± 0,2*	6,7 ± 0,5*	453 ± 30*	0,7 ± 0,1*
Salina I	320 ± 12	3,6 ± 0,3	5,2 ± 0,4	329 ± 28	5,9 ± 0,2
Hipot	320 ± 17	2,3 ± 2,0*	3,3 ± 0,2*	254 ± 5*	3,1 ± 0,3*
Hipot(-)	342 ± 15	4,0 ± 0,5	4,8 ± 0,2	340 ± 29	6,0 ± 0,7
Hipert	327 ± 18	11,5 ± 0,6*	4,2 ± 0,3	114 ± 2*	2,9 ± 0,8*
Salina II	327 ± 16	3,8 ± 0,3	5,3 ± 0,4	341 ± 17	5,7 ± 0,4
Diabetes	127 ± 8,0*	8,5 ± 0,6*	1,2 ± 0,1*	273 ± 22*	0,5 ± 0,1*
Diab-Jejum	119 ± 8,0*	9,0 ± 0,6*	1,5 ± 0,1*	234 ± 10*	0,5 ± 0,1*
Diab-Insulina	345 ± 27	4,0 ± 0,3	5,0 ± 0,3	345 ± 11	4,0 ± 0,3*
Diab-Salina	321 ± 32	3,6 ± 0,3	4,7 ± 0,4	326 ± 19	5,3 ± 0,3

Macrófagos residentes foram obtidos por lavagem com salina fria da cavidade intraperitoneal de ratos submetidos a tratamentos que causaram diferentes disfunções hormonais. As células foram então cultivadas por 4 h para obter somente macrófagos na preparação. Após este período, os macrófagos foram removidos e homogeneizados em meio de extração para o ensaio enzimático e produção de H_2O_2 . Para maiores detalhes referentes à indução de disfunções hormonais, preparação celular, ensaio enzimático e mensuração de H_2O_2 ver Materiais e Métodos. As atividades da CuZn-SOD, Mn-SOD e catalase estão expressas como $\mu\text{mol}/\text{min}$ por 10^{10} células e da GPX como nmol/min por 10^{10} células. A produção de H_2O_2 como nmol/hora por 10^{10} células. Os valores estão apresentados como Média \pm desvio padrão de 8 ratos por grupo. **Abreviações:** ADM, desmedulação adrenal; Dexa, ratos tratados com dexametasona; Hipot, ratos com hipotireoidismo; Hipert, ratos com hipertireoidismo; Diab, ratos com diabetes induzida por aloxana; Diab-jejum, ratos diabéticos submetidos a 24 h de jejum (normoglicemia mas baixa insulinemia); Diab-insulina, ratos diabéticos injetados diariamente com insulina (2 U/kg de peso corporal); ADM(-), Hipot(-), ratos falsos operados demonstraram resultados similares ao grupo controle. Salina I, ratos injetados com salina seguindo os procedimentos do tratamento com dexa; Salina II, ratos injetados com salina seguindo os procedimentos de injeção com hormônios tireoidianos. Para esses grupos, os resultados não foram diferentes do controle. Diab-salina, ratos diabéticos injetados com salina de acordo com procedimento adotado para tratamento de ratos diabéticos com insulina. SOD, superóxido dismutase; GPX, glutathione peroxidase. * $p < 0,01$ para comparação entre grupo controle e grupo tratado (teste- t de Student).

TABELA 2: Efeito da insulina, hormônios tireoidianos e dexametasona sobre a atividade de enzimas antioxidantes e produção de H_2O_2 de macrófagos cultivados por 24 h.

GRUPOS	CuZn-SOD	Mn-SOD	Catalase	GPX	H_2O_2
Controle	323 ± 22	$3,9 \pm 0,4$	$4,8 \pm 0,4$	349 ± 11	$2,8 \pm 0,2$
Insulina (1U/ml)	$471 \pm 27^*$	$2,1 \pm 0,4^*$	$6,5 \pm 0,7^*$	$423 \pm 12^*$	$3,3 \pm 0,2^*$
T_3/T_4 (120/30 μ g/ml)	$541 \pm 29^*$	$6,1 \pm 0,2^*$	$5,0 \pm 0,4$	$183 \pm 13^*$	$2,0 \pm 0,2^*$
Dexametasona (2mg/ml)	312 ± 17	$1,6 \pm 0,2^*$	$4,7 \pm 0,4$	$184 \pm 12^*$	$1,3 \pm 0,1^*$

Macrófagos, obtidos da cavidade intraperitoneal de ratos, foram cultivados como descrito em Materiais e Métodos. As atividades das enzima CuZn- e Mn-SOD estão expressas como μ mol/min por 10^{10} células, enquanto que a da GPX como nmol/min por 10^{10} células. A produção de H_2O_2 como nmol/hora por 10^{10} células. Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão de 6 placas para três diferentes preparações celulares. SOD, superóxido dismutase; GPX, glutathione peroxidase. * * $p < 0,01$ para comparação entre o controle e o experimental (teste-*t* de Student).

2. Diabetes Melittus

A atividade da CuZn-SOD (Tabela 3) foi elevada no timo (162%) e diminuída no baço (27%), quando comparado com o grupo controle. A atividade da Mn-SOD foi alterada somente no LNM e baço, sendo diminuída em 41% e 33% respectivamente para esses órgãos (Tabela 4). A atividade da catalase foi reduzida no LNM (38%) e baço (54%), sendo aumentada no timo (250%) devido ao diabetes (Tabela 5). Os resultados obtidos para a GPX após a indução de diabetes foram: aumento de atividade no LNM (125%) e timo (189%), sem qualquer alteração no baço (Tabela 6). Todos os resultados obtidos com o diabetes foram abolidos pelo tratamento com insulina (Tabelas 3-6).

TABELA 3: Atividade da CuZn-SOD de órgãos linfóides de ratos diabéticos induzidos por aloxana, diabéticos tratados com insulina (D + I) e diabéticos jejuados por 24 h (D + J). Os valores estão expressos como a média \pm desvio padrão de oito ratos por grupo.

CuZn-SOD ($\mu\text{mols/min por g de tecido} \times 10^3$)				
	Controle	Diabéticos	D + I	D + J
LNM	$23,4 \pm 1,7$	$24,0 \pm 2,1$	$23,4 \pm 2,4$	$25,0 \pm 2,3$
Timo	$15,8 \pm 0,8$	$42,0 \pm 2,5^*$	$17,0 \pm 1,5$	$39,7 \pm 3,4^*$
Baço	$43,7 \pm 2,0$	$30,2 \pm 2,3^*$	$39,5 \pm 3,4$	$28,5 \pm 2,3^*$

* $p < 0,01$ grupo tratado comparado com o controle (teste- t de Student)

LNM, linfonodo mesentérico.

TABELA 4: Atividade da Mn-SOD de órgãos linfóides de ratos diabéticos induzidos por aloxana, diabéticos tratados com insulina (D + I) e diabéticos jejuados por 24 h (D + J). Os valores estão expressos como a média \pm desvio padrão de oito ratos por grupo.

MnSOD ($\mu\text{mols/min por g de tecido} \times 10^3$)				
	Controle	Diabéticos	D + I	D + J
LNM	$0,33 \pm 0,01$	$0,20 \pm 0,006^*$	$0,36 \pm 0,02$	$0,19 \pm 0,007^*$
Timo	$0,24 \pm 0,02$	$0,20 \pm 0,009$	$0,25 \pm 0,02$	$0,19 \pm 0,008$
Baço	$0,65 \pm 0,05$	$0,40 \pm 0,009^*$	$0,56 \pm 0,04$	$0,45 \pm 0,008^*$

* $p < 0,01$ grupo tratado comparado com o controle (teste- t de Student)

LNM, linfonodo mesentérico.

TABELA 5: Atividade da catalase de órgãos linfóides de ratos diabéticos induzidos por aloxana, diabéticos tratados com insulina (D + I) e diabéticos jejuados por 24 h (D + J). Os valores estão expressos como a média \pm desvio padrão de oito ratos por grupo.

Catalase ($\mu\text{mols/min por g de tecido} \times 10^3$)				
	Controle	Diabéticos	D + I	D + J
LNM	$1,23 \pm 0,01$	$0,73 \pm 0,03^*$	$1,25 \pm 0,07$	$0,80 \pm 0,07^*$
Timo	$0,67 \pm 0,04$	$2,14 \pm 0,06^*$	$0,74 \pm 0,04$	$2,17 \pm 0,05^*$
Baço	$1,40 \pm 0,15$	$0,57 \pm 0,05^*$	$1,30 \pm 0,17$	$0,51 \pm 0,08^*$

* $p < 0,01$ grupo tratado comparado com o controle (teste- t de Student)

LNM, linfonodo mesentérico.

