Fernanda Bredariol Velhote

**Caracterização da ação da Crotalfina
sobre a função de macrófagos
peritoneais de ratos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências

Sao Paulo
2013

Fernanda Bredariol Velhote

**Caracterização da ação da Crotalina
sobre a função de macrófagos
peritoneais de ratos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Dra. Sandra Coccuzzo Sampaio Vessoni

Versão original

Sao Paulo
2013

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Velhote, Fernanda Bredariol.

Caracterização da ação da crotalina sobre função de macrófagos peritoneais de ratos / Fernanda Bredariol Velhote. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Profa. Dra. Sandra Coccuzzo Sampaio Vessoni.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Ação de venenos e toxinas de serpentes sobre atividades funcionais e sinalização intracelular de macrófagos durante processos fisiopatológicos.

Versão do título para o inglês: Characterization of crotalphine actions on function of rat macrophages.

1. Crotalina 2. Macrófagos 3. Receptores opióides 4. Peptídeo opióide 5. Inflamação I. Vessoni, Profa. Dra. Sandra Coccuzzo Sampaio II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB0148/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Fernanda Bredariol Velhote.

Título da Tese: Caracterização da ação da crotalina sobre função de
macrófagos peritoneais de ratos.

Orientador(a): Profa. Dra. Sandra Coccuzzo Sampaio Vessoni.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão
pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP - Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 - telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 138 nas fls. 64 do livro 02 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Yara Cury, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **"Envolvimento do NF-kB na ação supressora do estresse sobre a função de macrófagos. Participação de B-endorfina, catecolaminas e corticosterona"** do qual participou(aram) o(s) alunos **Marco Aurélio Ramirez, Fernanda Bredariol Velhote e os pesquisadores Rui Curi, Sandra Coccuzzo Sampaio**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) em **20.02.09**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 27 de fevereiro de 2009.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador
CEEA - ICB/USP

Profa. Dra. PATRÍCIA GAMA
Secretária-Suplente
CEEA - ICB/USP

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO BUTANTAN

Av. Vital Brazil, 1500, CEP 05503-900, São Paulo, SP, Brazil
Telefone: (55) (011) 3726-7222 ramal 2106 - Fax: (55) (011) 3726-1505

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "Envolvimento do NF- κ B na ação supressora do estresse sobre a função de macrófagos. Participação de β -endorfina, catecolaminas e corticosterona." protocolo nº 612/09, sob a responsabilidade de Dra. Yara Cury e Dra. Fernanda Bredariol Velhote, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS DO INSTITUTO BUTANTAN (CEUAIB) em reunião de 17/06/2009.

We certify that the research entitled "Involvement of the NF- κ B in the suppress action of stress on the macrophage functions. Participation of β -endorphin, catecholamine and corticosterone.", protocol nº 612/09, under the responsibility of Dra. Yara Cury and Fernanda Bredariol Velhote, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research, adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation, and was approved by the ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH of BUTANTAN INSTITUTE in the meeting of 06/17/2009

Vigência do Projeto: 05/2009 - 05/2013	Nº de animais/espécie
Div. de Desenv. Científico/ Lab. de Fisiopatologia	200/ Ratos Wistar machos

São Paulo, 06 de Julho de 2009.

Dra. Denise V. Tambourgi
Presidente da CEUAIB

De acordo:

Dr. Otávio Azevedo Mercadante
Diretor do Instituto Butantan

.....a minha familia

Aos amigos.....

..... e a todos aqueles que contribuíram, de alguma forma, para que essa tese chegasse ao fim!!!em especial a Dra Monica Comalada, Judith Rodrigues, Prof. Dr. Rui Curi, Prof. Dr. Ronaldo Tomathielli dos Santos e Dra Tavane Cambiaghi.....!!!!

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, ao **CRIADOR** do universo, por estar sempre guiando meus caminhos e por me dar a oportunidade de acordar todos os dias;

Aos **animais**....meu respeito e gratidão;

A meus pais, **Carlos Eduardo** e **Jeanete**, por todo carinho, amor, parceria, paciência, incentivo, apoio financeiro.... enfim, eu poderia escrever páginas e páginas dizendo o quanto vocês são importantes, mas mesmo assim acredito que isso não seria suficiente para expressar toda a gratidão e amor que eu sinto por vocês. ...;

Ao meu irmão, **Eduardo**, pela verdadeira amizade e companheirismo

A **Dra. Sandra Coccuzzo Sampaio Vessoni**, pela orientação, dedicação e aprendizado no laboratório.

A **Dra. Yara Cury**, pela co-orientação, colaboração e discussões;

Edilene Costa....pela amizade e ajuda incondicional!!! E pelos momentos de descontração entre um experimento e outro...além da paciência, é claro, com meu temperamento bipolar!!

Aos **tecnicos** e **TODO** o pessoal do Laboratório de Fisiopatologia e Laboratório Especial de Dor e Sinalização (LEDS) do Instituto Butantan....por todo o apoio necessário.... Em especial a **Vanessa Gutierrez, César, Vanessinha Zambelli, Franciele, Paty, Neuza, Tânia, Sandrinha, Clau, Juliana e Aninha**....que sempre me ajudaram e me receberam com muito carinho;

Ao **Biotério Central** do Instituto Butantan, pelo fornecimento dos animais;

A **Selminha, Camila e Monica** da Secretaria do Departamento de Farmacologia

Aos AMIGOS **Hilton Takahashi, Marco Aurélio Vinolo, Hosana Rodrigues, Renato Nachemberg, Amanda Rocha, José Cesar Rosa Neto, Wiliam Festucia**,....., **Bob**....do Laboratório de Fisiologia Celular (ICB/USP) por **TUDO!!!! Sensacionais**....e

não imaginam o quão especiais!!!!...e aos demais por me ceder espaço em suas bancadas!!

A **Profa Dra Beatriz Castilho** (UNIFESP) por me ceder material e espaço em seu laboratório para a realização de alguns dos meus experimentos;

Aos **Prof. Dr Joao Gustavo Pessini Amarante-Mendes, Profa. Dra. Marilia Seelander, Profa. Dra Carolina Munhoz, Prof. Cristóforo Scanove, Prof. Dr Augusto Luchesi** (UNICAMP) por todo o material cedido e por estarem sempre prontos a me ajudar.....

Las chicas mas guays del mundo.. **Monica Comalada, Erica Barbosa, Judith Rodrigues, Selma Pereira e Gemma Lopes**, do Laboratório de Imunologia do Instituto de Pesquisa em Biomedicina de Barcelona (IRB/ Barcelona)....**GRACIASSSS** por todo... por enseñarme, por amistad, paciencia, crítica, chistes, café,...y por me acepta el grupo! No tengo cómo agradecer...!!!!... **a cada cerdo le llega su San Martin.....**

À pessoas **MAIS** do que **ESPECIAIS**...que me acompanham no dia-a-dia e que durante estes 5 anos me deram **TODO** o carinho, apoio, força, torcida e compreensão necessária.... **Bob, Bia, Fabi, André, Lilian, Marcelo, Teieta, Giu, Suzana, Edu, Té, George, Monique, Alê, Mari, Pedro, Eliane, Persio, Monica, Michel**,...**Vocês foram e são Sensacionais!!!**

SEMPREEEE.....Ao “trio dinâmico” **Anielle, Tavane e Fernanda**.....pelo apoio e amizade durante todos estes anos!!! Pelos maravilhosos e inesquecíveis momentos de diversão, café, descontração, bagunça, cumplicidade, almocinhos “cabeça”,.... e por todo o apoio nas horas tristes!!! **AMIZADE como a NOSSA... NAO EXISTE!!!!**

Ao marido, **Caco**, pelo carinho e compreensão nos momentos de ausência e estresse!!! Por me suportar, o que muitas vezes não é uma tarefa muito fácil...hehehe.... por compreender, respeitar e apoiar minhas escolhas e decisões.... Obrigada !!!

Aos amores da minha **VIDA** ... **Lola, Bela e Athos** .. por fazer o meu dia-a-dia cada vez mais FELIZ e DIVERTIDO!!! Amo **MUITO** vcsssss.....

....**SEMPRE** ao patrão, **Prof. Dr. Luis Fernando B. P. Costa Rosa (GG)**..... pelo exemplo a ser seguido e por me apresentar o lado “bom” da ciência. Sem ele, definitivamente, esta loucura **NUNCA** teria começado....e muito menos chegado ao **FIM!!!...**

...e a **TODAS** as pessoas que desejaram que este tese nao atingisse seu objetivo e que dificultaram sua realização.....**Saibam que estas dificuldades me fizeram uma pessoa mais forte e preparada para as tormentas da vida!!!** Um **OBRIGADA** muito mais do que **ESPECIAL!!!**

Ao **CAPES** e ao **CNPQ**, pela bolsa de doutorado!!

O fracasso é apenas uma oportunidade para começar de novo com mais inteligência.....

Henry Ford

Keep Walking.....

RESUMO

VELHOTE, F. B. **Caracterização das ações da Crotalfina sobre função de macrófagos peritoneais de ratos**. 2013. 118 f. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A Crotalfina (CRF) é um peptídeo sintético produzido a partir da sequência do fator analgésico natural isolado do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* que induz potente e prolongado efeito antinociceptivo, em modelos de dor aguda e crônica. Este efeito é do tipo opióide, detectado apenas na presença de inflamação ou lesão tecidual, e os mecanismos envolvidos com esta ação não estão totalmente elucidados. Recentes estudos sobre os mecanismos envolvidos com a atividade analgésica relatam a importância da interação de opióides exógenos e endógenos com células imunes para este efeito. Em particular, os macrófagos, células cruciais no controle do desenvolvimento/resolução das reações inflamatórias, vêm sendo apontados como alvos celulares-chave para os efeitos dos diferentes opióides. Neste sentido, a ação da CRF sobre a função dessas células, bem como sobre seus receptores opióides, não foi até o presente momento, investigada. Assim, este estudo teve como objetivo caracterizar a modulação da CRF sobre o comportamento funcional de macrófagos peritoneais residentes (sem estímulo), ou inflamatórios (estimulados *in vitro* com LPS) de ratos e a importância de receptores opióides nestas ações. Os resultados apontam que a CRF inibe a capacidade de fagocitose, liberação de H₂O₂ e produção de NO[•] por macrófagos residentes e inflamatórios. Ainda, foi observado estimulação da secreção de IL-1 β , modulação da secreção de IL-6 (estimulada em macrófagos residentes e inibida em macrófagos inflamatórios) e inibição da secreção de TNF- α , sendo esta independentemente do estado em que se encontram os macrófagos. Ensaio experimental, por *western blotting* e ELISA, demonstraram que macrófagos apresentam expressão e ativação de receptores opióides, sendo preferencialmente receptores κ , seguido de μ e δ , em macrófagos residentes, e receptores μ , seguido por receptores κ e δ , em macrófagos inflamatórios. Foi também observado que quando incubados com a CRF, macrófagos residentes apresentam expressão e ativação, preferencialmente, de receptores μ , seguido por κ e δ , enquanto que macrófagos inflamatórios apresentam receptores κ , seguido por μ e δ . Antagonistas não seletivo e seletivos de receptores opióides bloquearam as ações da CRF, mostrando que este peptídeo apresenta ação modulatória mediada por receptores tipo opióide. Assim, esses dados demonstram, pela primeira vez, a modulação da CRF sobre a função de macrófagos residentes e inflamatórios, o que pode contribuir para ação analgésica descrita para este peptídeo.

Palavras chave: Crotalfina. Macrófagos. Receptores opióides. Inflamação.

ABSTRACT

VELHOTE, F. B. **Characterization of Crotalphine actions on function of rat macrophages**. 2013. 118 p. Ph. D. thesis (Pharmacology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Crotalphine (CRF), a peptide isolated from the venom of South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* venom, induces potent opioid effect and antinociceptive activity in models of acute and chronic pain. This effect is detected in the presence of tissue injury or inflammation. The mechanisms involved in this action are not fully elucidated. Studies involved in the analgesic activity report the importance of the interaction of exogenous and endogenous opioids in immune cells. Macrophages have been identified as targets for the effects of opioids. This study aimed to characterize the effect of CRF on the macrophages functions and the involvement of opioid receptors in these actions. CRF inhibited phagocytosis, release of H_2O_2 and $NO\bullet$ production by resident and elicited macrophages. Also stimulated the secretion of IL-1 β and modulates the secretion of IL-6 (stimulated in resident macrophages and inhibited in elicited macrophages) and inhibited the secretion of TNF- α , regardless of the state of macrophage activation. *Western blotting* and ELISA demonstrated that resident macrophages present expression and activation κ receptors, followed by μ and δ receptors. Already, elicited macrophages express μ receptors, followed by κ and δ receptor. When incubated with CRF, resident macrophages showed expression and activation preferentially μ receptor, followed by κ and γ receptors. Elicited macrophages showed expression and activation κ receptors, followed by μ and γ receptors. Non-selective and selective antagonists opioid receptors blocked the actions of CRF, indicating that this peptide has modulatory effect mediated by opioid receptor.

Keywords : Crotalphine. Macrophages. Opioid receptors. Inflammation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Adenil ciclase
ACTH	Hormônio adenocorticotrófico
AMPc	Monofosfato de adenosina
ANOVA	Análise de variância
Ca ²⁺	Cálcio
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CO ₂	Gás carbonico
CRF	Crotalfina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRG	Gânglio da raiz dorsal
DOR	Receptor opioide tipo delta (δ)
EPM	Erro padrão da média
g	Gramma
GAPDH	Gliceraldeido 3-fosfato desidrogenase
GDP	Guanosina difosfato
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
GPCRs	Receptores de membrana acoplados a proteína G
GTP	Guanosina trifosfato
IL-1	Interleucina 1
IL-4	Interleucina 4
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10

IL-13	Interleucina 13
HCl	Ácido clorídrico
K ⁺	Potássio
Kg	Quilograma
KOR	Receptor ópioide tipo kappa (κ)
LPH	Hormônio pituitário lipotrófico
LPS	Lipopolissacarídeo
M3G	Morfina-3-glucuronídeo
M6G	Morfina-6-glucuronídeo
MAP quinase	Proteína-quinase ativada por mitogenos
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
ml	Mililitros
MSH	Hormônio melanócito estimulante
MOR	Receptor ópioide tipo mu (μ)
NA	Noradrenalina
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NFκB	Fator nuclear κB
NO•	Óxido nítrico
nor-BNI	nor-Binaltorphimine dihydrochloride
NOS	Óxido nítrico sintase
PBS	Tampão fosfato
PGE ₂	Prostaglandina E ₂

PMA	Acetato de forbol miristato
PKA	Proteína quinase A
rpm	Rotações por minuto
SNC	Sistema Nervoso Central
TLR	Receptores tipo TOLL
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
μg	Microgramas
μl	Microlitros

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Seqüência de aminoácidos da Crotalfina.....	26
Figura 2 - Efeitos mediados por opióides.....	30
Figura 3 - Produção local de peptídeos opióides.....	38
Figura 4 - Efeito da Crotalfina sobre a fagocitose mediada por receptor C3b do sistema complemento.....	53
Figura 5 – Efeito da Efeito da Crotalfina sobre a liberação de H ₂ O ₂	55
Figura 6 - Efeito da Efeito da Crotalfina sobre a produção de NO•	57
Figura 7 - Efeito da Crotalfina sobre a secreção de IL-1 β	59
Figura 8 - Efeito da Crotalfina sobre a secreção de IL-6.....	60
Figura 9 - Efeito da Crotalfina sobre a secreção de TNF- α	61
Figura 10 – Caracterização da expressão de receptores MOR, KOR e DOR em macrófagos peritoneais residentes ou inflamatórios.....	63
Figura 11 – Caracterização da ativação de receptores MOR, KOR e DOR em macrófagos peritoneais residentes ou inflamatórios.....	64
Figura 12 – Efeito da Crotalfina sobre a expressão de receptores MOR, KOR e DOR em macrófagos peritoneais residentes ou inflamatórios.....	66

Figura 13- Efeito da Crotalina sobre a ativação de receptores MOR, KOR e DOR em macrófagos peritoneais residentes ou inflamatórios.....	67
Figura 14 – Participação dos receptores opióides na ação da Crotalina sobre a fagocitose de macrófagos residentes, mediada por receptor C3b do sistema complemento	70
Figura 15 – Participação dos receptores opióides na ação da Crotalina sobre a fagocitose de macrófagos inflamatórios, mediada por receptor C3b do sistema complemento	72
Figura 16 – Participação dos receptores opióides na ação da Crotalina sobre a liberação de H ₂ O ₂ por macrófagos residentes	76
Figura 17 – Participação dos receptores opióides na ação da Crotalina sobre a liberação de H ₂ O ₂ por macrófagos inflamatórios	78
Figura 18 – Participação dos receptores opióides na ação da Crotalina sobre a produção de NO• por macrófagos residentes	81
Figura 19 – Participação dos receptores opióides na ação da Crotalina sobre a produção de NO• por macrófagos inflamatórios.....	83
Figura 20 – Participação dos receptores opióides na ação da Crotalina sobre a secreção de IL-1β por macrófagos residentes.....	87
Figura 21 – Participação dos receptores opióides na ação da Crotalina sobre a secreção de IL-1β por macrófagos inflamatórios.....	89

Figura 22 – Participação dos receptores opióides na ação da Crotalina sobre a secreção de IL-6 por macrófagos residentes93

Figura 23 – Participação dos receptores opióides na ação da Crotalina sobre a secreção de IL-6 por macrófagos inflamatórios.....95

Figura 24 – Participação dos receptores opióides na ação da Crotalina sobre a secreção de TNF- α por macrófagos residentes.....98

Figura 25 – Participação dos receptores opióides na ação da Crotalina sobre a secreção de TNF- α por macrófagos inflamatórios.....100

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 Crotalfina	25
1.2 Receptores opióides – Estrutura e funções	28
1.3 Opióides exógenos e endógenos	30
1.3.1 <i>Opióides exógenos</i>	30
1.3.2 <i>Peptídios opióides</i>	31
1.4 Macrófagos – Características gerais	34
1.4.1 <i>Macrófagos e modulação opióide</i>	36
2 OBJETIVO	41
3 MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1 Aprovação do comitê de ética em experimental animal	42
3.2 Animais	42
3.3 Obtenção do precipitado celular	42
3.4 Contagem de células peritoneais	43
3.5 Adesão celular	43
3.6 Delineamento experimental	43
3.7 Tratamentos Farmacológicos	44
3.7.1 <i>Descrição dos fármacos utilizados</i>	44
3.7.1.1 <i>Fármacos agonistas de receptores opióides</i>	44
3.7.1.2 <i>Fármacos antagonistas de receptores opióides</i>	45
3.8 Estudo da viabilidade celular	45
3.8.1 <i>Ensaio de viabilidade celular por Cristal Violeta</i>	46
3.9 Caracterização da prevalência dos principais tipos de receptores opióides presentes em macrófagos peritoneais	46
3.9.1 <i>Avaliação por expressão protéica – Western Blotting</i>	46
3.9.2 <i>Determinação do estado de ativação (alteração conformacional) de receptores opióides – ELISA</i>	47
3.10 Avaliação dos parâmetros funcionais	48
3.10.1 <i>Caracterização da capacidade de fagocitose</i>	48
3.10.1.1 <i>Preparação do zimosan para a avaliação da fagocitose mediada por receptores C3b do sistema complemento</i>	48

3.10.1.1.2 Avaliação da capacidade fagocítica.....	48
3.10.2 Determinação da liberação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2).....	49
3.10.3 Determinação da produção de óxido nítrico (NO^*)	49
3.10.4 Secreção das interleucinas pró-inflamatórias.....	50
3.10.4.1 Obtenção do sobrenadante para a realização do ensaio.....	50
3.10.4.2 Quantificação das citocinas pró-inflamatórias.....	60
3.11 Análise estatística.....	51
4 RESULTADOS.....	52
4.1 Caracterização da ação da Crotalfina sobre o comportamento funcional de macrófagos.....	52
4.1.1 Avaliação da capacidade de fagocitose.....	52
4.1.2 Efeito da Crotalfina sobre a liberação de H_2O_2	54
4.1.3 Efeito da Crotalfina sobre a produção de NO^*	56
4.1.4 Efeito da Crotalfina sobre a secreção de interleucinas pró inflamatórias.....	58
4.1.4.1 Sobre a secreção de $IL-1\beta$	58
4.1.4.2 Sobre a secreção de $IL-6$	58
4.1.4.3 Sobre a secreção de $TNF-\alpha$	58
4.2 Expressão e ativação de receptores opióides em macrófagos residentes ou inflamatórios induzidos por LPS.....	62
4.3 Caracterização da expressão e ativação de receptores opióides em macrófagos residentes ou inflamatórios após incubação com a Crotalfina.....	65
4.4 Participação dos receptores opióides na modulação da Crotalfina sobre o comportamento funcional de macrófagos.....	68
4.4.1 Efeito dos antagonistas sobre a ação da Crotalfina na atividade de fagocitose por macrófagos residentes ou inflamatórios, mediada por receptor C3b do sistema complemento	68
4.4.2 Participação de receptores opióides na ação da Crotalfina sobre a liberação de H_2O_2 por macrófagos.....	74
4.4.3 Participação de receptores opióides na ação da Crotalfina sobre a produção de NO^* por macrófagos.....	80
4.4.4 Participação de receptores opióides na ação da Crotalfina sobre a secreção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos.....	85

4.4.4.1 Sobre a secreção da $IL-1\beta$	85
4.4.4.2 Sobre a secreção de $IL-6$	91
4.4.4.3 Sobre a secreção de $TNF-\alpha$	97
5 DISCUSSÃO.....	102
6 CONCLUSÃO.....	112
REFERÊNCIAS.....	113

1 INTRODUÇÃO

A administração farmacológica de analgésicos opiáceos, bem como a liberação de opióides endógenos, modulam os mecanismos fundamentais envolvidos com a restauração do equilíbrio homeostático durante a inflamação. A administração de opióides afeta tanto a imunidade inata como a adaptativa e, *in vivo* depende, também, do eixo hipotalâmico-pituitário-adrenal e do sistema nervoso simpático na contra-regulação das alterações hemodinâmicas e bioquímicas, sistemas amplamente estudados. Por outro lado, a compreensão do impacto de opióides sobre as alterações hemodinâmicas e sobre a resposta inflamatória, em particular sobre as células do sistema imune, envolvidas nestas desordens não está completamente elucidada. Uma das formas de ação dos opióides sobre a resposta imune inata e adaptativa ocorre diretamente, por meio da sua interação com os receptores opióides presentes na superfície das células do sistema imune. A ativação de receptores opióides ocorre como resposta natural à diferentes desordens, tais como injúria traumática, intervenções cirúrgicas ou sepse resultando na ativação das respostas neuroendócrina e opiácea, que têm como objetivo restaurar a hemodinâmica e a homeostasia bioquímica. A atividade imunomodulatória *in vivo* e *in vitro* de opióides vem sendo grande objetivo de diferentes pesquisas nos últimos anos que buscam elucidar alvos celulares e moleculares dos opióides no sistema imune. Neste presente trabalho, os estudos foram concentrados na investigação da interação direta da Crotalfina, um peptídeo opióide, com potente ação analgésica, derivado do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*, sobre a função de macrófagos, células cruciais na defesa imunológica contra agentes patogênicos e no controle do desenvolvimento/resolução das reações inflamatória.

1.1 Crotalfina

A crotalfina (CRF) é um peptídeo sintético produzido a partir da sequência do fator analgésico natural isolado do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus*, popularmente conhecida como cascavel (GUTIERREZ et al., 2008). Este peptídeo possui massa molecular de 1534,6 g/mol e sequência de aminoácido (<E F S P E N C Q G E S Q P C>), idêntica à cadeia γ da crotapotina, a subunidade não tóxica,

não enzimática e acídica da crotoxina, principal neurotoxina presente no veneno crotálico (AIRD et al., 1990; BON et al., 1989) (**Figura 1**).

Figura 1- Seqüência de aminoácidos da Crotalfina.

É descrito para esse peptídeo potente e prolongado efeito antinociceptivo em modelos experimentais de dor aguda e crônica (BRIGATTE et al., 2007; GUTIERREZ et al., 2008; GUTIERREZ et al., 2012). Em modelo de hiperalgesia mecânica induzida por prostaglandina E_2 (PGE_2), em ratos, a CRF, administrada sistemicamente e em baixas concentrações (0,008 a 0,2 μ g/kg), acarreta ação antinociceptiva (KONNO et al., 2008). Este efeito é observado, também, em modelo de hiperalgesia inflamatória induzida por carragenina e em modelos de dor crônica, como a dor neuropática, induzida por constrição crônica do nervo isquiático de ratos (GUTIERREZ et al., 2008).

Embora a estrutura química não se assemelhe com nenhum peptídeo opióide conhecido, os estudos indicam que a CRF apresenta efeito antinociceptivo do tipo opióide. Esta sugestão está baseada nos resultados experimentais que mostraram a reversão do efeito antinociceptivo da CRF por antagonistas seletivos de receptores opióides do tipo κ (*kappa*) e δ (*delta*) (GUTIERREZ et al., 2008; GUTIERREZ et al., 2012; KONNO et al., 2008). Ainda, receptores canabinóides (CB1 e CB2), que apresentam grande interação molecular com os receptores opióides, participam do efeito analgésico da CRF demonstrado em modelo inflamatório agudo, induzido por carragenina e PGE_2 (MACHADO et al., 2010).

Quando administrado perifericamente, na vigência de sensibilização por PGE_2 ou constrição do nervo isquiático de ratos, este peptídeo, da mesma maneira que os

agonistas opióides, altera o estado conformacional dos receptores opióides presentes no gânglio da raiz dorsal (DRG) e no nervo safeno isolado da pata de ratos, indicando a ativação desses receptores (ZAMBELLI, 2011). Adicionalmente, a CRF ativa a via das MAP quinases (ERK1/2 e JNK) em neurônios do DRG, evento dependente da pré-sensibilização com PGE₂, da ativação do receptor opióide tipo κ e da proteína quinase C ζ (ZAMBELLI, 2011).