TABELA 6: Atividade da GPX de órgãos linfóides de ratos diabéticos induzidos por aloxana, diabéticos tratados com insulina (D + I) e diabéticos jejuados por 24 h (D + J). Os valores estão expressos como a média \pm desvio padrão de oito ratos por grupo.

GPX ($\mu\text{mols/min por g de tecido} \times 10^3$)				
	Controle	Diabéticos	D + I	D + J
LNM	$3,10 \pm 0,21$	$7,25 \pm 0,17^*$	$3,22 \pm 0,13$	$6,90 \pm 0,14^*$
Timo	$3,99 \pm 0,41$	$10,7 \pm 0,65^*$	$4,10 \pm 0,39$	$9,70 \pm 0,54$
Baço	$4,01 \pm 0,05$	$4,11 \pm 0,08$	$3,95 \pm 0,06$	$3,99 \pm 0,08$

* $p < 0,01$ grupo tratado comparado com o controle (teste- t de Student)

LNM, linfonodo mesentérico.

3. Hipertiroidismo e hipotiroidismo

As atividades da CuZn-SOD (Tabela 7) e Mn-SOD (Tabela 8) foram aumentadas nos órgãos linfóides, com valor médio para todos ficando em torno de 103% e 212%, respectivamente para cada enzima. Baixos valores de hormônios tireoidianos, promoveram queda da atividade da Mn-SOD em todos os órgãos linfóides, sendo significativa apenas para o LNM (38%). A atividade da catalase (Tabela 9) foi diminuída em todos órgãos linfóides, exceto para o LNM de ratos com hipertiroidismo. Por outro lado, o hipotiroidismo diminuiu a atividade da catalase somente no timo (32%). A atividade da GPX (Tabela 10) foi pouco alterada pelo hipertiroidismo, sendo significativa para o timo (53%). Apesar disso, o hipertiroidismo a elevou no baço (98%) (Tabela 10). Os hormônios tireoidianos elevaram a atividade da CuZn-SOD (Tabela 7) e Mn-SOD (Tabelas 8) dos órgãos linfóides. Estes hormônios não afetaram de maneira similar a atividade da catalase (Tabela 9), que apresentou-se diminuída neles, principalmente no timo. Deve-se ressaltar que o hipotiroidismo promoveu diminuição da atividade da Mn-SOD e GPX nos órgãos linfóides.

TABELA 7: Atividade da CuZn-SOD de órgãos linfóides de ratos hipertiroideo (T^+) e hipotiroideo (T^-). Os valores estão expressos como a média \pm desvio padrão de oito ratos por grupo.

CuZn-SOD ($\mu\text{mol}/\text{min}$ por g de tecido $\times 10^3$)			
	Controle	T^+	T^-
LNM	$25,4 \pm 1,7$	$42,2 \pm 1,5^*$	$20,4 \pm 2,0$
Timo	$16,4 \pm 2,1$	$47,1 \pm 1,5^*$	$16,0 \pm 3,0$
Baço	$42,1 \pm 1,9$	$58,0 \pm 2,2$	$47,0 \pm 3,0$

* $p < 0,01$ grupo tratado comparado com o controle (teste- t de Student)

LNM, linfonodo mesentérico.

TABELA 8: Atividade da Mn-SOD de órgãos linfóides de ratos hipertiroideo (T^+) e hipotiroideo (T^-). Os valores estão expressos como a média \pm desvio padrão de oito ratos por grupo.

Mn-SOD ($\mu\text{mols/min por g de tecido} \times 10^3$)			
	Controle	T^+	T^-
LNM	$0,32 \pm 0,02$	$1,20 \pm 0,024^*$	$0,20 \pm 0,02^*$
Timo	$0,21 \pm 0,02$	$1,10 \pm 0,030^*$	$0,16 \pm 0,02$
Baço	$0,61 \pm 0,02$	$1,34 \pm 0,090^*$	$0,56 \pm 0,02$

* $p < 0,01$ grupo tratado comparado com o controle (teste- t de Student)

LNM, linfonodo mesentérico.

TABELA 9: Atividade da catalase de órgãos linfóides de ratos hipertiroideo (T^+) e hipotiroideo (T^-). Os valores estão expressos como a média \pm desvio padrão de oito ratos por grupo.

Catalase ($\mu\text{mols/min por g de tecido} \times 10^3$)			
	Controle	T^+	T^-
LNM	$1,17 \pm 0,10$	$0,89 \pm 0,02$	$0,90 \pm 0,01$
Timo	$0,65 \pm 0,01$	$0,43 \pm 0,02^*$	$0,44 \pm 0,03^*$
Baço	$1,30 \pm 0,12$	$0,43 \pm 0,24^*$	$1,45 \pm 0,31$

* $p < 0,01$ grupo tratado comparado com o controle (teste- t de Student)

LNM, linfonodo mesentérico.

TABELA 10: Atividade da GPX de órgãos linfóides de ratos hipertiroideo (T^+) e hipotiroideo (T^-). Os valores estão expressos como a média \pm desvio padrão de oito ratos por grupo.

GPX ($\mu\text{mols/min por g de tecido} \times 10^3$)			
	Controle	T^+	T^-
LNM	$3,25 \pm 0,17$	$3,49 \pm 0,21$	$3,44 \pm 0,15$
Timo	$3,85 \pm 0,54$	$1,80 \pm 0,11^*$	$2,21 \pm 0,12^*$
Baço	$4,28 \pm 0,07$	$8,49 \pm 0,37^*$	$3,80 \pm 0,09$

* $p < 0,01$ grupo tratado comparado com o controle (teste- t de Student)

LNM, linfonodo mesentérico.

4. Tratamento com dexametasona (DEXA).

A atividade da CuZn-SOD (Tabela 11) foi reduzida em todos os órgãos estudados devido à administração de DEXA: LNM (72%), Timo (75%) e baço (87%). Por sua vez, a atividade da Mn-SOD (Tabela 11) diminuiu apenas no LNM (54%). A administração de DEXA reduziu a atividade da catalase (Tabela 12) no LNM (30%) e timo (45%) e elevou no baço (43%). A atividade da GPX (Tabela 12) do LNM (57%), timo (32%) e baço (50%) apresentou-se elevada.

Tabela 11: Atividade da CuZn-SOD e Mn-SOD de órgãos linfóides de ratos tratados com Dexametasona (DEXA). Os valores estão expressos como a média \pm desvio padrão de oito ratos por grupo.

$\mu\text{mols/min por g de tecido}$				
	CuZn-SOD $\times 10^3$		Mn-SOD $\times 10^3$	
	Controle	DEXA	Controle	DEXA
LNM	$25,2 \pm 2,2$	$7,1 \pm 0,4^*$	$0,33 \pm 0,02$	$0,15 \pm 0,01^*$
Timo	$16,2 \pm 2,1$	$4,0 \pm 0,1^*$	$0,21 \pm 0,02$	$0,19 \pm 0,05$
Baço	$42,3 \pm 2,0$	$5,5 \pm 4,6^*$	$0,61 \pm 0,02$	$0,65 \pm 0,08$

* $p < 0,01$ grupo tratado comparado com o controle (teste- t de Student)

LNM, linfonodo mesentérico.

TABELA 12: Atividade da catalase e GPX de órgãos linfóides de ratos tratados com dexametasona (DEXA). Os valores estão expressos como a média \pm desvio padrão de oito ratos por grupo.

$\mu\text{mols/min por g de tecido}$				
	Catalase $\times 10^3$		GPX $\times 10^3$	
	Controle	DEXA	Controle	DEXA
LNM	$1,17 \pm 0,10$	$0,81 \pm 0,09^*$	$3,25 \pm 0,17$	$5,10 \pm 0,20^*$
Timo	$0,61 \pm 0,01$	$0,34 \pm 0,01^*$	$3,84 \pm 0,54$	$5,18 \pm 0,48^*$
Baço	$1,30 \pm 0,13$	$1,85 \pm 0,08^*$	$4,28 \pm 0,07$	$6,45 \pm 0,34^*$

* $p < 0,01$ grupo tratado comparado com o controle (teste- t de Student)

LNM, linfonodo mesentérico.

5. Desmedulação das adrenais

As atividades das enzimas antioxidantes foram modificadas de forma pronunciada pela remoção das medulas adrenais. A atividade da CuZn-SOD (Tabela 13) aumentou no LNM (126%) e timo (223%). A atividade da Mn-SOD (Tabela 14) foi reduzida no LNM (67%) e no baço (26%), mas aumentou no timo (142%), enquanto que a da catalase (Tabela 15) foi reduzida no LNM (76%) e timo (54%). Com relação a GPX (Tabela 16), a sua atividade não foi detectada nos órgãos estudados de ratos com desmedulação das adrenais.

TABELA 13: Atividade da CuZn-SOD de órgãos linfóides de ratos adrenodesmedulados (ADM). Os valores estão expressos como a média \pm desvio padrão de oito ratos por grupo.

CuZn-SOD ($\mu\text{mols/min por g de tecido} \times 10^3$)			
	Controle	Falso operados	ADM
LNM	$24,3 \pm 1,6$	$23,4 \pm 2,2$	$56,1 \pm 3,4^*$
Timo	$16,4 \pm 2,1$	$16,2 \pm 2,1$	$51,3 \pm 3,1^*$
Baço	$42,4 \pm 1,9$	$43,1 \pm 2,0$	$75,2 \pm 4,6^*$

* $p < 0,01$ grupo tratado comparado com o controle (teste- t de Student)

LNM, linfonodo mesentérico.

TABELA 14: Atividade da Mn-SOD de órgãos linfóides de ratos adrenodesmedulados (ADM). Os valores estão expressos como a média \pm desvio padrão de oito ratos por grupo.

Mn-SOD ($\mu\text{mols/min por g de tecido} \times 10^3$)			
	Controle	Falso operados	ADM
LNM	$0,32 \pm 0,02$	$0,30 \pm 0,02$	$0,11 \pm 0,02^*$
Timo	$0,21 \pm 0,02$	$0,18 \pm 0,03$	$0,50 \pm 0,02^*$
Baço	$0,61 \pm 0,02$	$0,54 \pm 0,03$	$0,46 \pm 0,02^*$

* $p < 0,01$ grupo tratado comparado com o controle (teste- t de Student)

LNM, linfonodo mesentérico.

TABELA 15: Atividade da catalase de órgãos linfóides de ratos adrenodesmedulados (ADM). Os valores estão expressos como a média \pm desvio padrão de oito ratos por grupo.

Catalase ($\mu\text{mols/min por g de tecido} \times 10^3$)			
	Controle	Falso operados	ADM
LNM	$1,17 \pm 0,10$	$0,99 \pm 0,02$	$0,28 \pm 0,01^*$
Timo	$0,65 \pm 0,01$	$0,55 \pm 0,02$	$0,28 \pm 0,01^*$
Baço	$1,30 \pm 0,12$	$1,12 \pm 0,02$	$1,13 \pm 0,02$

* $p < 0,01$ grupo tratado comparado com o controle (teste- t de Student)

LNM, linfonodo mesentérico.

TABELA 16: Atividade da GPX de órgãos linfóides de ratos adrenodesmedulados (ADM). Os valores estão expressos como a média \pm desvio padrão de oito ratos por grupo.

GPX ($\mu\text{mols/min por g de tecido} \times 10^3$)			
	Controle	Falso operados	ADM
LNM	$3,25 \pm 0,17$	$3,49 \pm 0,21$	ND
Timo	$3,85 \pm 0,14$	$3,80 \pm 0,11$	ND
Baço	$4,28 \pm 0,07$	$4,49 \pm 0,07$	ND

* $p < 0,01$ grupo tratado comparado com o controle (teste- t de Student)

LNM, linfonodo mesentérico, ND= não detectada.

DISCUSSÃO

Estudos realizados com macrófagos

Glicocorticóides

Os glicocorticóides, quando presentes no plasma em concentração elevada, podem regular as respostas inflamatória e imunitária através da (1) redução da síntese de prostaglandinas (Garcia-Leme, 1985) e da (2) inibição na produção de IL-1 por macrófagos (Rey *et alii.*, 1987), podendo alterar, inclusive, a funcionalidade de linfócitos (Serrano *et alii.*, 1993). Os resultados obtidos do tratamento que realizamos com a dexametasona induziu efeitos que também podem estar relacionados com essas funções desempenhadas por macrófagos. De fato, os glicocorticóides alteraram a produção de H_2O_2 e a atividade de enzimas antioxidantes de macrófagos tanto *in vivo* como *in vitro* (Tabelas 1 e 2). Os dados obtidos referentes à menor produção de H_2O_2 por macrófagos devido ao tratamento com dexametasona estão de acordo com os de outros autores (Dweik *et alii.*, 1997; Rishol *et alii.*, 1995; Maridonneau-Parini *et alii.*, 1989). A menor produção de H_2O_2 por macrófagos, nesta condição, pode ser devido: 1) ao efeito antioxidante desempenhado pelos glicocorticóides, como descrito por Hidalgo *et alii.* (1991), quando realizaram estudos com fígados de animais tratados com dexametasona em que observaram efeito inibitório sobre a produção hepática de lipoperóxidos. 2) outra possibilidade seria a inibição do complexo da NADPH oxidase pela dexametasona devido a capacidade proteolítica exibida pelos glicocorticóides (Dweik *et alii.*, 1997; Rishol *et alii.*, 1995; Maridonneau-Parini *et alii.*, 1989). 3) além disso, a maior capacidade antioxidante contra H_2O_2 apresentada por macrófagos de animais tratados com dexametasona ou incubados, detectada nesta tese, também poderia estar envolvida no processo de redução de produção de H_2O_2 por macrófagos.

De fato, os macrófagos tratados com dexametasona apresentaram maior atividade de catalase e GPX, comparado com o controle, as quais desempenham papel fundamental no controle das concentrações intracelulares de H_2O_2 e lipoperóxidos (Tabela 1). Além disso, a menor atividade exibida pela Mn-SOD, nestas condições, poderia representar ocorrência de menor atividade mitocondrial responsável pela produção do ânion O_2^- e H_2O_2 . Estes dados também poderiam explicar aqueles obtidos por Hidalgo *et alii.* (1991). Resultados obtidos por Rjashree & Puvanakrishnan (1998) com rim de ratos foram parecidos aos descritos nesta tese, ou seja, maior atividade de catalase, SOD e GPX devido ao tratamento de ratos com dexametasona. Contudo, esse aumento de atividade de enzimas antioxidantes devido ao tratamento com glicocorticoide revelou ser tecido específico, pois, no estudo realizado por Rjashree & Puvanakrishnan (1998), os autores relataram queda de atividade de enzimas antioxidantes no coração. José *et alii.* (1997) demonstraram que, no pulmão, a quantidade e atividade das enzimas antioxidantes são elevadas pelo tratamento com dexametasona. Contudo, quando comparamos os resultados descritos nas Tabelas 1 e 2, os obtidos *in vivo* não foram totalmente reproduzidos *in vitro*. Somente a queda na atividade da Mn-SOD e a não alteração da atividade da CuZn-SOD, devido a adição de dexametasona ao meio de cultura (Tabelas 1), foram similares ao obtido pelo tratamento com dexametasona (Tabela 2). Ou seja, os glicocorticóides parecem controlar a atividade dessas enzimas de forma mais

evidente comparado com as demais enzimas antioxidantes estudadas. Por outro lado, a atividade da GPX, que havia aumentado pelo tratamento com dexametasona, diminuiu quando os macrófagos foram incubados com esse hormônio, enquanto que a atividade da catalase não foi alterada significativamente (Tabela 5), embora tenha sido aumentado no tratamento de ratos. Esta discrepância de resultados, obtidos para a GPX e catalase, pode ser devido à modificações dos valores plasmáticos dos hormônios adrenocorticotrófico (ACTH) e liberador de corticotrofina (CRH), quando se administra glicocorticóides *in vivo*. A influência desses hormônios sobre a atividade das enzimas antioxidantes ainda não foi avaliada.

Catecolaminas

O estresse oxidativo pode influenciar a função imunitária e inflamatória de humanos e de animais experimentais (Hassan & Douglas, 1990), sendo que a maioria das investigações nesta área enfatiza o papel desempenhado pelos glicocorticóides na redução da função imunitária (Oyanagui, 1997^{a,b}; Miller *et alii.*, 1991; Mason, 1991; Fleming *et alii.*, 1991). Contudo, as catecolaminas, hormônios tireoidianos e insulina também podem modificar a funcionalidade imunitária e inflamatória (Dweik *et alii.*, 1997; Cohn & Roth, 1996). Com relação às catecolaminas, foi demonstrado que durante situações de estresse o sistema nervoso simpático é estimulado provocando liberação de epinefrina mais intensamente pela medula adrenal (Maisel *et alii.*, 1991; Delahunt & Mellsop, 1987). As consequências são: aumento da capacidade proliferativa de células CD4⁺ e CD8⁺ via receptores α com inibição paralela da proliferação das células CD4⁺ através de receptores β (Yu & Clementes, 1976; Landmann *et alii.*, 1984; Weicker & Werle, 1991). Além disso, Fry *et alii.* (1991) propuseram que o efeito da epinefrina em reduzir a funcionalidade de linfócitos deve ser mediada pela elevação da concentração intracelular de cAMP. Isso levou muitos pesquisadores a investigar o envolvimento desse hormônio com a diminuição da função imunitária durante várias condições estressantes (Dweik *et alii.*, 1997). Por exemplo, trabalhos realizados por Costa Rosa *et alii.* (1992a) demonstraram que a epinefrina estimula a produção de H₂O₂ por macrófagos incubados. Isso foi confirmado na Tabela 1, já que a remoção da medula adrenal promoveu redução da produção de H₂O₂ por macrófagos residentes. Além disso, os resultados descritos na Tabela 1 indicam que a adrenalina pode regular a atividade da Mn-SOD e GPX dessas células. Ou seja, a presença de catecolaminas parece ser fundamental para que a atividade dessas enzimas seja mantida próxima dos valores normais. Isso ficou evidente com a remoção da medula das adrenais que promoveu queda das suas atividades (Tabela 1).