É importante salientar que este peptídeo é efetivo em induzir antinocicepção em modelo de dor de origem neoplásica, avaliado no modelo de tumor de pata, acarretado pela injeção intraplantar de células do tumor de Walker 256 (BRIGATTE et al., 2007) e pela injeção dessas células tumorais em fêmur de ratos (GUTIERREZ, 2013). Nestes modelos, a CRF administrada por via oral, induz antinocicepção também de longa duração (2 dias), mediada pela ativação de receptores opióides do tipo κ e δ periféricos (BRIGATTE et al., 2013; GUTIERREZ, 2012).

Diferentemente dos fármacos opióides disponíveis na clínica, como a morfina, a CRF destaca-se pela ausência do desenvolvimento de tolerância ao efeito nociceptivo, após o uso prolongado (GUTIERREZ et al., 2008) além de não induzir o desenvolvimento de hiperalgesia tardia e alterações da atividade motora (GUTIERREZ et al., 2008).

Por outro lado, a CRF apresenta característica comum aos fármacos opióides: seu efeito periférico, de longa duração, é detectado apenas na presença de inflamação ou lesão tecidual. Estes achados corroboram aos dados da literatura que demonstram que os fármacos opióides possuem eficácia aumentada na vigência de inflamação (STEIN; LANG, 2009), decorrentes do aumento da expressão de receptores opióides, tanto em nervos periféricos, como em DRG e na medula espinhal (CAHILL et al., 2003; ZAMBELLI et al., 2011). Ainda, em relação aos estudos sobre os mecanismos envolvidos com a atividade analgésica, mais recentemente vem sendo descrita a importância da interação de opióides exógenos e endógenos com células imunes para este efeito. A atividade secretória e funcional de células do sistema imune é mediada pela interação direta desses opióides com os seus receptores presentes na membrana desses leucócitos que passam a secretar peptídeos opióides na vigência da resposta inflamatória. Neste sentido, a ação da CRF sobre a função dessas células, bem como sobre os receptores

opióides expressos por elas, não foi até o presente momento, investigada.

1.2 Receptores Opióides – Estrutura e Função

Cinco tipos diferentes de receptores opióides: *mu* (μ) ou MOR, *delta* (δ) ou DOR, *kappa* (κ) ou KOR, *sigma* (ζ) e *epsilon* (ϵ), foram descritos, sendo que os três primeiros são os receptores responsáveis pelo efeito analgésico dos opióides. Estudos comprovaram a existência de diversos subtipos de receptores dentro de cada tipo, sendo eles: para MOR: μ_1 , μ_2 ; KOR κ_1 , κ_2 , κ_3 e DOR δ_1 , δ_2 . Os receptores opióides são os responsáveis por mediar os efeitos fisiológicos dos fármacos opióides e dos opióides endógenos, incluindo comportamento da dor e analgesia, estresse, tolerância e dependência, aprendizado, atividade sexual e secreção de hormônios, estado de humor, função gastrointestinal, renal, hepática e respiratória, controle da termorregulação e respostas imunológicas (ERFANPARAST et al., 2010; KATSUNG, 2003; SILVA, 2006). Sabe-se que receptores tipo μ estão envolvidos diretamente nos efeitos analgésicos e por alguns dos mais importantes efeitos colaterais (depressão respiratória, euforia, dependência física e sedação), enquanto que receptor tipo κ podem mediar os efeitos sedativos dos opióides, podendo contribuir um pouco para a analgesia. Já os receptores δ contribuem fortemente para a analgesia central.

Os três principais tipos de receptores opióides (μ , κ e δ) são encontrados em altas concentrações no SNC sendo muito observado no corno dorsal da medula espinhal (lâminas I e II), núcleo trigêmeo medular, tálamo, hipotálamo, substância periaquedutal cinzenta, núcleos da rafe, região ventral superior do bulbo e da ponte e *locus coeruleus*. São encontrados receptores também em neurônios de transmissão da dor na medula espinhal e nos aferentes primários que transmitem a mensagem da dor. Estudos demonstraram a presença desses receptores também em células do sistema imune (CHUANG et al., 1995).

Receptores opióides são pertencentes a família dos receptores de membranas acoplados a proteína G (GPCRs) e apresentam um segmento N-terminal extracelular, 7 domínios transmembrânicos, 3 alças extracelulares e intracelulares, além de possuírem uma extensa homologia estrutural devido ao alinhamento das sequências primárias de aminoácidos (ZHANG et al., 2005). Por serem GPCRs, estes receptores compartilham características em comum com outros receptores

desta mesma família, como por exemplo, alterações conformacionais quando estes são ativados por agonistas específicos (CHATURVED et al., 2000).

Da mesma maneira que outros GPCRs, os receptores opióides agem não apenas como monômeros, mas também por meio da formação de complexos heteroméricos e homoméricos com outros subtipos de receptores opióides e outros GPCPs, formando novos receptores com novas propriedades farmacológicas (van RIJIN et al., 2010). A importância da expressão e formação de dímeros na modulação da função imune é foco de estudos recentes (NINKOVIC; ROY, 2013).

Receptores opióides pertencem à classe A (rodopsina, μ , κ , δ), família de receptores acoplados à proteína Gi/Go com um domínio N-terminal extracelular com sete domínios transmembrânicos helicoidal ligados por três domínios extracelulares e três domínios intracelulares, bem como uma cauda C-terminal intracelular. Sete hélices transmembrânicos dos receptores opióides são dispostos sequencialmente de uma forma anti-horário, para formar um feixe helicoidal, juntamente com domínios extracelulares do receptor, isto proporciona uma interface dinâmica para a ligação de vários ligantes opióides. A homologia entre os receptores é cerca de 60%, sendo a maior homologia nas hélices transmembrânicas e a maior diversidade nos seus N e C terminais (NINKOVIC; ROY, 2013). A proteína G é composta por três subunidades: α , β e γ , sendo a subunidade α ligada ao nucleotídeo difosfato de guanosina (GDP). Quando há a ligação de um agonista a estes receptores, ocorrem alterações conformacionais, promovendo a troca de GDT pelo trifosfato de guanosina (GTP), acarretando a dissociação do trímero em subunidades $G\alpha$ e $G\beta\gamma$. Essas subunidades, por sua vez, podem associar-se com outros efetores, tais como canais iônicos ou enzimas, auxiliando em suas funções biológicas. Em relação aos receptores opióides, a subunidade $G\alpha_i$ inibe a enzima Adenilil-ciclase, responsável pela redução da produção do monofosfato de adenosina (AMPc). Sua redução leva à diminuição da liberação de neurotransmissores por reduzir a atividade da via AMPc e proteína quinase A (PKA) (**Figura 2**). Em decorrência, os opióides reduzem a excitabilidade celular por promover hiperpolarização da membrana pela ativação da condutância do potássio e inibição dos canais de cálcio dependentes de voltagem. Esses eventos são mediados pela subunidade $G\beta\gamma$ da proteína G (MOLINA, 2006; NESTLER, 2001).

Ainda, a ativação de receptores opióides ocorre como resposta natural à diferentes desordens, tais como injúria traumática, intervenções cirúrgicas ou sepse resultando na ativação das respostas neuroendócrina e opiácea, que têm como objetivo restaurar a hemodinâmica e a homeostasia bioquímica.

Figura 2 - Efeitos mediados por opióides.

Opióides endógenos e análogos de opiáceos administrados farmacologicamente ligam-se a receptores acoplados à proteína $G_{q/o}$, levando à inibição Adenilil-ciclase (AC), níveis reduzidos de atividade da proteína quinase A (PKA) e diminuição da fosforilação de proteínas alvo. Além disso, a ativação do receptor pela ligação de opióides leva ao aumento da condutância de canais de K^+ e diminuição no influxo de Ca^{++} por meio do canal de Ca -tipo-L. Os opióides exercem seus efeitos em múltiplos alvos centrais e periféricos, produzindo depressão respiratória, analgesia, efeito inotrópico negativo e imunossupressão. cAMP: monofosfato de adenosina cíclico; C: da subunidade catalítica; RII: subunidade reguladora.

Fonte: Molina (2006)

1.3 Opióides Exógenos e Endógenos

1.3.1 Opióides Exógenos

Dos opióides exógeno, a morfina é o principal alcaloide de ópio e o mais extensivamente estudado. A primeira síntese completa da molécula foi realizada em 1952, por GATES e TSCHUDI (GYLBERT L, 1973¹ apud NINKOVIC; ROY, 2013).

¹ Gylbert, L. The Crystal and molecular struture of morphine hydrochloride trihydrate. Acta Crystallographica. 1973; Section B 29(8): 1630-1635.

Sua estrutura geral consiste em dois planos, sendo que o primeiro plano contém um anel de benzeno, um anel de óxido, e um anel carboxílico, enquanto que o segundo plano contém um anel carbocíclico, um anel de etenamina, oxigênio e nitrogênio (GYLBERT, 1973). A morfina é hidrofílica e metabolizada pela mucosa intestinal e fígado em morfina-3-glucuronídeo (M3G, 70%), morfina-6-glucuronídeo (M6G, 10%) e em sulfatos conjugados. Embora M3G é o metabólito mais comum (responsável por 50% dos metabólitos produzidos), não exercem nenhuma atividade biológica quando se ligam a MOR. Por outro lado, a M6G, embora menos frequente (representando 10% dos metabólitos produzidos), pode induzir efeito analgésico por ligação ao MOR (DAHAN et al., 2008). Em relação às ações da morfina sobre as células do sistema imune, diferentes estudos *in vitro* têm demonstrado que este alcaloide ligando-se a seus receptores opióides presentes na membrana de diferentes leucócitos (BRYANT et al., 1988a,b, 1991; EISENSTEIN; HILBURGER, 1998), acarretando efeitos supressores, mediados principalmente pelos MOR (BORNER et al., 2008; GAVERIAUX-RUFF et al., 1998). Outros opióides exógenos, tais como a fentanil e a metadona, com propriedade lipofílica e com atividade analgésica até 100 vezes mais potente que a morfina apresentam ações imunomodulatórias, principalmente sobre a atividade secretória de macrófagos, com a importante participação dos receptores opióides (FILIPCZACK-BRYNIARSKA et al., 2012).

1.3.2 *Peptídeos Opióides*

A descoberta dos opióides endógenos se deu no início da década de 70 por cientistas que buscavam “algo a mais” na caracterização e no mecanismo de sinalização de neurotransmissores no SNC. São três as principais famílias de opióides endógenos: *Enkefalinas*, *Dinorfinas* e *Endorfinas*, onde cada família deriva-se de uma molécula precursora diferente e com característica de distribuição anatômica também distinta, sendo geralmente encontrados em áreas associadas aos sistemas dopaminérgicos, serotoninérgicos, noradrenérgicos e substância P, tais como SNC, glândulas endócrinas como hipófise e adrenal, trato digestivo e outros tecidos (VALLE; OLIVEIRA FILHO, 1996). São elas as *pró-enkefalina*, *pró-dinorfina* e *pró-opiomelanocortina* (POMC), no qual são codificadas, clivadas e

processadas em três genes distintos, resultando na síntese de encefalinas, dinorfinas e endorfinas, respectivamente.

O principal produto da clivagem da POMC é a Beta Endorfina, que embora contenha a sequência de Met-encefalina em sua extremidade amino-terminal, não pode ser convertida a esse peptídeo. Entretanto, a POMC também é capaz de codificar peptídeos não opióides como o hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), hormônio melanócito estimulante (MSH-) e o hormônio pituitário lipotrófico (LPH), uma vez que estes fazem parte de sua sequência estrutural.

Já, as pró-encefalinas codificam as diversas formas de encefalinas (Met ou Leu), incluindo duas formas estendidas de Met-encefalinas (a heptapeptídica e a octapeptídica) e a forma única de Leu-encefalina. Vale a pena citar que, as Met-encefalinas e as Leu-encefalinas se diferenciam pela cadeia estrutural, sendo leucina o último aminoácido que compõe a cadeia da Leu-encefalina (Tyr-Gly-Gly-Phe-**Leu**) e metionina o último que compõe a Met-encefalina (Tyr-Gly-Gly-Phe-**Met**).

As pró-dinorfinas são moléculas precursoras capazes de codificar três peptídeos opióides com cadeias peptídicas iniciais semelhantes a sequência da Leu-encefalina, diferenciando-se no tamanho (tridecapeptídeo) e na composição estrutural (CARVALHO;VIANA, 1998). São elas a dinorfina A, dinorfina B e a neoendorfina.

Os peptídeos opióides compartilham a sequência do amino-terminal comuns de Tyr-Gly-Gly - Phe – (Met ou Leu), que tem sido chamado como *motif* opióides, que representam a sequência mínima de ativação para os receptores opióides (COX; MULLER,1995) . Assim, cada peptídeo opióides é composto por uma região *motif* seguido por várias cadeias aminoácidos na porção C-terminal (GAVAN; HUDA, 2002; MAO, 1990).

O processo de síntese dos opióides endógenos apresenta-se similar a síntese de qualquer outra proteína, no qual cada respectivo DNA é codificado por um RNA mensageiro e encaminhado aos ribossomos onde são produzidas e sintetizadas as moléculas pró-precursoras do respectivo opióides endógeno. Após este processo, a molécula é encaminhada para o complexo de Golgi, onde é estocada e armazenada em forma de grânulos, aguardando estímulo para a clivagem enzimática e conversão do opióides endógeno (MAINS; EIPPE,1999).