T₃ e T₄

Os hormônios tireoidianos também afetam a funcionalidade imunitária e inflamatória (Cohn & Roth, 1996; Garcia-Leme, 1985). Os hormônios tireoidianos afetam a proliferação de linfócitos (Paavonem, 1982), seu metabolismo (Costa Rosa *et alii.*, 1992b) e possuem efeitos antivirais (Lin *et alii.*, 1994). Contudo, o hipertireoidismo pode aumentar a sensibilidade periférica tecidual e celular às catecolaminas, o que poderia contribuir para

que os últimos exerçam a sua função em associação aos hormônios tireoidianos (Cohn & Ruth, 1996). A administração de hormônios tireoidianos em ratos promoveu alterações da capacidade pró e antioxidante destes animais (Tabelas 1 e 2). Ou seja, esses hormônios, assim como os glicocorticóides e catecolaminas, também alteram a funcionalidade dos sistemas enzimáticos de proteção antioxidante de macrófagos, podendo modificar a ação dessas células em processos imunitários e inflamatórios. Houve aumento acentuado da atividade da Mn-SOD de macrófagos de ratos tratados com hormônios tireoidianos (Tabela 1). O papel desempenhado por estes hormônios na regulação da atividade destas enzimas foi ainda mais evidenciado quando as tiróides foram removidas. Com efeito, a remoção das tiróides promoveu diminuição da atividade da Mn-SOD, catalase e GPX. Assim, parece que os hormônios tireoidianos exercem papel importante na conservação da atividade basal das enzimas antioxidantes. Além disso, houve aumento da atividade da CuZn-SOD quando T₃ e T₄ foram adicionados ao meio de cultura de macrófagos. Esta é uma condição farmacológica que pode ser responsabilizada pela discrepância de resultados obtidos *in vitro* comparado com os obtidos *in vivo*. A queda da atividade da GPX imposta pelos hormônios tireoidianos tanto *in vitro* como *in vivo* é um dado consistente de uma regulação direta.

Estudos realizados por outros pesquisadores demonstraram que o estado hipermetabólico provocado pelo hipertireoidismo acelera a produção de EROs intramitocondrialmente (Tapia *et alii.*, 1997; Asayma & Kato, 1990). Além disso, foi demonstrado que o TSH aumenta a atividade da Mn-SOD das tiróides (Nishida *et alii.*, 1997). Isso pode explicar a maior atividade da Mn-SOD descrita quando o hipertireoidismo foi induzido (Tabela 1) ou se incubou macrófagos com esses hormônios (Tabela 2). Outro fator importante, portanto, para o aumento do estresse oxidativo devido aos hormônios tireoidianos pode ter como causa a alteração da atividade de enzimas antioxidantes relatadas neste trabalho. De fato, o aumento de atividade da Mn-SOD, apesar de favorecer a remoção do O₂⁻ produzido intramitocondrialmente, eleva as concentrações intracelulares de H₂O₂ nessa organela; isso pode contribuir significativamente para a ocorrência de estresse oxidativo quando a atividade da GPX e da catalase encontra-se diminuída, como descrito nas Tabelas 1 e 2. Entretanto, esses resultados podem ter, também, relação com o efeito facilitador do efeito tecidual e celular do hipertireoidismo em relação às catecolaminas (Cohn & Roth, 1996).

Insulina

Modificações da atividade da SOD, GPX e catalase foram documentadas por estudiosos do diabetes em vários tecidos e órgãos (Faure *et alii.*, 1997; Atalay *et alii.*, 1997; Powers *et alii.*, 1996; Dohi *et alii.*, 1988; Gupta *et alii.*, 1990; Loven *et alii.*, 1986). Os resultados obtidos são bastante controversos e parecem depender do tecido e órgão estudados. Como mostrado na Tabela 1, o diabetes diminuiu a atividade da CuZn-SOD, catalase e GPX, mas aumentou a da Mn-SOD de macrófagos residentes. Estas modificações permaneceram quando a glicemia foi normalizada pelo jejum de 24 h e foram totalmente revertidas pelo tratamento com insulina. Estes dados podem ter relação direta com os altos índices de infecções e modificações da resposta inflamatória que normalmente acompanham pacientes diabéticos (Khan *et alii.*, 1990; Savin, 1974). Deve ser realçado que

a produção de H_2O_2 por macrófagos de ratos diabéticos é sensivelmente reduzida comparando-se com os valores do grupo controle, sendo que este resultado é revertido pela insulina administrada. De fato, a insulina estimula a produção de H_2O_2 por macrófagos tanto *in vivo* como *in vitro* (Tabela 1 e 2). Os resultados obtidos *in vivo* (Tabela 1) foram praticamente reproduzidos *in vitro* (Tabela 2). A adição de insulina ao meio de cultura aumentou as atividades da CuZn-SOD, catalase e GPX, mas reduziu a da Mn-SOD. Estes dados estão de acordo com o quadro geral de deficiência antioxidante encontrado em tecidos e células de diabéticos dependentes de insulina (Atalay *et alii.*, 1997).

Estudos realizados com órgãos linfóides

Insulina

É geralmente aceito que há quatro possibilidades através das quais se dá o envolvimento de EROs com o desenvolvimento das complicações características do diabetes (Baynes, 1991; Wolf *et alii.*, 1991). Primeiro, N' - (carboximetil) lisina, N' - (carboximetil) hidroxil-lisina e pentosidina fluorescente são formadas durante as reações de glicosilação e oxidação de açúcares e proteínas. Estes compostos, denominados produtos glicosilados, acumulam-se no colágeno com o envelhecimento, sendo exacerbado pelo diabetes (Harman, 1981). Além disso, já foi demonstrado que a glicosilação da CuZn-SOD em condições de hiperglicemia promove perda de atividade desta enzima (Wolf *et alii.*, 1991). Estudos realizados com modelos *in vitro* de glicosilação e oxidação de proteínas sugerem que tais produtos são marcadores biológicos de danos causados por esse processo (Wolf *et alii.*, 1991). Segundo, o diabetes promove estresse metabólico resultando em mudanças no metabolismo energético, principalmente na via de metabolização do sorbitol (Taylor & Agius, 1988) e no "status" do sistema antioxidante químico e enzimático (Atalay *et alii.*, 1997; Powers *et alii.*, 1996; Oberly, 1988; Loven *et alii.*, 1986). Terceiro, mudanças significativas no conteúdo de lipoperóxidos plasmáticos também ocorrem devido ao diabetes, particularmente em pacientes com complicações cardiovasculares (Sato *et alii.*, 1981). Finalmente, foi observado que a atividade formadora de EROs está aumentada no nervo siático devido ao diabetes experimental (Low & Nickander, 1991).

Nesta tese, demonstramos que o diabetes experimental promove alterações da atividade das enzimas antioxidantes de maneira diferenciada, dependendo do órgão linfóide estudado. Ou seja, a deficiência de insulina imposta pelo diabetes experimental, exerceu efeito negativo sobre a atividade da CuZn-SOD no baço (Tabela 3), da Mn-SOD no LNM e baço (Tabela 4) e da catalase no LNM e baço (Tabela 5), o que sugere que a deficiência da insulina pode interferir negativamente na atividade destas enzimas nos órgãos linfóides. Estes dados também foram relatados para o fígado, pâncreas, rins, eritrócitos, coração e ovários em decorrência do diabetes experimental e clínico (Powers *et alii.*, 1996). A atividade da GPX dos órgãos linfóides foi pouco afetada pela deficiência de insulina (Tabela 6). De fato, na ausência da insulina houve aumento da sua atividade. Portanto, a insulina altera a atividade da CuZn-SOD, Mn-SOD e catalase dos órgãos linfóides, sendo importante para que a atividade destas enzimas seja mantida normal nestes órgãos. Esta

elevada capacidade antioxidante enzimática, apresentada por estes órgãos, na condição de diabetes experimental, leva-nos a sugerir que as alterações ocorridas na funcionalidade imunitária não devem estar relacionadas com danos teciduais causados por EROs em órgãos linfóides. Contudo, as células circulantes podem ser mais sensíveis à propriedade imunossupressora dos lipoperóxidos (Bendich, 1990), cuja concentração plasmática encontra-se elevada em pacientes diabéticos (Sato *et alii.*, 1981); neste caso, os órgãos linfóides não devem ser a fonte principal de lipoperóxidos.

Dos órgãos linfóides estudados na condição de diabetes experimental, o timo parece ser o mais protegido contra o estresse oxidativo (Tabelas 3-6), pois este órgão apresentou atividade elevada de CuZn-SOD, catalase e GPX. A redução da hiperglicemia a valores normais (grupo jejuado por 24 h) não modificou a atividade das enzimas estudadas. Estes resultados confirmam que é a insulina, de fato, que altera a atividade das enzimas antioxidantes (CuZn-SOD, Mn-SOD e catalase) de órgãos linfóides e que este efeito não é mediado pela hiperglicemia. Isso foi comprovado pelo tratamento com insulina que reverteu totalmente as alterações das atividades das enzimas obtidas dos órgãos linfóides estudados no diabetes (Tabelas 3-6).

T₃ e T₄

Os hormônios tiroidianos aumentaram as atividades da CuZn-SOD e Mn-SOD dos órgãos linfóides, como mostrado nas Tabelas 7 e 8. Estes hormônios não tiveram efeito similar com a atividade da catalase (Tabela 9), que apresentou-se diminuída. Além disso, o hipotireoidismo provocou queda da atividade da Mn-SOD e da GPX (Tabela 10) nos órgãos linfóides. Estes dados indicam que os hormônios tiroidianos podem alterar as atividades da CuZn-SOD, Mn-SOD, catalase e GPX dos órgãos linfóides. O fato de que os hormônios tiroidianos aumentam o consumo de oxigênio de praticamente todos os tecidos metabolicamente ativos poderia explicar a elevação da atividade destas enzimas (McPhee *et alii.*, 1997), já que são ativadas quando ocorre aumento dos seus substratos (Traber, 1997). Entretanto, os órgãos linfóides comportam-se como exceções a esta regra, porque não ocorre aumento do consumo de oxigênio de órgãos linfóides na condição de hipertireoidismo (McPhee *et alii.*, 1997). Isto reforça a afirmação de que não são os substratos destas enzimas que aumentam as suas atividades mas, sim, a ação hormonal através de uma possível ação direta nos núcleos celulares dos órgãos linfóides alterando a velocidade de síntese destas proteínas.

Glicocorticóide

O tratamento com dexametasona reduziu a atividade da CuZn-SOD em todos os órgãos linfóides estudados (Tabela 11). Isto pode ser o reflexo da conhecida capacidade proteolítica dos glicocorticóides. Esse argumento contradiz o aumento do conteúdo de mRNA de células endoteliais de glomérulos bovinos e células glomerulares mesangliais de ratos tratados com glicocorticóides (Yoshioka *et alii.*, 1994). Portanto, independentemente do efeito proteolítico exercido pelos glicocorticóides, eles também são capazes de estimular a atividade e a síntese proteica. De fato, o rim e o fígado de animais tratados com

dexametasona apresentam aumento da atividade de enzimas antioxidantes (Rajashree & Puvanakrishnan, 1998). Por outro lado, o tratamento com dexametasona não afetou significativamente a atividade da Mn-SOD (Tabela 11) nos órgãos linfóides e a atividade da catalase (Tabela 13) apresentou-se com queda no LNM e aumentada no timo e baço. Portanto, a atividade da catalase parece ser afetada pelos glicocorticóides de maneira tecido-específica. Estes dados estão de acordo com os obtidos por outros pesquisadores que constataram que o tratamento com dexametasona diminui a atividade da catalase no hipotálamo (Davies *et alii.*, 1995) e no coração (Rajashree & Puvanakrishnan, 1998) mas aumenta nos rins (Rajashree & Puvanakrishnan, 1998). Com relação aos pulmões, alguns demonstraram a não alteração da sua atividade (Davies *et alii.*, 1995) enquanto outros encontraram elevação (José *et alii.*, 1997). O mesmo pode ser afirmado para a GPX, pois esta enzima teve a sua atividade elevada nos órgãos linfóides, como demonstrado nesta tese (Tabela 12), mas diminuída no hipocampo de ratos (McIntosh *et alii.*, 1995). Portanto, os glicocorticóides exercem efeitos diferenciados nos órgãos de ratos tratados com essa droga, incluindo os órgãos linfóides.

Catecolaminas

A deficiência de catecolaminas promoveu aumento da atividade da CuZn-SOD no LNM (Tabela 13) com concomitante queda da atividade da Mn-SOD (Tabela 14), catalase (Tabela 15) e GPX (Tabela 16) neste órgão. O aumento da atividade da CuZn-SOD no LNM, em conjunto com a queda na atividade das demais enzimas citadas, pode elevar as concentrações intracelulares de H_2O_2 , podendo desempenhar papel tóxico nas células desses órgãos. No timo, esse fato é mais evidente porque, além de a CuZn-SOD ter aumentado de atividade, a Mn-SOD também teve a sua elevada, o que pode contribuir mais decisivamente para a ocorrência desse possível efeito. Nossos resultados sugerem que a remoção da medula das adrenais (Tabelas 13-16) provoca mudanças no metabolismo oxidativo em órgãos linfóides devendo ser possivelmente causadas pela deficiência de catecolaminas. Além disso, no LNM as enzimas Mn-SOD, catalase e GPX dependem de catecolaminas para manterem as suas atividades próximas dos valores normais. Contudo, o timo comporta-se de maneira diferente dos demais órgãos linfóides de ratos deficientes de catecolaminas. Ou seja, enquanto o LNM e o baço perdem atividade da Mn-SOD, com a adrenodesmedulação, o timo apresenta resultado oposto, sugerindo que o timo não depende de catecolaminas para preservar a atividade da Mn-SOD e possivelmente a sua funcionalidade mitocondrial.

CONCLUSÃO

Insulina, glicocorticóides, hormônios tireoidianos e catecolaminas alteram as atividades das enzimas antioxidantes em órgãos linfóides e macrófagos assim como a produção de H_2O_2 tanto *in vivo* como *in vitro* em macrófagos. As mudanças observadas na atividade das enzimas antioxidantes de órgãos linfóides e macrófagos, causadas por esses hormônios, podem ter implicações importantes para o estabelecimento da redução na funcionalidade imunitária em doenças envolvendo esses hormônios.