As endorfinas foram descobertas em 1975 e são as principais representantes da classe dos opióides endógenos. Compostas por sequências polipeptídicas, são

produtos da clivagem da POMC (AKIL et al., 1984), se sub dividindo, principalmente, em quatro tipos : α endorfina, β endorfina, γ endorfina e σ endorfina, que se diferenciam no número (entre 16 -31) e nos tipos de aminoácidos compostos em sua cadeia estrutural. Sua denominação se origina das palavras *endo* (interno) e *morfina* (analgésico), sendo a β -endorfina sua principal representante. Produzida principalmente pelo hipotálamo e glândula hipófise anterior, a β -endorfina possui um efeito analgésico potente superior ao da morfina, circulando na forma livre como um terminal de 31 aminoácidos em sua cadeia polipeptídica, possuindo alta afinidade por receptores tipo μ e δ , não exercendo qualquer efeito em κ (NINKOVIC; ROY, 2013). As encefalinas compõem uma classe de opióides endógenos provindos da molécula de pro-encefalina e estão envolvidos principalmente na regulação do mecanismo nociceptivo. Podem ser encontradas, como anteriormente descrito, em duas formas: Leu encefalinas e Met-encefalinas, que se diferenciam de acordo com o ultimo aminoácido da porção N- terminal (leucina para leu encefalinas ou metionina para Met-encefalinas). Já as dinorfinas são sintetizadas a partir da proteína precursora prodinorfina em diversos peptídeos ativos, sendo os três principais: a dinorfina A, dinorfina B e neoendorfina (NINKOVIC; ROY, 2013).

Os primeiros estudos realizados nas décadas de 1970 e 1980, concluíram que a produção de opióides endógenos era limitada às células do sistema nervoso. Descobertas recentes demonstraram que todos os peptídeos opióides também são encontrados em leucócitos. As endorfinas são processadas a partir da POMC, processo que ocorre no retículo endoplasmático e na nas redes *trans*-Golgi e foram estudadas mais extensivamente por (RITTNER et al., 2005). A β -endorfina, POMC e todas as enzimas de processadoras foram localizados em leucócitos no sangue e no tecido inflamado de ratos (MOUSA et al., 2004). Portanto, os leucócitos podem processar POMC em β -endorfina funcionalmente ativa. Além disso, met-encefalina, dinorfina e endorfinas também são detectáveis nos leucócitos de tecidos inflamados. Algumas células imunes que contém opióide identificados até o momento são: os linfócitos T e B, granulócitos e monócitos/macrófagos (CABOT et al., 1997; MOUSA et al., 2001; PRZEWLOCKI et al., 1992; RITTNER et al., 2001).

Alcaloides opióides e peptídeos, tais como a morfina e peptídeos opióides endógenos modulam, diretamente, a função de leucócitos. Em particular, os macrófagos, células cruciais na defesa imunológica contra agentes patogênicos e

no controle do desenvolvimento/resolução das reações inflamatória, vêm sendo apontados como alvos celulares-chave para os efeitos supressores desses opióides.

1.4 Macrófagos – Características Gerais

O macrófago foi descrito por Metchnikoff (1905) no final do século dezenove, como uma célula com capacidade fagocitária. Somente a partir dos estudos de McCkaness e colaboradores (1970), a atividade secretora desta célula adquiriu importância.

Ontogeneticamente, o macrófago deriva do saco vitelínico (MOORE; METCALF, 1970) e, no homem adulto, da medula óssea (van FURTH, 1989), a partir da célula precursora para macrófagos e neutrófilos, a CFU-GM (colony-forming unit, granulocyte-macrophage) (METCALF, 1971). A primeira célula da linhagem macrofágica na medula óssea é o monoblasto, ainda pouco diferenciado e cuja divisão dá origem aos pró-monócitos que, ao contrário do seu precursor, já apresentam capacidade de pinocitose e expressam receptores característicos de macrófagos (van FURTH; DIESSELHOFF-DULK, 1970; van FURTH et al., 1980).

O pró-monócito, ao dividir-se, dá origem aos monócitos, que permanecem na medula óssea por aproximadamente 24 horas, encaminhando-se então, para a corrente sanguínea, na forma de monócitos circulantes, que permanecem na circulação por cerca de 70 horas no homem (WHITELOW, 1966) e 25 horas no camundongo (van FURTH; CONH, 1968). Uma vez na circulação, o monócito migra para diferentes tecidos e cavidades do organismo, diferenciando-se em macrófago, de acordo com o tecido e sua função. Nestes tecidos e cavidades, o macrófago permanece como célula residente, com pequena atividade funcional. A baixa capacidade de espraçamento, fagocitose e de secreção basal de determinados produtos, tais como, lisozima, proteinases neutras e ácidas e espécies reativas do oxigênio, confere a esta célula fraca capacidade microbicida e fungicida (CONH, 1978; TAKEMURA; WERB, 1984).

O macrófago residente permanece no órgão ou cavidade para o qual migrou por alguns meses (van FURTH; CONH, 1968) e é considerada célula terminal, sem capacidade de proliferação (GORDON, 1986), embora em algumas ocasiões, tal

fenômeno tenha sido observado, como em macrófagos alveolares (TARLING et al., 1987).

Durante o processo inflamatório, ocorre aumento do número de monócitos circulantes e da sua produção na medula óssea (METCALF, 1971), assim como redução no tempo de permanência dos mesmos na circulação, uma vez que há migração destas células para o foco da lesão (van FURTH et al., 1973). No sítio inflamatório, o monócito, agora denominado macrófago, passa por um processo de ativação, definido como a aquisição de competência para executar uma tarefa complexa (ADAMS; HAMILTON, 1984). Exemplos de funções complexas incluem quimiotaxia, fagocitose, processamento e apresentação de antígenos, lise de parasitas intracelulares, capacidade de morte tumoral. Esta ativação envolve diferentes estágios (COHN, 1978; GORDON, 1986; NATHAN, 1987; WERB et al., 1986) e inclui a) *macrófagos inflamatórios*, com elevada capacidade secretória, de espraiamento e de fagocitose (GORDON, 1995); b) *macrófagos ativados*, com baixa atividade secretória, porém com marcada capacidade de produção de metabólitos reativos de oxigênio e de óxido nítrico, importantes para sua ação tumoricida e microbicida (ADAMS; HAMILTON, 1984; JORENS et al., 1995).

Os macrófagos têm grande atividade secretória, que inclui mais de cem substâncias biologicamente ativas, tais como enzimas, proteínas plasmáticas, hormônios, substâncias que regulam a função e crescimento de outras células (interleucinas, collagenases, ativador do plasminogênio, prostaglandinas E₁ e E₂, fibronectina, componentes do sistema complemento, eritropoetina, interferons, entre outras) (NATHAN, 1987; RAPPOLEE; WERB, 1988; TAKEMURA; WERB, 1984). A secreção destas substâncias determina a multifuncionalidade dos macrófagos e a sua participação em diversos processos fisiológicos e fisiopatológicos, entre esses, a hematopoiese, hemostasia, inflamação, resposta imune, cicatrização, controle do desenvolvimento tumoral, destruição de microorganismos (TAPPER, 1996).

Além do seu papel efetor e fundamental na imunidade inata, os macrófagos mobilizam linfócitos para a elaboração da resposta celular antígeno específico/humoral (GORDON, 1998), e podem alterar a resposta imunológica por meio da sua estimulação por diversos meios, entre eles a produção de citocinas e produtos microbianos (TAYLOR et al., 2005).

Os macrófagos, como participantes da resposta inflamatória, estão sujeitos às modulações características deste processo, que incluem a sua regulação por

meio de modificação do comportamento hormonal (GARCIA LEME, 1989). Por efeitos diretos ou indiretos, os hormônios alteram a resposta inflamatória modificando o perfil celular, através de interação com receptores, promovendo alterações relacionadas à função e metabolismo destas células. Durante o processo inflamatório é observado o aumento da atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, resultando no aumento das concentrações plasmáticas de alguns hormônios, entre eles o adrenocorticotrófico (ACTH), cortisol e do peptídeo opióides, β -endorfina. Esta observação motivou a investigação da possível relação entre estes peptídeos opióides e a atividade do sistema imune (MADDEN; FELTEN, 1995), hipotetizando, de fato, que os opióides endógenos poderiam modular a atividade destas células. Sabe-se que monócitos e macrófagos são modulados por opióides exógenos e endógenos, secretam moléculas opioidérgicas (FLIERL et al., 2008) e que possuem receptores opióides do tipo μ , κ e δ (GEIN et al., 2007; RODA et al., 1996).

1.4.1 Macrófagos e modulação opióide

É bem descrito que opiáceos e peptídeos opióides modulam as respostas imune e inflamatória (JANKOVIÉ; MARIÉ, 1994; KASTIN, 2001; MCCARTHY et al., 2001; ROY; LOH, 1996; WALKER et al., 1997) Essa modulação pode ocorrer de forma indireta, por meio das vias neuroendócrina e neural (ADMSON; WINDH, 1991; MCCARTHY et al., 2001; ROY; LOH, 1996; VACCARINO; KASTIN, 2001; WALKER et al., 1997) ou por ação direta mediada por receptores presentes na superfície das células imune/inflamatória (EISENSTEIN; HILBURGER, 1998; HOUSE et al., 1996; KAMPHIUS et al., 1998; SHARP et al., 1998).

Experimentalmente, estudos *in vivo* demonstraram a ação supressora da morfina sobre funções de macrófagos peritoneais, tais como a quimiotaxia, fagocitose e o metabolismo oxidativo (PEREZ-CASTRILLON et al., 1992). A administração de antagonistas reverteu essa ação, mostrando o envolvimento de receptores opióides clássicos nestes efeitos (ROJAVIN et al., 1993). Estudos *in vitro* comprovaram a ação supressora direta da morfina sobre a função de macrófagos, que, da mesma maneira que observado para os estudos *in vivo*, envolvem a participação dos receptores opióides (ROY et al., 1998a; SZABO et al., 1993; TOMASSINI et al., 2004). De fato, a ativação de receptores opióides em

macrófagos pode atingir diversas vias de sinalização intracelulares, resultando na mudança da atividade funcional dessas células (MAKMAN et al., 1998). Inicialmente, e de forma mais extensiva, a ação da morfina sobre a função de macrófagos foi demonstrada, tanto em ensaios *in vivo*, como *in vitro*. Mais recentemente, outros opióides exógenos foram avaliados nestes diferentes ensaios, demonstrando efeitos modulatórios distintos e divergentes aos encontrados para morfina (FILIPCZAC-BRYNIARSKA et al., 2012), evidenciando que a ação de opióides sobre o sistema imune é complexa e que não pode ser explicada por um único mecanismo.

Peptídeos opióides endógenos, tais como Leu- e Met-enkefalina (agonistas de receptor δ) são capazes de inibir a fagocitose de hemácias de ovelhas opsonizadas por macrófagos, demonstrado em estudos *in vitro* (CASELLAS et al., 1991). Grimm e colaboradores (1998b) mostraram significativa diminuição da capacidade de quimiotaxia por macrófagos, quando essas células foram pré-incubadas com morfina ou met-enkefalina. Esses autores concluíram que esta inibição é decorrente da ligação ao MOR em macrófagos, e subsequente fosforilação e dessensibilização de receptores de quimiocinas, tais como CCR1, CCR2, CXCR1 e CXCR2, tornando-os incapazes de responder aos seus ligantes. Além disso, a Met-enkefalina, *in vitro*, pode determinar diminuição ou aumento da liberação de metabólitos do oxigênio de macrófagos peritoneais obtidos de ratos *Wistar*, conforme a concentração do estímulo utilizado para elicitar estes macrófagos (STANOJEVIC et al., 2008). Ainda, a modulação deste peptídeo opióide sobre esta função depende da interação funcional dos diferentes tipos e subtipos de receptores opióides (STANOJEVIC et al., 2008).

Macrófagos expressam todas as vias necessárias para regular a síntese, processamento e liberação de peptídeos opióides, que por sua vez, podem agir de maneira autócrina ou parácrina (MOUSA et al., 2004; SARAIVA et al., 1998). Portanto, além de serem modulados pelos peptídeos endógenos, macrófagos apresentam peptídeos opióides, tais como a β -endorfina, estocados em grânulos secretores, dispostos na periferia da célula, pronto para serem excitados.

Na gênese da resposta inflamatória, os leucócitos migram para o local de infecção e, em conjunto com as células residentes, secretam várias quimiocinas, tais como CXCL8, CXCL1 e citocinas que levam a hiperalgesia (KRAUS, 2009). As citocinas, por sua vez, são mediadores liberados, tipicamente, por células do

sistema imune, sendo potentes reguladores da expressão gênica de receptor opióide, particularmente, MOR, evidenciando a participação desses mediadores como uma importante base molecular na interação entre os sistemas imune e neural (KRAUS, 2009). Na fase de resolução da resposta, macrófagos e os linfócitos secretam IL-4, IL-10 e IL-13, inibitórias das vias hiperalgésicas em diferentes estágios e levando à analgesia. Ainda, os leucócitos podem libertar os peptídeos opióides sequência estimulação do fator liberador de corticotropina (CRF) e IL-1 β , bem como derivados do neurônio simpático que podem agir em seus respectivos receptores em leucócitos para libertar os peptídeos opióides, que podem modular a função de diferentes leucócitos, bem como podem ligar-se a receptores opióides, na periferia dos nociceptores, levando à ação analgésica (**Figura 3**). Ainda, peptídeos endógenos liberados por células imune e peptídeos exógenos interagem de modo aditivo ou sinérgico, prevenindo ou revertendo as ações de múltiplos estímulos inflamatórios.

Figura 3 - Produção local de peptídeos opióides

Os leucócitos migrados para o tecido inflamatório podem ser estimulados pelo fator liberador de corticotropina (CRF), interleucina-1 β (IL-1) e/ou a noradrenalina (NA) que, por sua vez, estimulam a liberação de opióides por ativação dos seus respectivos receptores encontrados na superfície dos leucócitos. Os opióides liberados ligam-se a receptores opióides dos nociceptores periféricos, diminuindo a excitabilidade desses neurônios e acarretando analgesia.

Fonte: Ninković e Roy (2013)

Experimentalmente, em modelos *in vivo* e *in vitro* pode-se modificar o estado funcional e secretório de macrófagos pela administração de LPS, aumentando a liberação e produção de H_2O_2 e NO, respectivamente, e de citocinas pró-inflamatórias, tais como a IL-6 e o TNF- α (BALOG et al., 2001; MAROTTI et al., 1998). Esta ação estimulatória é suprimida pela morfina (ROY et al., 1998b) e por peptídeos opióides, como as endorfinas (BALOG et al., 2010). O óxido nítrico, *per se*, pode regular a liberação de citocinas em decorrência da ação inibitória sobre a ativação transcricional do NF κ B (MATTHEWS et al., 1996; PARK et al., 1997). Citocinas pró-inflamatórias, tais como o TNF- α e a IL-1 induzem a transcrição de receptores opióides tipo μ , acompanhada pela ativação da via do NF κ B (KRAUS et al., 2003). Adicionalmente, estudos recentes demonstraram que a estimulação de macrófagos pelo LPS leva à ativação de receptores *Toll like* (TLRs), aumentando a translocação do NF κ B, levando ao aumento da expressão dos TLRs. Nestas condições, opióides, como a morfina e peptídeos opióides endógenos exercem seus efeitos inibitórios via ativação de MOR, que por sua vez, inibe a expressão de TLR4, evidenciando novos mecanismos envolvidos nas ações imunossupressoras dos opióides (FRANCHI et al., 2012).

Apesar dos diferentes estudos realizados para a compreensão dos efeitos dos opióides endógenos e exógenos sobre a resposta imune, a relevância dessas ações para a modulação da resposta inflamatória e da transmissão dolorosa não está completamente elucidado. Além do mais, a ação inibitória de opióides sobre a liberação de citocinas e quimiocinas pode reduzir os sinais inflamatórios e reduzir potencialmente a dor, por agirem em nociceptores e DRG, o que torna importante a caracterização dos efeitos de substâncias opióides sobre o sistema imune.

* * *

Como assinalado na Introdução, é bem descrito que opiáceos e opióides endógenos modulam as respostas imune e inflamatória de forma indireta, por vias neuronal ou neuroendócrina, ou de forma direta, no qual células imune/inflamatórias sintetizam e secretam opióides endógenos e ativam seus receptores opióides para autoregulação. Dentre essas células, estão os macrófagos, que possuem uma alta capacidade secretora e participação fundamental no primeiro mecanismo de defesa do organismo.

Recentemente foi caracterizada, a partir do veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus*, a Crotalfina (CRF), um peptídeo com atividade analgésica, cujos estudos experimentais demonstraram que este peptídeo induz uma potente atividade antinociceptiva em diferentes modelos de dor. É interessante ressaltar que a CRF exerce seus efeitos através da ativação de receptores opióides em células e tecidos, principalmente receptores do tipo κ e δ , e é observada que sua eficiência ocorre apenas na vigência de lesão tecidual/inflamação. Este fato alavanca a hipótese da importância de células do sistema imune na ação analgésica descrita para este peptídeo. Assim, esse estudo demonstrará, pela primeira vez, a modulação da CRF sobre a função de macrófagos quiescentes e inflamatórios.

2 OBJETIVO

Baseados nestes fatos, o objetivo do presente estudo foi investigar, *in vitro*, a modulação da CRF sobre o comportamento funcional de macrófagos e a importância de receptores opióides nestas ações.

Para tal, foi realizado:

- 1) a caracterização da ação modulatória da CRF sobre o comportamento funcional de macrófagos peritoneais, avaliando a atividade de fagocitose, liberação de peróxido de hidrogênio, produção de óxido nítrico e secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) de macrófagos residentes ou em estado inflamatório;
- 2) a expressão e ativação dos principais tipos de receptores opióides μ (MOR), κ (KOR) e δ (DOR) em macrófagos peritoneais residentes ou em estado inflamatório (estimulados *in vitro* com LPS, 5 μ g/mL), por meio da avaliação da expressão protéica (*Western Blotting*) e por ensaio colorimétrico (ELISA), respectivamente;
- 3) a caracterização da ação da CRF sobre a expressão e ativação dos principais tipos de receptores opióides μ (MOR), κ (KOR) e δ (DOR) em macrófagos peritoneais residentes ou em estado inflamatório (estimulados *in vitro* com LPS, 5 μ g/mL), por meio da avaliação da expressão protéica (*Western Blotting*) e por ensaio colorimétrico (ELISA), respectivamente;
- 4) o bloqueio seletivo e não seletivo de MOR, KOR e DOR a fim de avaliar o envolvimento dos receptores opióides na ação da CRF sobre a regulação da fagocitose, liberação de peróxido de hidrogênio, produção de óxido nítrico e secreção de citocinas pró inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) de macrófagos peritoneais residentes ou em estado inflamatório.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Aprovação do comitê de ética em experimental animal

Os procedimentos realizados neste estudo estão de acordo com os princípios éticos para experimentação animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB – protocolo nº 612/09) e pela Comissão de Ética para Experimentação Animal (CEEA - protocolo nº 138/09) do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo Instituto de Ciências Biomédicas.

3.2 Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos, com peso entre 160-180g, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan. Os animais foram mantidos em biotério com ciclo claro/escuro de 12/12 horas, com início do período claro às 07:00 horas, temperatura e umidade relativa do ar controladas em 22 ± 2 °C e $60 \pm 5\%$, respectivamente. Os animais tiveram acesso à água e ração *ad libitum*.

3.3 Obtenção do precipitado celular

Os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂. Em seguida, foram injetados 10 mL de PBS (pH 7,4) na cavidade peritoneal dos animais, permanecendo por aproximadamente 30 segundos. Após este período, a cavidade peritoneal foi aberta, o fluído peritoneal colhido com o auxílio de pipeta Pasteur de polietileno e centrifugado (1200 rpm/15 min a 4 °C) para a obtenção do precipitado celular (SAMPAIO et al., 2001; SAMPAIO et al., 2005).

3.4 Contagem de células peritoneais

O precipitado celular foi ressuspenso em 1 mL de meio RPMI e uma alíquota diluída na proporção de 1:20 com solução de azul de Tripan, para a contagem das células em hemocitômetro de Neubauer. Após a contagem, o precipitado celular foi novamente ressuspenso em concentrações celulares específicas para cada ensaio.

3.5 Adesão celular

Macrófagos foram aderidos ao fundo de diferentes placas de cultura (24 ou 96 poços), por 1 hora. Para a realização do ensaio de fagocitose, os macrófagos foram aderidos em lamínulas de vidro contidas em placas de cultura de 24 poços, por 20 minutos, em estufa a 37 °C e 5% de CO₂. Em seguida, as placas foram lavadas com PBS e preparadas para o início dos ensaios, conforme descrito a seguir.

3.6 Delineamento Experimental

Na primeira etapa deste estudo, foi investigada, *in vitro*, a ação da CRF, sobre a função de macrófagos peritoneais. Para tanto, macrófagos foram aderidos por 1 hora e incubados na presença de CRF (1µM), na ausência (residente) ou na presença de LPS (inflamatório), por 24 horas em incubação a 37°C e 5% de CO₂. Como controle positivo, foi utilizada Morfina (1µM). Após esse período, os diferentes ensaios funcionais foram realizados (**Esquema 1**).

Esquema 1

Na segunda etapa do estudo, avaliou-se o envolvimento dos receptores opióides nas ações da CRF sobre as funções de macrófagos. Para tanto, as células foram aderidas por 1 hora e incubadas na presença de antagonistas seletivos ou não seletivo de receptores opióides, por 1 hora em estufa, a 37°C e 5% de CO₂. Em seguida, foi acrescentada CRF ao meio de cultura, na concentração de 1 µM, na ausência (residente) ou na presença de 5 µg/mL de LPS (inflamatório), por 24 horas, a 37°C e 5% de CO₂. Como controle positivo, foi utilizada Morfina (1µM). Adicionalmente, culturas de macrófagos incubados apenas na presença de antagonistas foram realizadas. Após esse período, os diferentes ensaios funcionais foram realizados (**Esquema 2**).

3.7 Tratamentos Farmacológicos

3.7.1 Descrição dos fármacos utilizados

3.7.1.1 Fármacos agonistas de receptores opióides

- ✓ **Crotalfina (CRF) (Amarican Peptide Company Inc.)** O peptídeo foi obtido por síntese em fase sólida, utilizando estratégia Fmoc (American Peptide Company Inc, EUA) produto número 331065, pureza 98%, denominado CNF 021.03cc). A CRF foi mantida a -20°C e diluída em meio de cultura RPMI e utilizada na concentração de 1µM (ZAMBELLI, 2011).
- ✓ **Morfina (Protequim Brasil):** Agonista de receptores opióides. Foi acrescentada ao meio de cultura RPMI e utilizada na concentração final de 1µM (BRASKARAN et al., 2001).

3.7.1.2 Fármacos antagonistas de receptores opióides

- ✓ **Naloxona (Sigma-Aldrich Inc):** Antagonista não seletivo de receptores opióides. Dissolvida em meio de cultura RPMI e utilizada na concentração de 1 μ M (STANOJEVIC et al., 2008).
- ✓ **D-PHE-CYS-TYR-D-TRP-ORN-PEN (CTOP) (Sigma-Aldrich Inc.):** Antagonista seletivo de receptor opióide tipo μ (MOR). Dissolvida em meio de cultura RPMI e utilizada na concentração de 1 μ M (VUJIC et al., 2004).
- ✓ ***nor*-Binaltorphimine (*nor*-BNI) (Sigma-Aldrich Inc.):** Antagonista seletivo de receptor opióide tipo κ (KOR). Dissolvida em meio de cultura RPMI e utilizada na concentração de 1 μ M (STANOJEVIC et al., 2008; ZAMBELLI, 2011).
- ✓ **Naltrindole (Sigma-Aldrich, EUA):** Antagonista seletivo de receptor opióide tipo δ (DOR). Dissolvida em meio de cultura RPMI e utilizada na concentração de 1 μ M (VUJIC et al., 2004).

3.8 Estudo da viabilidade celular

3.8.1 Ensaio de viabilidade celular por Cristal Violeta

A viabilidade celular foi avaliada por detecção da fragmentação de DNA, utilizando o corante Cristal Violeta (0,2% diluído em etanol 2%), de acordo com KUENG e colaboradores (1989). Após o período de adesão e de cada tratamento farmacológico, foi acrescentado solução do corante de Cristal de Violeta em cada poço, contendo as células peritoneais (10^6 células/ poço), permanecido em temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida os poços foram lavados com PBS e o corante eluído com solução de Citrato de Sódio (0,05 mol) em etanol 50%, por 10 minutos. A seguir, foi efetuada a leitura da absorbância em leitor de ELISA a 540 nm.

3.9 Caracterização da prevalência dos principais tipos de receptores opióides presentes em macrófagos peritoneais

3.9.1 Avaliação por expressão protéica – Western Blotting

A fim de caracterizar quais os tipos e a prevalência dos principais receptores opióides em macrófagos residentes ou inflamatórios, a expressão protéica desses receptores foi quantificada por ensaio de *Western Blotting*. Inicialmente, macrófagos peritoneais foram aderidos por 1 horas em placas de 6 poços (1×10^6 células/poço), em estufa, a 37 °C, atmosfera contendo 5% de CO₂ e tratados de acordo com o descrito no **Item 3.6**. Para a extração de proteína, as amostras foram homogeneizadas em tampão contendo Hepes-NaOH (1M, pH 7,9), NaCl (1,54 M), EGTA (200 mM), Triton-X 100 (1%) e coquetel de inibidores de protease e fosfatase (1:300, Sigma-Aldrich, EUA). As amostras foram centrifugadas a 10.000 g, por 20 minutos, a 4 °C. Após a centrifugação, a concentração de proteína foi determinada por método de Bradford (BRADFORD, 1976). Alíquotas contendo 30 µg de proteína total foram fervidas em tampão Leammli por 4 minutos e posteriormente, submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), de 10%, em aparelho para mini gel (BioRad, EUA). Após a separação por eletroforese, as proteínas do gel foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose (BioRad, EUA), sendo posteriormente bloqueada por 1 hora, em TBST (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl e 0,1% Tween 20) contendo 5% de leite desnatado. Em seguida as membranas foram mantidas em TBST (20 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl e 0,1% Tween 20) contendo 5% de leite desnatado e anticorpos anti-receptor μ e anti-receptor δ (Chemicon, EUA, na diluição 1:1000) ou anti-receptor κ (Santa Cruz Biotechnology, EUA, na diluição 1:500), por período *overnight* em câmara fria (4 °C). As bandas existentes nas membranas foram visualizadas por auto-radiografia pós-reação de quimiluminescência. O método da quimiluminescência consiste nos seguintes passos: 1) após o período com anticorpo primário, a membrana é mantida, por 1 hora com anticorpo anti-IgG conjugado a peroxidase em solução bloqueadora (1:1.000); 2) em seguida as membranas são lavadas 3 vezes com solução TBS-T e expostas, por 1 minuto, a 1 mL de reagente do kit quimiluminescente (Amershan, EUA), e 3). Em seguida, os filmes de raio X foram expostos às membranas em cassete escuro. Esta exposição durou entre meio e dez

minutos, dependendo da concentração da proteína da amostra e da sensibilidade do filme de raio X. A densidade óptica das bandas foi determinada pelo programa TotalLab (Nonlinear Dynamics, EUA). A quantidade de proteína de cada amostra foi normalizada pela exposição da membrana com anticorpo para GAPDH (Santa Cruz Biotechnology, EUA, na diluição 1:10.000).