SUMMARY

The effect of insulin, thyroid hormones, glucocorticoids (dexamethasone) and catecholamines on the activity of antioxidant enzymes (CuZn- and Mn-superoxide dismutase - SOD, catalase, and glutathione peroxidase - GPX) in rat resident intraperitoneal macrophages and lymphoid organs (mesenteric lymph nodes - MLN, thymus, and spleen) was investigated. For this purpose, adult rats were submitted to various hormonal disfunctions such as diabetes, hyper and hypothyroidism, dexamethasone treatment and adrenodemedullation. The effect of the hormones on macrophage cultures was also examined. In addition to the antioxidant enzyme assays, the production of hydrogen peroxide (H_2O_2) by macrophages was determined both *in vivo* and *in vitro*. In macrophages: 1) Insulin raised the activity of CuZn-SOD, catalase and GPX but reduced that of Mn-SOD, 2) Thyroid hormones increased the activity of CuZn- and Mn-SOD but decreased that of GPX, whereas dexamethasone diminished both Mn-SOD and GPX activities, 3) The removal of adrenal medulla caused a marked decrease of Mn-SOD and GPX activities, 4) H_2O_2 production was increased by insulin but reduced by thyroid hormone and dexamethasone treatment. The induction of diabetes caused the following changes in antioxidant enzyme activities of the lymphoid organs: Reduction (except for GPX) in the spleen, increase (except for Mn-SOD) in the thymus, decrease of Mn-SOD and catalase but increase of GPX in the MLN; all these changes were reversed by insulin treatment and remained unchanged under normoglycemia. The hyperthyroidism provoked an elevation of CuZn- and Mn-SOD activities and decrease of catalase in all lymphoid organs. Dexamethasone treatment caused: 1) A decrease of CuZn-SOD activity in all lymphoid organs and of Mn-SOD in the MLN, 2) A reduction of catalase activity in the MLN and thymus and an increase in the spleen, 3) An augmentation of GPX activity in the MLN, thymus and spleen. Adrenodemedullation raised CuZn-SOD activity in all lymphoid organs, decreased the activity of Mn-SOD in the MLN and spleen but increased the latter activity in the thymus, whereas catalase activity was reduced in the MLN and thymus and GPX activity became undetectable under these conditions. These findings support the proposition that the antioxidant enzyme activities are altered by insulin, thyroid hormones, glucocorticoids and adrenalin. These metabolic changes are tissue-specific and might play a role in the impairment of the immune function under endocrine disfunctions involving these hormones.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AARSTAD, H.J., KOLSET, S.O. & SELJELID, R. (1991) The effect of stress *in vivo* on the function of mouse macrophages *in vitro*. *Scand. J. Immunol.* **33**: 673-681.
- ANTRAS-FERRY, J., MAHÉO, K., MOREL, F., GUILLOUZO, A., CILLARD, P., CILLARD, J. (1997) Dexamethasone differently modulates TNF-alpha- and IL-1Beta induced transcription of the hepatic Mn-superoxide dismutase gene. *FEBS Lett.* **403**: 100-104.
- ARUOMA, O.I. (1994). Free radicals and antioxidant strategies in sports. *J. Nutr. Biochem.* **5**:370-381.
- ASAYAMA, K. & KATO, K. (1990). Oxidative muscular injury and its relevance to hyperthyroidism. *Free Rad. Biol. Med.* **8**:293-303.
- ASAYAMA, K.; DOBASHI, K.; HAYASHIBE, H.; MEGATA, Y. & KATO, K. (1987). Lipid peroxidation and free radical scavengers in thyroid dysfunction in the rat: a possible mechanism of injury to heart and skeletal muscle in hyperthyroidism. *Endocrinol.* **121**:2112-2118.
- ATALAY, M.; LAAKSONEN, D.E.; NISKANEN, L.; UUSITUPA, M.; HANNINEN, O.; SEN, C.K. (1997). Altered antioxidant enzyme defenses in insulin-dependent diabetic men with increased resting and exercise-induced oxidative stress. *Acta Physiol. Scand.* **161**:195-201.
- BAXTER, M., LESLIE, R. & REEVES, W. (1983). The stimulation of superoxide anion production in guinea-pig peritoneal macrophages and neutrophils by phorbol myristate acetate, opsonized zymosan and IgG2-containing soluble complexes. *Immunology* **48**: 657-665.
- BAYNES, J.W. (1991). Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes* **40**: 405-412.
- BEHL, C.; LEZOUALCH, F.; TRAPP, T.; WINDAMANN, M.; SKUTELLA, T.; HOLSBOER, F. (1997). Glucocorticoids enhance oxidative stress-induced cell death in hippocampal neurons *in vitro*. *Endocrinol.* **138**:101-106.
- BENDICH, A. (1990). Antioxidant nutrients and immune functions. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Bendich, A., Phillips, M. & Tergerdy, R.P. (Eds.). Plenum Press, N.Y. and London.
- BENZI, G. (1993). Aerobic performance and oxygen free-radicals. *The J. Sports Med. Phys. Fitness.* **33**:205-222.
- BEUTLER, E. (1975) *Red cell metabolism*. Greene & Straton, New York.

- BUTTERICK, C., BAEHNER, R., BOXER, L. & JERSILD, R. (1983). Vitamin E-selective inhibitor of the NADPH oxidoreductase enzyme system in human granulocytes. *Am. J. Pathol.*, **112**: 287-293.
- CHANDRA, R.K. (1990). Cellular and molecular basis of nutrition-immunity interactions. In: *Advances in Exp. Med. Biol.* Bendich, A; Phillips, M.; and Tergerdy, R.P. (Eds). Plenum Press. N.Y. and London.
- CHUKLOVINA, M.L.; ZOZULIAKOVA, S.V. & ZALKIND, L.G. (1990). Biological significance of thymus hormone deficiency during physical stress. *Gig. Sanit (Index Medicus Abstract)* **1**:64-7.
- COHN, R.M. & ROTH, K.S. (1996). *Biochemistry and disease*. Baltimore: Williams & Wilkins.
- COSTA ROSA, L.F.B.P., SAFI, D.A , CURY, Y. & CURI, R. (1992a) Effect of epinephrine on glucose metabolism and hydrogen peroxide content in incubated rat macrophages. *Biochem. Pharmacol.* **44**: 2235-2241.
- COSTA ROSA, L.F.B.P., CURY, Y. & CURI, R. (1992b) Effects of insulin, glucocorticoids and thyroid hormones on the activities of key enzymes of glycolysis, glutaminolysis, the pentose-phosphate pathway and the Krebs cycle in the rat macrophages. *J. Endocrinol.* **135**: 213-219.
- CREMASCHI, G.A., FISCHER, P. & BOEGE, F. (1991) B-Adrenoceptor distribution in murine lymphoid cell lines. *Immunopharmacol.* **22**: 195-206.
- CURNUTTE, J.T. & BABIOR, B.M. (1987). Chronic granulomatous disease. *Adv. Human Genetics.* **16**:229-297.
- CVIJIC, G., RADOJICIC, R., DJORDJEVIC, J., DAVIDOVIC, V. (1995) The effect of glucocorticoids on the activity of monoamine oxidase, copper-zinc superoxide dismutase and catalase in the rat hypothalamus. *Funct. Neurol.*, **10**: 175-181.
- DAVIS, J.M., ROBBINS, C.G., ANDERSON, T., SAHGAL, N., GENEN, L., TIERNEY, J., HOROWITZ, S. (1995) The effects of hyperoxia, mechanical ventilation, and dexamethasone on pulmonary antioxidant enzyme activity in the newborn piglet. *Pediatr. Pulmonol.* **20**: 107-111.
- DELAHUNT, J.W. & MELLISOP, G. (1987) Hormone changes in stress. *Str. Med.* **3**: 123-143.
- DOHI, T., KAWAMURA, K., MORITA, K., OKAMOTO, H. & TSUJIMOTO, A. (1988). Alterations of the plasma selenium concentrations and the activities of tissue peroxide metabolism enzymes in streptozotocin-induced diabetes. *Horm. Metab. Res.* **20**:671-675.

- DWEIK, R.A.; LEWIS, M.; KAVURU, M.; BUHROW, L.; ERZURUM, S.C.; THOMASSEN, M.J. (1997). Inhaled corticosteroids and beta agonists inhibit oxidant production by bronchoalveolar lavage cells from normal volunteers in vivo. *Immunopharmacol.* **37**:163-166.
- FAURE, P.; ROSSINI, E.; LAFOND, J.L.; RICHARD, M.J.; FAVIER, A. & HALIMI, S. (1997). Vitamin E improves the free radical defense system potential and insulin sensitivity of rats fed high fructose diets. *J. Nutr.* **127**:103-107.
- FLEMING, S.D., EDELMAN, L.S. & CHAPES, S.K. (1991) Effects of corticosterone and microgravity on inflammatory cell production of superoxide. *J. Leuk. Biol.* **50**: 69-76.
- FRY, R.W.; MORTON, A.R. & KEAST, D. (1991). Overtraining in athletes, an update. *Sports Med.* **74**:32-65.
- GARCIA-LEME, J. (1985). The endocrine and nervous systems in inflammation: pharmacological considerations. In: *The pharmacology of inflammation*. Handbook of inflammation (Eds. Bonta, I.L.; Bray, M.A. & Parnham, M.J.) Amsterdam: Elsevier.
- GAVAN, N., POPA, R., ORASAN, R., MAIBACH, H. (1997) Effect of percutaneous absorption of fluocinolone acetonide on the activity of superoxide dismutase and total antioxidant status in patients with psoriasis. *Skin Pharmacol.*, **10**: 178-182.
- GOUGEROT-PACIDALO, M.A., FAY, M., ROCHE, Y., LACOMBE, P. & MARQUETTY, C. (1985) Immune oxidative injury induced in mice exposed to normobaric oxygen: effects of thiol compounds on the splenic cell sulphhydryl content and Con A proliferative response. *J. Immunol.* **135**: 2045-2051.
- GRAHAN, B.S. & TUCKER, W.S. (1984). Opportunistic infections in endogenous Cushing's syndrome. *Ann. Intern. Med.* **101**:334-338.
- GREENE, W.C. (1993). AIDS and the immune system. *Scientific Am.* **269**:67-73.
- GRISWOLD, J.A. (1993). White blood cells response to burn injury. *Semin. Nephrol.* **13**:409-415.
- GUPTA, B.L.; AZAN, M. & BAQUER, N.Z. (1990). Changes in erythrocytes glutathione peroxidase and glutathione reductase in alloxan diabetes. *Biochem. Int.* **21**:725-731.
- HALLIWELL, B. & GUTTERIDGE, J.M.C. *Free Radical in Biology and Medicine*. 2^o ed. Oxford, University Press. 1989. 543pp.
- HARBUZ, M.S., CHOWDREY, H.S., JESSOP, D.S., BISWAS, S. & LIGHTMAN, S.L. (1991) Role of catecholamines in mediating messenger RNA and hormonal responses to stress. *Brain Res.* **551**: 52-57.
- HARMAN, D. (1981). The aging process. *Procc. Nat. Acad. Sci (USA)*. **78**:7124-7128.