3.9.2 Determinação do estado de ativação (alteração conformacional) de receptores opióides - ELISA

A ativação de MOR, KOR e DOR, em sua forma ativa, foi determinada pela técnica de ELISA, adaptada por Gupta e colaboradores (2006). Para tanto, foram utilizados anticorpos que reconhecem alterações estruturais, na porção N-terminal, compatíveis com a ativação destes receptores. Macrófagos peritoneais (1×10^6 células/poço) foram aderidos em placas de 96 poços, por 1 hora em estufa, a 37 °C, atmosfera contendo 5% de CO₂ e tratados de acordo com o descrito no **Item 3.6**. Em seguida as células foram fixadas com Metanol 100%, gelado, por 15 minutos e bloqueadas, por 90 minutos, com solução de TBS-T contendo 5% de sacarose e 1% de BSA. Em seguida, as células foram mantidas, *overnight*, a 4 °C, com anticorpos anti-MOR (1:500) (Chemicon, EUA), anti-KOR (1:250) (Santa Cruz Biotechnology, EUA) e anti-DOR (1:500) (Chemicon, EUA), para a caracterização dos receptores totais (controle do ensaio) ou com anticorpos primários anti-MOR, KOR e DOR, conformação específica (1:1.000) (GUPTA et al., 2007) (Proteimax Biotecnologia Ltda, Brasil) para a caracterização de receptores ativados. Imediatamente as placas foram lavadas com PBS e os poços mantidos com anticorpos secundários anti-IgG de coelho conjugado à peroxidase (1:5.000) (Sigma-Aldrich, EUA), por 2 horas. A reação foi revelada pela adição de reagente OPD (o-Phenylenediamine dihydrochloride) (Sigma-Aldrich, EUA) 0,5 g/mL, diluído em tampão citrato/fosfato e 0,3% de H₂O₂, sendo interrompida após 5 minutos com a adição de ácido cítrico 0,2 M. O produto da reação foi então transferido para placas de 96 poços e a absorbância determinada em leitor de ELISA (Bio-Rad, EUA) em comprimento de onda de 450 nm.

3.10 Avaliação dos parâmetros funcionais

3.10.1 Caracterização da capacidade de fagocitose

3.10.1.1 *Preparação do zimosan para a avaliação da fagocitose mediada por receptores C3b do sistema complemento*

Uma suspensão contendo 50-57 mg/mL de zimosan foi diluída 10 vezes em PBS (pH 7,4) e passada quatro vezes em seringa estéril com agulha fina. O material foi incubado com soro obtido de ratos controles, na proporção de 1:10, a 37 °C, sob agitação. Após 30 minutos, o material foi centrifugado a 1150 rpm/15 minutos e o precipitado suspenso em PBS (pH 7,4), sendo este procedimento repetido por mais três vezes. Após a última centrifugação, o material foi suspenso em meio RPMI para o ensaio de fagocitose. O número de partículas foi de 2×10^6 células/ml, conforme descrito por SAMPAIO e colaboradores (2001; 2003).

3.10.1.2 *Avaliação da capacidade fagocítica*

Os macrófagos (2×10^5 células/ml) foram aderidos sobre lamínulas circulares de vidro como descrito no **Item 3.5**. Em seguida, as lamínulas foram lavadas com PBS e as células incubadas com meio RPMI contendo ou não os tratamentos farmacológicos e/ou LPS (5 µg/ml), a 37 °C, em atmosfera contendo 5% CO₂, por 24 horas. Após este período, as lamínulas foram lavadas com PBS e as células incubadas por 40 minutos, sob as mesmas condições acima citadas, com meio RPMI contendo as partículas de zimosan. Em seguida as lamínulas foram lavadas com PBS e fixadas com May-Grunwald, modificado por ROSENFELD (1971). A porcentagem de fagocitose foi determinada em cada amostra, pela contagem de 100 células em microscópio de contraste de fase (Standart 25, Carl Zeiss - Alemanha), pelo número de macrófagos que fagocitaram mais de três partículas (SAMPAIO et al., 2003, 2006).

3.10.2 Determinação da produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2):

A quantificação de H_2O_2 foi realizada por técnica adaptada para microensaio por PICK e MIZEL (1981). Macrófagos peritoneais (4×10^5 células/mL) foram suspensos e adicionados em poços de placas de cultura e incubados por 1 hora a 37 °C, em atmosfera úmida a 5% de CO_2 , para a aderência das células. Após este período, as células foram tratadas conforme o **Item 3.6**. Os poços foram lavados com PBS e as células incubadas, por 1 hora, em estufa a 37°C e 5% CO_2 , com solução de fenol vermelho e acetato de forbol miristato (PMA-40 ng). Em seguida a reação foi interrompida pela adição de hidróxido de sódio 1N (NaOH). Os ensaios foram realizados em quadruplicatas e, simultaneamente as mesmas amostras sem estímulo de PMA, foram avaliadas para verificar a produção espontânea do H_2O_2 . A absorbância foi determinada em leitor de ELISA, com filtro de 620 nm e os resultados apresentados e calculados em nmols de H_2O_2 por 4×10^5 células.

3.10.3 Determinação da produção de óxido nítrico (NO^*)

A produção de NO^* foi avaliada por método indireto de DING e colaboradores (1988), no qual NO^* é determinado pela produção de nitrito de sódio ($NaNO_2$). Macrófagos peritoneais (2×10^6 células/mL) foram suspensos e adicionados em poços de placas de cultura e incubados por 1 hora a 37 °C, em atmosfera úmida a 5% de CO_2 , para a aderência das células. Após este período, as células foram lavadas com PBS e tratadas conforme o **Item 3.6**. Meio RPMI com 10% de soro fetal bovino, contendo LPS (5 μ g/mL), foi adicionado em cada poço e as células então incubadas, por 48 horas, em estufa a 37 °C e 5% CO_2 . O sobrenadante foi transferido para placa de leitura e reagente de Griess, na proporção de 1:1 (v/v) foi adicionado. Em seguida, a placa foi lida em leitor de ELISA a 550 nm. Os valores foram comparados com uma curva padrão de $NaNO_2$ a 5-60 μ M e os resultados expressos em μ M de nitrito produzidos por 2×10^5 células. Simultaneamente, foram mantidos poços controles sem adição de LPS para a análise da produção espontânea de NO^* .

3.10.4 Secreção das interleucinas pró-inflamatórias

3.10.4.1 Obtenção do sobrenadante para a realização do ensaio

Macrófagos peritoneais (1×10^6 células/mL) foram adicionados em poços de placas de cultura (24 poços) e incubados por 1 hora a 37 °C, em atmosfera úmida a 5% de CO₂, para a aderência das células. Após este período, as células foram lavadas com PBS e tratadas conforme o **Item 3.6**, sendo acrescentado LPS (5 µg/mL) em cada poço. As placas foram mantidas em estufa, a 37 °C, em atmosfera úmida a 5% de CO₂, por 24 horas. Imediatamente após, o sobrenadante foi coletado e congelado a -80 °C para a determinação das citocinas. Simultaneamente, foram mantidos poços controles, sem adição de LPS, para a análise da produção espontânea das citocinas pró-inflamatórias.

3.10.4.2 Quantificação das citocinas pró-inflamatórias

As principais citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) foram quantificadas por kits comerciais DuoSet (R&D System®, Minneapolis, MN, USA), por técnica de ELISA, de acordo com as técnicas padronizadas pelo fabricante. Resumidamente, placas de 96 poços (Nunc, EUA) foram sensibilizadas com anticorpo de captura específico para cada citocina, e mantidos em temperatura ambiente, *overnight*. A suspensão foi aspirada e as placas lavadas com PBS + Tween 20. Em seguida, as placas foram bloqueadas com diluente do ensaio e mantidas, no escuro, por 1 hora, à temperatura ambiente. Após este período, novamente as placas foram aspiradas e lavadas com PBS+ Tween 20. Em seguida, foram adicionados os padrões ou o sobrenadante de cultura de macrófagos (descrito acima) em cada poço. As placas foram mantidas por 2 horas, no escuro, em temperatura ambiente. Após este período, as placas foram novamente aspiradas e lavadas com PBS + Tween 20. Em seguida, anticorpo específico de detecção para cada citocina foi adicionado em cada poço e, novamente, as placas foram mantidas por 2 horas, no escuro, em temperatura ambiente. Após este período, as placas foram aspiradas e lavadas com PBS+ Tween 20. Foi então adicionado estreptavidina em cada poço e as placas mantidas por 20 minutos à temperatura ambiente, no escuro. Em seguida, as placas foram novamente

aspiradas e lavadas com PBS+ Tween 20. Tetrametilbenzidína (TMB) foi adicionado em cada poço e as placa mantidas por 20 minutos, à temperatura ambiente, protegidas da luz. A reação foi bloqueada com solução de ácido fosfórico (H_3PO_4), e a leitura imediatamente realizada em leitor de ELISA, a 450 nm. Os resultados foram expressos em pg/ml.

3.11 Análise estatística

Os dados estão representados com média $\pm$ erro padrão da média. A análise estatística foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA) por uma via associado ao teste de Tukey no programa GraphPad Prism5 (GraphPad Software Inc., EUA). Índice de significância de $p < 0,05$ foi adotado.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterização da ação da Crotalina sobre o comportamento funcional de macrófagos

A Crotalina, um peptídeo que induz potente atividade antinociceptiva em diferentes modelos de dor aguda e persistente, de longa duração apenas na vigência de lesão tecidual/inflamação. Este fato alavanca a hipótese da modulação deste peptídeo sobre células imune.

Para caracterizar a ação da CRF sobre a atividade funcional de macrófagos residentes ou inflamatórios, primeiramente foi avaliado o possível efeito citotóxico este peptídeo, bem como o da Morfina, utilizada neste estudo como controle positivo, uma vez que suas ações sobre a função de macrófagos estão bem estabelecidas. Assim, estas células foram mantidas em incubação, por 24 horas, na presença de CRF ou Morfina (1 μ M). Não foi observada perda de viabilidade dos macrófagos, residentes ou inflamatórios, apresentando-se superior a 95%, quando comparados às células controle incubadas apenas na presença de meio de cultura (*dados não mostrados*). Demonstrado que a concentração da CRF e Morfina, bem como o período de incubação não acarreta a perda da viabilidade celular, foram avaliadas as funções de fagocitose, liberação de H₂O₂, produção de NO[•] e secreção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β , IL-6 e TNF α .

4.1.1 Avaliação da capacidade de fagocitose

Os resultados obtidos e apresentados na **Figura 4A** mostram que a CRF foi capaz de inibir significativamente a capacidade de fagocitose de partículas de zimosan por células residentes (14%), e efeito similar foi observado para a Morfina (14%). O mesmo comportamento inibitório foi observado sobre macrófagos inflamatórios, uma vez que a ação inibitória da CRF sobre a atividade de fagocitose foi de 12,5%, acompanhada pela ação supressora da Morfina (11%), conforme demonstra a **Figura 4B**.

Figura 4 -Efeito da Crotalina sobre a fagocitose mediada por receptor C3b do sistema complemento

A)

B)

Macrófagos peritoneais foram aderidos a lamínulas de vidro circulares colocadas no fundo de placas de cultura de 24 poços, por 20 minutos. Em seguida, o meio foi retirado e acrescentado meio contendo Morfina (1 μ M, controle positivo) ou CRF (1 μ M), ou apenas meio de cultura (controle). As células permaneceram em incubação por 24 horas. Após este período, as lamínulas foram lavadas com PBS, e as células foram incubadas com meio contendo as partículas de zimosan opsonizado, por 40 minutos. **(A)** Macrófagos residentes **(B)** Macrófagos inflamatórios. Os valores estão apresentados em % de fagocitose e representam 3 ensaios distintos. * $p < 0.05$ em relação ao grupo controle.

4.4.2 Efeito da Crotalina sobre a liberação de H_2O_2

A **Figura 5A** demonstra que a CRF é capaz de inibir significativamente a liberação de H_2O_2 (19%), por macrófagos residentes, quando comparado ao grupo controle. A Morfina apresentou o mesmo comportamento, com redução de 19%, sob as mesmas condições experimentais.

A ação inibitória da CRF sobre esta função apresenta-se de forma mais marcante quando os macrófagos se encontram em estado inflamatório, observando-se uma redução de 24% na liberação deste reativo do oxigênio, quando comparado ao grupo controle. Morfina promoveu, mais uma vez, uma inibição da liberação de H_2O_2 de mesma magnitude (**Figura 5B**).

Figura 5 - Efeito da Efeito da Crotalfina sobre a liberação de H_2O_2 **A)** **B)**

Macrófagos peritoneais foram aderidos no fundo de placas de cultura por uma hora. Em seguida o meio foi retirado e acrescentado meio contendo Morfina ($1 \mu M$, controle positivo) ou CRF ($1 \mu M$), ou apenas meio de cultura (controle). As células permaneceram em incubação por 24 horas. Após este período, as células incubadas com solução de *Fenol Red* para determinar a produção de peróxido de hidrogênio, de acordo com método descrito por Pick & Mizel. **(A)** Macrófagos residentes **(B)** Macrófagos inflamatórios. Os valores estão apresentados em nM de H_2O_2 / 4×10^5 células. * $p < 0,05$ por comparação com o grupo controle.

4.1.3 Efeito da Crotalina sobre a produção de NO[•]

Os resultados apresentados nas **Figuras 6A e 6B** demonstram que a CRF também é capaz de inibir a produção de espécies reativas do nitrogênio, uma vez que, macrófagos residentes incubados com CRF apresentaram redução de 14% (**Figura 6A**) e que macrófagos inflamatórios reduziram sua produção em 25%, quando comparado aos respectivos controles (**Figura 6B**). Sob as mesmas condições experimentais, células incubadas com Morfina apresentaram inibição similar ao observado pelas células incubadas com CRF, independentemente do estado de ativação das células (**Figuras 6A e 6B**).

Figura 6- Efeito da Efeito da Crotalfina sobre a produção de NO[•]

Macrófagos peritoneais foram aderidos no fundo de placas de cultura por uma hora. Em seguida, o meio foi retirado, as células foram lavadas com PBS e acrescentando novo meio contendo Morfina (1µM, controle positivo) ou CRF (1µM), ou apenas meio de cultura (controle). As células permaneceram em incubação por 48 horas. Após este período, o sobrenadante das placas foi transferido para placa de leitura e reagente de Griess, na proporção de 1:1 (v/v), foi adicionado. **(A)** Macrófagos residentes; **(B)** Macrófagos inflamatórios. Os valores estão apresentados em µM de nitrito/ 2x10⁶ células e representam 3 ensaios distintos. *p< 0,05 por comparação com o grupo controle.

4.1.4 Efeito da Crotalina sobre a secreção de citocinas pró-inflamatórias

4.1.4.1 Sobre a IL-1 β

A CRF acarretou aumento significativo da secreção de IL-1 β (148%) por macrófagos residentes, quando comparado ao Controle (**Figura 7A**). O mesmo efeito inibitório e de mesma magnitude semelhante foi observado para a Morfina (110%) (**Figura 7A**).

Macrófagos inflamatórios incubados com CRF ou Morfina apresentam aumento significativo da secreção da IL-1 β (126% e 132%, respectivamente), quando comparado com grupo controle (**Figura 7B**).

4.1.4.2 Sobre a IL-6

Em relação a IL-6, as células residentes incubadas com CRF apresentam aumento significativo (67%) no comportamento da secreção desta citocina, quando comparado ao grupo controle (**Figura 8A**). A morfina acarretou efeito estimulatório de menor magnitude, porém, significativo (12%).

Diferentemente das células residentes, as células inflamatórias apresentaram diminuição da secreção da IL-6, após a incubação com CRF (13%) e Morfina (16%), quando comparados ao grupo controle (**Figura 8B**).

4.1.4.3 Sobre o TNF- α

Conforme demonstrado na **Figura 9A**, diferentemente ao observado para IL-1 β e IL-6, a secreção de TNF- α por macrófagos residentes foi significativamente inibido pela CRF (51%), quando comparado ao grupo controle. Da mesma forma, a Morfina inibiu significativamente (65%) a produção desta citocina, quando comparado ao controle (**Figura 9A**).

Macrófagos inflamatórios incubados com CRF e Morfina apresentam diminuição da secreção de TNF- α (47% e 51%, respectivamente), quando comparado ao controle, conforme demonstrado na **Figura 9B**.

Figura 7 - Efeito da Crotalfina sobre a secreção de IL-1 β

Macrófagos peritoneais foram aderidos no fundo de placas de cultura por uma hora. Em seguida, o meio foi retirado e acrescentado novo meio contendo Morfina (1 μ M, controle positivo) ou CRF (1 μ M), ou apenas meio de cultura (controle). As células permaneceram em incubação por 24 horas. A secreção de IL-1 β foi quantificada de acordo com as recomendações do fabricante do kit comercial (R&D). **(A)** Macrófagos residentes; **(B)** Macrófagos inflamatórios Os valores estão apresentados em pg/ml e representam 3 ensaios distintos. * $p < 0,05$ por comparação com o grupo controle. ** $p < 0,05$ por comparação com o grupo Morfina.

Figura 8 - Efeito da Crotalfina sobre a secreção de IL-6

Macrófagos peritoneais foram aderidos no fundo de placas de cultura por uma hora. Em seguida, o meio foi retirado e acrescentado novo meio contendo Morfina ($1\mu\text{M}$, controle positivo) ou CRF ($1\mu\text{M}$), ou apenas meio de cultura (controle). As células permaneceram em incubação por 24 horas. A secreção de IL-6 foi quantificada de acordo com as recomendações do fabricante do kit comercial (R&D). **(A)** Macrófagos residentes; **(B)** Macrófagos inflamatórios. Os valores estão apresentados em pg/mL e representam 3 ensaios distintos. * $p < 0,05$ por comparação com o grupo controle.

Figura 9- Efeito da Crotalfina sobre a secreção de TNF- α

Macrófagos peritoneais foram aderidos no fundo de placas de cultura por uma hora. Em seguida, o meio foi retirado e acrescentado novo meio contendo Morfina (1 μ M, controle positivo) ou CRF (1 μ M), ou apenas meio de cultura (controle). As células permaneceram em incubação por 24 horas. A secreção de TNF- α foi quantificada de acordo com as recomendações do fabricante do kit comercial (R&D). **(A)** Macrófagos residentes; **(B)** Macrófagos inflamatórios. Os valores estão apresentados em pg/ml e representam 3 ensaios distintos. * $p < 0,05$ por comparação com o grupo controle.

4.2 Expressão e ativação de receptores opióides em macrófagos residentes ou inflamatórios induzidos por LPS

Receptores opióides são detectados em células do sistema imune e sua expressão e ativação podem ser dependentes do tipo celular, duração da cultura e estímulo utilizado.

Inicialmente, foi investigada a expressão e ativação de receptores opióides MOR, KOR e DOR em macrófagos residentes ou inflamatórios, após 24 horas de incubação *in vitro*. Os resultados apresentados na **Figura 10** demonstram que macrófagos peritoneais residentes ou inflamatórios, apresentam expressão dos três principais tipos de receptores opioides (μ , κ e δ), havendo, em células residentes, o predomínio de KOR, seguido por MOR e DOR (**Figura 10A**). Em células inflamatórias, foi observado o predomínio de MOR, seguido por KOR e DOR (**Figura 10B**).

Em continuidade a caracterização dos receptores, foi avaliada a ativação basal de MOR, KOR e DOR, por ensaio de ELISA modificado. Para tanto, foram utilizados anticorpos anti-receptores opióides que reconhecem especificamente o receptor em sua forma ativa, isto é, quando o receptor apresenta alteração estrutural na sua porção N-terminal. Como controle destes experimentos foram utilizados anticorpos para ensaios de *Western Blotting*, uma vez que estes reconhecem os receptores independentes da sua alteração estrutural. Os resultados apresentados pelos gráficos das **Figuras 11A e 11B**, representam o percentual da ativação dos receptores em estado ativo sobre o total (controle 100%).

Como observado no ensaio de *Western Blotting*, os macrófagos peritoneais residentes apresentam maior ativação de KOR (95%) seguido por MOR (65%) e DOR (45%) (**Figura 11A**), enquanto que macrófagos inflamatórios apresentaram maior ativação MOR (90%), seguido por KOR (65%) e DOR (45%) (**Figura 11B**).

Figura 10 – Caracterização da expressão de receptores MOR, KOR e DOR em macrófagos peritoneais residentes ou inflamatórios

A)

B)

A expressão protéica dos receptores opióides foi demonstrada por técnica de SDS-Page seguida por *Western Blotting*. **(A)** Macrófagos residentes **(B)** macrófagos inflamatórios. Os valores estão normalizados pela expressão de β -actina e apresentados como intensidades das bandas de MOR, KOR e DOR, quantificadas por densitometria de *Western Blotting*. Os dados foram representados em unidades arbitrárias (U.A) e são representativos de 3 experimentos distintos.

Figura 11 – Caracterização da ativação de receptores MOR, KOR e DOR em macrófagos peritoneais residentes ou inflamatórios

A)

B)

Macrófagos residentes foram coletados da cavidade peritoneal (1×10^6 células), aderidos por 1 hora, em poços de placas de cultura, e em seguida, incubadas com meio de cultura RPMI 1640, por 24 horas. Após este período as placas foram lavadas com PBS, e as células incubadas, *overnight*, com anticorpos (Proteimax, Brasil) responsáveis pelo reconhecimento exclusivo da forma ativa dos receptores. A ativação de MOR, KOR e DOR foi demonstrada por técnica de ELISA, adaptada por Gupta e colaboradores (2007). **(A)** Macrófagos residentes **(B)** Macrófagos inflamatórios. Os valores estão apresentados em porcentagem de aumento em relação às células controles, incubadas com anticorpos para receptores totais, cujo valor de está representado pela linha tracejada (100%). * $p < 0,05$ por comparação com os valores obtidos em células controle, ** $p < 0,05$ por comparação com os valores obtidos por MOR.

4.3 Caracterização da expressão e ativação de receptores opióides em macrófagos residentes ou inflamatórios após incubação com a Crotalfina

Administrado perifericamente, este peptídeo, frente a estímulo inflamatório, altera o estado conformacional dos receptores opióides presentes no gânglio da raiz dorsal (DRG) e no nervo safeno isolado da pata de ratos, indicando a ativação desses receptores.

Foi investigada a expressão e a ativação dos MOR, KOR e DOR em macrófagos residentes e inflamatórios, após a incubação com CRF (1 μ M). Conforme demonstrado na **Figura 12**, após as 24 horas de incubação com a CRF foi observado aumento da expressão dos três tipos de receptores opióides avaliados, sendo em células residentes, observa-se o predomínio de MOR, seguido por KOR e DOR (**Figura 12A**). Células inflamatórias apresentaram predomínio de KOR, seguido por MOR e DOR (**Figura 12B**).

A incubação dos macrófagos com CRF induziu ativação dos receptores opióides de células residentes, sendo a maior ativação de KOR (95%) seguido por MOR (88%) e DOR (51%), conforme mostra a **Figura 13A**. Da mesma forma, macrófagos incubados com CRF na presença de LPS apresentam maior ativação de KOR (90%), MOR (55%) e DOR (46%), respectivamente (**Figura 13B**). Também foi observado que células inflamatórias apresentam seu receptor DOR mais ativo quando comparada as tratadas com Morfina (15%), agonista opióide ligante de MOR, utilizada como controle positivo.

Figura 12 – Efeito da Crotalina sobre a expressão de receptores MOR, KOR e DOR em macrófagos peritoneais residentes ou inflamatórios

A)

B)

A expressão protéica dos receptores opióides foi demonstrada por técnica de SDS-Page seguida por *Western Blotting*. **(A)** Macrófagos residentes em presença de CRF **(B)** Macrófagos inflamatórios em presença de CRF. Os valores estão normalizados pela expressão de β -actina e apresentados como intensidades das bandas de MOR, KOR e DOR, quantificadas por densitometria de *Western Blotings*. Os dados foram representados em unidades arbitrárias (U.A) e são representativos de 3 experimentos distintos.

Figura 13 - Efeito da Crotalfina sobre a ativação de receptores MOR, KOR e DOR em macrófagos peritoneais residentes ou inflamatórios

A)

B)

Macrófagos residentes foram coletados da cavidade peritoneal (1×10^6 células), aderidos por 1 hora, em poços de placas de cultura, e em seguida, incubadas com CRF ($1 \mu\text{M}$) ou Morfina ($1 \mu\text{M}$, controle positivo), por 24 horas. Após este período as placas foram lavadas com PBS, e as células incubadas, *overnight*, com anticorpos (Proteimax, Brasil) responsáveis pelo reconhecimento exclusivo da forma ativa dos receptores. A ativação de MOR, KOR e DOR foi demonstrada por técnica de ELISA, adaptada por Gupta e colaboradores (2007). **(A)** Macrófagos residentes **(B)** Macrófagos inflamatórios. Os valores estão apresentados em porcentagem de aumento, em relação às células controles, incubadas com anticorpos para receptores totais, cujo valor de está representado pela linha tracejada (100%). * $p < 0,05$ por comparação com os valores obtidos em células controle, ** $p < 0,05$ por comparação com os valores obtidos pelo grupo Morfina.