- HARRIS, E.D. (1992) Regulation of antioxidant enzymes. *J. Nutr.* **122**: 625-626.
- HASSAN, N. F. & DOUGLAS, S.D. (1990) Stress-related neuroimmunomodulation of monocyte-macrophage functions in HIV-1 infection. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **54**: 220-227.
- HIDALGO, J., GASULL, T., GARCIA, A, BLANQUES, A, ARMARIO A (1990) Role of glucocorticoids and catecholamines on hepatic thiobarbituric acid reactants in basal and stress conditions in the rats. *Horm. Metab. Res.*, **23**: 104-109.
- INGRAHAN, L.L. & MEYER, D.L. *Biochemistry of dioxygen*. New York: Plenum Press, 1985.
- JI, L.L. (1993). Antioxidant enzyme response to exercise and aging. *Med. Sci. Sports Exerc.* **25**:225-231.
- JOSE, H.J.; BERENICE, S.G.; CECILIA, V.R. (1997). Induction of antioxidant enzymes by dexamethasone in the adult rat lung. *Life Sci.* **60**:2059-2067.
- JOHSON, J.D. (1970). Infections and diabetes. In: *Diabetes mellitus*: Theory and practice. Ellemberg & Rifkin (ed). McGraw-Hill, NY.
- KANALEY, J.A. & JI, L.L. (1991). Antioxidant enzyme activity during prolonged exercise amenorrheic and eumenorrheic athletes. *Metabolism* **40**:88-92.
- KAWAMURA, T., YOSHIOKA, T., BILLS, T., FOGO, A., ICHIKAWA, I. (1991) Glucocorticoid activates glomerular antioxidant enzymes and protects glomeruli from oxidant injuries. *Kidney Int.*, **40**: 291-301.
- KHAN, S.H.; EMERIT, I. & FEINGOLD, J. (1990). Superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages of New Zealand Black mice. *Free Rad. Biol. Med.* **8**:339-345.
- KUME-KICK, J.; FERRIS, D.C.; MENNA-RUSSO, I. & RICE, M.E. (1996). Enhanced oxidative stress in female rat brain after gonadectomy. *Brain Res.* **738**:8-14.
- LANDMANN, R.M.A., MULLER, F.B., PERINI, C.H., WESP, M., ERNE, P. & BUHLER, F.R. (1984) Changes of immunoregulatory cells induced by psychological and physical stress: relationship to plasma catecholamines. *Clin. Exp. Immunol.* **58**: 127-135.
- LIN, H.-Y.; THACORE, H.R.; DAVIS, P.J. & DAVIS, F.B. (1994). Thyroid hormone potentiates the antiviral action of interferon- γ in cultured human cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **79**:62-65.

- LOVEN, D.; SCHEDL, H.; WILSON, H.; DAABES, TT.; STENGINK, L.D.; DIEKUS, M. & OBERLEY, L. (1986). Effect of insulin and oral glutathione on glutathione levels and superoxide dismutase activities in organs of rats with streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes* **35**:503-507.
- LOW, P.A. & NICKANDER, K.K. (1991). Oxygen free radical effects in sciatic nerve in experimental diabetes. *Diabetes* **40**:873-877.
- LUKENS, F.D.W. (1948). Alloxan diabetes. *Physiol. Rev.* **28**:304-330.
- MAISEL, A.S., MURRAY, D., LOTZ, M., REARDEN, A., IRWIN, M. & MICHEL, M. C. (1991) Propanolol treatment affects parameters of human immunity. *Immunopharmacol.* **22**: 157-164.
- MAKINO, Y., OKAMOTO, K., YOSHIKAWA, N., AOSHIMA, M., HIROTA, K., YODOI, J., UMESONO, K., MAKINO, I., TANAKA, H. (1996) Thioredoxin: a redox-regulating cellular cofactor for glucocorticoid hormone action. Cross talk between endocrine control of stress response and cellular antioxidant defense system. *J. Clin. Invest.*, **98**: 2469-2477.
- MALY, F.E. The B-lymphocytes: a newly-recognized source of reactive oxygen species with immunoregulatory potential. *Free Rad. Res. Commun.* **8**:143-148, 1990.
- MARAL, J., PUGET, K. & MICHELSON, A.M. (1977) Comparative study of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase levels in erythrocytes of different animals. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **77**: 1525-1535.
- MARIDONEAU-PARINI, I., ERRASFA, M., RUSSO-MARIE, F. (1989) Inhibition of superoxide generation by dexamethasone is mimicked by lipocortin I in alveolar macrophages. *J. Clin. Invest.*, **83**: 18836-18840.
- MARKLUND, L.S. (1985) Direct assay with potassium superoxide. In: *Handbook of Methods for Radical Research*. Greenwald, R.A. (Ed.), CRC Press, New York.
- MASON, D. (1991) Genetic variation in the stress response: susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis and implications for human inflammatory disease. *Immunol. Today*, **12**: 57-60.
- MATTSON, D.E. (1981). *Statistics: difficult concepts, understandable explanations*. St Louis, Missouri: Mosby Company.
- MCINTOSH, L.J., HONG, K.E., SAPOLSKY, R.M. (1995) High glucocorticoid levels decrease some antioxidant enzyme activities in the adult rat brain. *Soc. Neurosci Abstract* **21**: 2129.
- MCPHEE, LINGAPPA, LANGE & GANONG. (1997). *Pathophysiology of disease*. An introduction to clinical medicine. 2/e. Lange Medical Books. Appleton & Lange.

- MEERSON, F.; MALYSHEV, V.V. MANUKHINA, E.B. (1988). Effect of stress and the antioxidant ionol on catecholamines synthesis and the dopamine concentration in the heart and adrenals. *Bull. Exp. Biol. Med.* **12**:1661-1664.
- MILLER, A.H., SPENCER, R.L., TRESTMAN, R.L., KIM, C., MCEWEN, B.S. & STEIN, M (1991) Adrenal steroid receptor activation *in vivo* and immune function. *Am. J. Physiol.*, **261**: E126-E131.
- MUNCK, A.; GUYRE, P.M. & HOLBROOK, N.J. (1984). Physiological functions of glucocorticoids in stress and their relation to pharmacological actions. *Endocr. Rev.* **5**:25-44.
- MURRELL, G.A.C. (1990). Modulation of fibroblast proliferation by oxygen free radicals. *Biochem. J.* **265**:659-665.
- NISHIDA, S.; NAKANO, T.; KIMOTO, S.; KUSONOKI, T.; SUZUKI, K.; TANIGUCHI, N.; MURATA, K.; TOMURA, T. (1997). Induction of manganese superoxide dismutase by thyroid stimulating hormone in rat thyroid cells. *FEBS Lett.* **416**:69-71.
- OBERLEY, L.W. (1988). Free radical and diabetes. *Free Rad. Biol. Med.* **5**:113-124.
- OYANAGUI, Y. (1997). Natural antioxidant enhance and prolong the oxyradical/NO-related suppression by deamethasone of schlemm and histamine paw oedema of mice *Inflammation* **21**:643-655.
- OYANAGUI, Y. (1997). Cromoglycate and nedocromil enhanced the reactive oxygen species-dependent suppression with, but not without, dexamethasone in schlemm and histamine paw oedema of mice. *Med. Inflamm.* **6**:369-374.
- PAAVONEN, T. (1982). Enhancement of human B lymphocyte differentiation *in vivo* by thyroid hormone. *Scand J. Immunol.* **15**:211-215.
- PARILLO, J.E.; PARKER, M.M.; NATANSON, C.; SUFFREDINI, A.F.; DANNER, R.L.; CUNNION, R.E. & OGNIBENE, F.P. (1990). Septic shock in humans. *Ann. Intern. Med.* **113**:227-242.
- PICK, E. & MIZEL, M. (1981). Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages using an automatic enzyme immunoassays reader. *J. Immunol. Methods.* **46**:211-226.
- PLAUT, M. (1987). Lymphocyte hormone receptor. *Ann. Rev. Immunol.* **5**:621-69.
- POMPELLA, A. (1997). Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. *Internat. J. Vit. Nutr. Res.* **67**:289-297.

- POWERS, R.W.; CHAMBERS, C. & LARSEN, W. (1996). Diabetes-mediated decreases in ovarian superoxide dismutase activity are related to blood-follicle barrier and ovulation defects. *Endocrinol.* **137**:3101-3110.
- RAJASHREE, S. & PUVANAKRISHNAN, R. (1998). Dexamethasone induced alterations in enzymatic and nonenzymatic antioxidant status in heart and kidney of rats. *Mol. Cell. Biochem.* **181**:77-85.
- REY, D.A.; BESEDEVSKY, H.; SORKIN, E. & DINARELLO, C.A. (1987). Interleukin-1 and glucocorticoid hormones integrate an immunoregulatory feedback circuit. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **496**: 85-90.
- RINEHART, J.J.; WUEST, D. & ACKERMAN, G.A. (1982). Corticosteroid alteration of human monocyte to macrophage differentiation. *J. Immunol.* **129**:1436-1440.
- RINEHART, J.J.; SAGONE, A.L.; BALCERZAK, S.P.; ACKERMAN, G.A. & LOBUGLIO, A.F. (1975). Effects of corticosteroid therapy on human monocyte function. *N. Engl. J. Med.* **292**:236-241.
- RISHOL, H.; SKREDE, K.K.; AER, C.E. & WIIK, P. (1995). Dexamethasone and methylprednisolone affect rat peritoneal phagocyte chemiluminescence after administration *in vivo*. *Eur. J. Pharmacol* **281**:9-17.
- RUSO, E.M.K.; VIEIRA, J.G.H.; MACIEL, R.M.B. & FONSECA, R.M.G. (1982). Desenvolvimento e caracterização de métodos de radioimunoensaio para dosagens de radiotironinas. *Arq. Bras. Endocrinol.* **26**:23-28.
- SATO, Y.; HOTTA, N.; SAKAMOTO, N.; MATSUOKA, S.; OHISHI, N. & YAGI, K. (1981). Lipid peroxide levels in plasma of diabetic patients. *Biomed. Med.* **25**:373-378.
- SAVIN, J.A. (1974). Bacterial infections in diabetes mellitus. *Br. J. Dermatol.* **91**:481-490.
- SERRANO, M.A.R., CURI, R., PARRY-BILLINGS, M., WILLIAMS, J.F., NEWSHOLME, E.A. (1993) Effects of glucocorticoids on lymphocyte metabolism. *Am. J. Physiol.*, **264**: E24-E28.
- SHARMANOV, A.T., AIDARKHANOV, B.B. & KURMANGALINOV, S.M. (1990) Effects of vitamin E deficiency on oxidative metabolism and anti-oxidant enzyme activity of macrophage. *Ann. Nutr. Metab.*, **34**: 143-146.
- STORZ, G., TARTAGLIA, L.A. & AMES, B.N. (1990) Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation. *Science* **248**: 189-194.
- TAGAMI, S.; TAHITO, K.; YOSHIDA, K.; HIROKAWA, J.; OHTSUKA, Y. & KAWAKAMI, Y. (1992). Effect of insulin on impaired antioxidant activities in aortic endothelial cells from diabetic rats. *Metabolism* **41**:1053-1058.

- TANNAHILL, C.L.; STEVENOT, S.A.; EAKER, E.Y.; SALLUSTIO, J.E.; NICK, H.S. & VALENTINE, J.F. (1997). Regulation of superoxide dismutase in primary cultures of rat colonic smooth muscle cells. *AM. J. Physiol.* **272** (Gastrointest. Liver Physiol. 35):G1230-G1235.
- TAPIA, G.; PEPPER, I.; VIDELA, L. (1997). Kupffer cell function in thyroid hormone-induced liver oxidative stress in the rat. *Free Rad. Res.* **26**:267-279.
- TAYLOR, R. & AGIUS, L. (1988). The biochemistry of diabetes. *Biochem. J.* **250**:625-640.
- TOMAS, E.M., MUNRO, H.N., YOUNG, V.R. (1979) Effect of glucocorticoid administration on the rate of muscle protein breakdown in vivo in rats, as measured by urinary excretion of N-methylhistidine. *Biochem. J.*, **178**: 139-146.
- TRABER, M.G. (1997). Cellular and molecular mechanisms of oxidants and antioxidants. *Miner. Electrolyte Metab.* **23**:135-139.
- VIEIRA, R.; NASCIMENTO, R.; ARIZAWA, S.; & CURI, R. (1990). Development of equipments for lymphocytes isolation and culture. *Arq. Biol. Technol.* **33**:819-829.
- YAMAOKA, K.; EDMATSU, R. & MORI, A. (1991). Increased SOD activities and decreased lipid peroxide levels induced by low X irradiation in rat organs. *Free Rad. Biol. Med.* **11**:299-306.
- YOSHIOKA, T., KAWAMURA, T., MEYRICK, B.O., BECKMAN, J.K., HOOVER, R.L., YOSHIDA, H., ICHIKAWA, I. (1994) Induction of manganese superoxide dismutase by glucocorticoid in glomerular cells. *Kidney Int.*, **45**: 211-219.
- YU, B.P. (1994). Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol. Rev.* **74**:139-161.
- YU, D.T.Y. & CLEMENTS, P.J. (1976) Human lymphocyte subpopulations effect of epinephrine. *Clin. Exp. Immunol.* **25**: 472-479.
- WAGNER, H.R. (1994). Superoxide dismutase, aging, and degenerative disease. *Free Rad. Biol. Med.* **17**:249-258.
- WATANABE, C., KIM, C.Y., SATOH, H. (1997) Tissue-specific modification of selenium concentration by acute and chronic dexamethasone administration in mice. *Br. J. Nutr.*, **78**: 501-509.
- WAYNFORTH, H.B. (1980). Specific surgical operations. In: *Experimental technique in the rat*. Waynforth (Ed). London:Acad. Press.
- WEICKER, H. & WERLE, E. (1991). Interaction between hormones and the immune system. *Int. J. Sports Med.* **12** (Suppl 1):30-37.

- WHITE, C.W. (1993). Expression of manganese superoxide dismutase is not altered in transgenic mice with elevated level of copper-zinc superoxide dismutase. *Free Rad. Biol. Med.* **15**:629-636.
- WINTERBOURN, C., GUTTERIDGE, J.M.C. & HALLIWELL, B. (1985) Doxorubicin-dependent lipid peroxidation at low partial pressure of oxygen. *J. Free Rad. Biol. Med.* **1**: 43-49.
- WOLF, S.P.; JIANG, Z.Y.; HUNT, J.V. (1991). Protein glycation and oxidative stress in diabetes mellitus and aging. *Free Rad. Biol. Med.* **10**:339-52.

ANEXOS

A PRESENTE TESE É BASEADA NOS SEGUINTE TRABALHOS:

- PEREIRA, B.; Bechara, E.J.H.; Mendonça, J.R. & Curi, R. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in immune organs and muscles of rats treated with dexametasone. *Cell Biochemistry and Function* **16**:00-00, 1998 (in press).
- PEREIRA, B.; Costa Rosa, L.F.B.; Safi, D.A.; Bechara, E.J.H. & Curi, R. Changes in the TBARs content and superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in the lymphoid organs and skeletal muscles of adrenodesmedulated rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Sciences* **31**:827-833, 1998.
- PEREIRA, B. Radicais livres de oxigênio e sua importância para a funcionalidade imunológica. *Motriz* **2**:71-79, 1996.
- PEREIRA, B.; Costa Rosa, L.F.P.B.; Bechara, E.J.H. & Curi, R. Physical exercise and hormonal stimulus of oxidative stress in muscle and lymphoid organs. *Ciência e Cultura* **48**:43-46, 1996.
- PEREIRA, B.; Costa Rosa, L.F.B.; Bechara, E.J.H. & Curi, R. Hormonal control of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities. *Biochemical Pharmacology* **50**:2093-2098, 1995.
- PEREIRA, B. Exercício físico como pró-oxidante. *Revista Paulista de Educação Física* **8**:77-89, 1994.
- PEREIRA, B.; Costa Rosa, L.F.B.; Safi, D.A.; Bechara, E.J.H. & Curi, R. Control of superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase in rat immune organs and muscles by thyroid hormones. *Journal of Endocrinology* **140**:73-77, 1994.
- PEREIRA, B.; Costa Rosa, L.F.B.; Safi, D.A.; Bechara, E.J.H. & Curi, R. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in immune organs and muscles of diabetic rats. *Journal of Endocrinology* **141**:161-165, 1994.
- PEREIRA, B.; Curi, R.; Costa Rosa, L.F.B.; Safi, D.A.; Medeiros, M.H.G. & Bechara, E.J.H. Superoxide dismutase, catalase and glutathione peroxidase activities in immune organs and muscles of sedentary and exercised-trained rats. *Physiology & Behavior* **56**:1095-1099, 1994.