4.4 Participação dos receptores opióides na modulação da Crotalina sobre o comportamento funcional de macrófagos

Os opióides exógenos e endógenos e seus derivados exibem diferentes afinidades e seletividade pelos receptores μ , κ e δ .

Demonstrada a ação da CRF sobre as diferentes capacidades funcionais dos macrófagos, avaliou-se o envolvimento dos receptores opióides nessa mediação. Para tal, macrófagos residentes e inflamatórios foram incubados na presença de antagonista não-seletivo (Naloxona) ou seletivos: CTOP (seletivo para MOR), *nor*-BNI (seletivo para KOR) e Naltrindole (seletivo para DOR). Da mesma forma que realizada nas etapas anteriores, avaliou-se o possível efeito citotóxico este peptídeo, bem como da Morfina, em associação com os diferentes antagonistas, após 24 horas em incubação. Foi observado que a associação de CRF ou Morfina com os diferentes antagonistas, não interfere na viabilidade destas células peritoneais residentes ou inflamatórias, que apresentaram viabilidade superior a 96% quando comparados às células controle (*dados não mostrados*). Posteriormente, foram realizados ensaios para a avaliação das funções de fagocitose, liberação de H_2O_2 , produção de $NO^\bullet$ e secreção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α). Grupos controles, incubados apenas na presença dos diferentes antagonistas, foram realizados simultaneamente

4.4.1 Efeito dos antagonistas sobre a ação da Crotalina na atividade de fagocitose por macrófagos residentes ou inflamatórios, mediada por receptor C3b do sistema complemento

A **Figura 14** mostra que a incubação prévia de macrófagos residentes com antagonistas seletivos para os diferentes tipos de receptores opióides é capaz de reverter a ação inibitória da fagocitose acarretada tanto pela CRF (**Figura 14A**) como pela Morfina (controle positivo) (**Figura 14B**).

Os dados apresentados na **Figura 14C** mostram que o bloqueio dos receptores opióides por Naloxona, CTOP, *nor*-BNI ou Naltrindole não interferiu com esta função.

Macrófagos inflamatórios submetidos previamente ao mesmo tratamento com antagonistas não seletivo (Naloxona) ou seletivos para MOR, KOR e DOR (**Figura 15**) e posteriormente incubados, por 24 horas, com CRF (Figura 15A) ou Morfina (Figura 15B), apresentaram índice de Fagocitose similar ao observado aos respectivos grupos controles.

Conforme demonstrado na **Figura 15C**, macrófagos inflamatórios incubados com os diferentes antagonistas apresentaram atividade de fagocitose similar ao determinado para o grupo controle.

Figura 14 – Participação dos receptores opióides na ação da Crotalina sobre a fagocitose de macrófagos residentes, mediada por receptor C3b do sistema complemento

A)

B)

Macrófagos, coletados da cavidade peritoneal, foram aderidos por 20 minutos em lamínulas de vidro circulares e em seguida incubados com Naloxona, CTOP, nor-BNI ou Naltrindole por 1 hora. Após este período, as lamínulas foram lavadas com PBS, e as células incubadas meio de cultura contendo CRF (**A**) ou Morfina (**B**) ou apenas com meio de cultura (**C**), por 24 horas. Após este período, as lamínulas foram incubadas com as partículas de zimosan opsonizado por 40 minutos. Os valores estão apresentados em % de fagocitose. * $p < 0,05$ por comparação com seus respectivos grupos controles. ** $p < 0,05$, em (A), por comparação com o grupo tratado com os antagonistas CTOP+CRF, nor-BNI+CRF e Naltrindole+CRF; (B), por comparação aos grupos CTOP+Morfina, nor-BNI+Morfina e Naltrindole+Morfina.

Figura 15 – Participação dos receptores opióides na ação da Crotalfina sobre a fagocitose de macrófagos inflamatórios, mediada por receptor C3b do sistema complemento

A)

B)

C)

Macrófagos, coletados da cavidade peritoneal, foram aderidos por 20 minutos em lamínulas de vidro circulares e em seguida incubados com Naloxona, CTOP, nor-BNI ou Naltrindole por 1 hora. Após este período, as lamínulas foram lavadas com PBS, e as células incubadas meio de cultura contendo CRF (A) ou Morfina (B) ou meio RPMI (C), na presença de LPS (5µg/mL), por 24 horas. Após este período, as lamínulas foram incubadas com as partículas de zimosan opsonizado por 40 minutos. Os valores estão apresentados em % de fagocitose. * $p < 0,05$ por comparação com seus respectivos grupos controles. ** $p < 0,05$ em (A), por comparação com os grupos tratados com CTOP+CRF e Naltrindole+CRF; (B), por comparação aos grupos Naloxona+Morfina, CTOP+Morfina e Naltrindole+Morfina.

4.4.2 Participação de receptores opióides na ação da Crotalina sobre a liberação de H_2O_2 por macrófagos

Os resultados apresentados na **Figura 16** mostram que macrófagos peritoneais residentes submetidos à incubação com CRF ou Morfina possuem sua produção de H_2O_2 reduzida, quando comparadas aos seus respectivos grupos controles, conforme demonstrado anteriormente. Este efeito foi revertido quando estas células foram submetidas a incubação previa com antagonistas seletivos ou não de receptores opióides (**Figura 16A e 16B**). Observa-se que tanto a Naloxona como os demais antagonistas reverteram totalmente esse efeito e, adicionalmente, acarretam aumento de 50% (Naloxona e CTOP), 46% (*nor*-BNI) e 53% (Naltrindole) na produção de H_2O_2 por macrófagos residentes, quando comparados ao grupo controle (**Figura 16A**).

Em relação aos macrófagos residentes incubados com Morfina, foi observada reversão pela Naloxona em níveis semelhantes ao grupo controle e para os demais antagonistas, observou-se bloqueio total, acompanhado por efeito estimulatório adicional por volta de 50% (CTOP) e 55% (*nor*-BNI e Naltrindole) em relação ao grupo controle. (**Figura 16B**).

A **Figura 16C** representa macrófagos peritoneais residentes incubados com Naloxona, antagonista não seletivo de receptores opióides, aumentou a liberação de H_2O_2 (22%), quando comparado ao grupo controle. Também foi observado que os tratamentos com CTOP e Naltrindole, antagonistas específicos de MOR e DOR, diminuíram a liberação de H_2O_2 em 20% e 23%, respectivamente, quando comparados ao grupo controle. Quando comparado ao grupo Naloxona, essa diminuição foi de 34% e 37%, respectivamente (**Figura 17C**). Ainda, quando tratadas com *nor*-BNI, as células apresentam uma diminuição de 21% em relação às células tratadas com Naloxona, não sendo observada qualquer diferença quando comparadas as células do grupo controle.

Em células inflamatórias foi observado que a inibição da produção de H_2O_2 por macrófagos tratados com ambos opióides (**Figura 17A**). Apenas o antagonista Naltrindole bloqueou a ação inibitória da CRF sobre a produção de H_2O_2 (**Figura 17A**). Por outro lado, nenhum antagonista foi capaz de bloquear o efeito da Morfina (**Figura 17B**).

A **Figura 17C** demonstra que, da mesma forma que observado nas células residentes, o bloqueio não seletivo dos receptores opióides com Naloxona foi capaz de induzir o aumento da liberação de H_2O_2 em aproximadamente 20%, quando comparado ao controle.

Figura 16 – Participação dos receptores opióides na ação da Crotalina sobre a produção de H_2O_2 por macrófagos residentes

A)

B)

Macrófagos peritoneais foram aderidos por uma hora em placas de 96 poços, e em seguida, incubados com Naloxona, CTOP, nor-BNI ou Naltrindole por 1 hora. Após este período, as células foram incubadas com meio de cultura contendo CRF (**A**) ou Morfina (**B**) ou (**C**) apenas meio de cultura, por 24 horas. A quantificação de H₂O₂ foi realizada por técnica adaptada por Pick & Mizel (1981). A absorbância foi determinada em leitor de ELISA, com filtro de 620 nm e os resultados apresentados e calculados em nM de H₂O₂ por 4x10⁵ células. *p< 0,05, por comparação ao controle, **p<0,05, em (A) e (B), por comparação aos grupos aos grupos Naloxona+Morfina, CTOP+Morfina, nor-BNI+Morfina e Naltrindole+Morfina; (C), por comparação aos grupos CTOP, nor-BNI e Naltrindole e &p<0,05, por comparação ao grupo controle.

Figura 17 – Participação dos receptores opióides na ação da Crotalina sobre a produção de H_2O_2 por macrófagos inflamatórios

A)

B)

Macrófagos peritoneais foram aderidos por uma hora, e em seguida, incubados com Naloxona, CTOP, nor-BNI ou Naltrindole ($1 \mu\text{M}$), por 1 hora. Após este período, as células foram incubadas com (A) CRF ou (B) Morfina ou (C) apenas meio de cultura, na presença de LPS ($5 \mu\text{g/mL}$), por 24 horas. A quantificação de H_2O_2 foi realizada por técnica adaptada por Pick & Mizel (1981). A absorbância foi determinada em leitor de ELISA, com filtro de 620 nm e os resultados apresentados e calculados em nM de H_2O_2 por 4×10^5 células. * $p < 0,05$, por comparação ao grupo controle.

4.4.3 Participação de receptores opióides na ação da Crotalfina sobre a produção de NO[•] por macrófagos

As **Figuras 18A e 18B** mostram que a CRF e a Morfina diminuíram a produção de nitrito em 53% e 47%, respectivamente, por macrófagos residentes. Ainda, a **Figura 18A** apresenta que a inibição da produção de nitrito, promovida pelo tratamento com CRF, foi bloqueada pela pré-incubação com o *nor*-BNI, antagonista de KOR (78%). Por outro lado, quando estas células são pré-incubados na presença dos demais antagonistas e tratados com CRF, apresentam diminuição na produção deste mediador em 66% (grupo Naloxona), 46% (grupo CTOP) e 43% quando incubados com Naltrindole e comparados ao grupo controle (**Figura 18A**), indicando que esses antagonistas não bloqueiam o efeito inibitório da CRF sobre a produção deste reativo. O mesmo resultado é observado para a Morfina (**Figura 18B**). Os resultados apresentados na **Figura 18C** mostram que a incubação de macrófagos residentes com os antagonistas Naloxona, CTOP e Naltrindole apresentam inibição da produção de nitrito (59%, 39% e 57%, respectivamente). O *nor*-BNI não acarretou alterações significativas, quando comparados ao grupo controle. Foi notado que o bloqueio de MOR e de KOR acarretou no aumento da produção de nitrito em 46% e 86%, respectivamente, quando comparado ao grupo Naloxona (**Figura 18C**).

Macrófagos inflamatórios, tratados com CRF ou com Morfina, apresentaram uma queda acentuada e similar na produção de nitrito em (62%) (**Figuras 19A e 19B**). Foi observado, novamente, que apenas a pré-incubação dos macrófagos inflamatórios com o *nor*-BNI bloqueia totalmente as ações inibitórias tanto da CRF (**Figura 19A**), como da Morfina (19B). Ainda, em relação à Morfina, as células pré-tratadas com Naloxona e CTOP apresentam bloqueio parcial do efeito inibitório sobre a produção de nitrito em 31% e 36%. O Naltrindole não interferiu com esta ação inibitória (**Figura 19B**).

A **Figura 19C** apresenta o comportamento da produção de NO[•] por macrófagos peritoneais inflamatórios. A incubação com Naloxona, CTOP, *nor*-BNI e Naltrindole, no meio de cultura, inibiu a produção de nitrito em 52%, 53%, 19% e 58%, respectivamente, em relação ao grupo controle.

Figura 18 – Participação dos receptores opióides na ação da Crotalina sobre a produção de NO[•] por macrófagos residentes

C)

Macrófagos peritoneais foram aderidos no fundo de placas de cultura por uma hora. Em seguida, o meio foi retirado, as células lavadas com PBS e acrescentando aos poços um novo meio contendo Naloxona, CTOP, nor-BNI ou Naltrindole, pelo período de 1 hora. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e mantidas em incubação, por 24 horas, com **(A)** CRF **(B)** Morfina ou **(C)** apenas meio de cultura (controle). Após este período, o sobrenadante das placas foi transferido para placa de leitura e reagente de Griess, na proporção de 1:1 (v/v) para determinar a quantificação de óxido nítrico, conforme método indireto de Ding (1988). Os valores estão apresentados em µM de nitrito/ 2x10⁶ células. *p<0,05 por comparação com os valores obtidos em células controle. **p<0,05 em (A), por comparação com o grupo nor-BNI+CRF; (B), por comparação ao grupo nor-BNI+Morfina e (C), por comparação aos grupos CTOP e nor-BNI.

Figura 19 – Participação dos receptores opióides na ação da Crotalina sobre a produção de NO[•] por macrófagos inflamatórios

C)

Macrófagos peritoneais foram aderidos no fundo de placas de cultura por uma hora. Em seguida, o meio foi retirado, as células lavadas com PBS e acrescentando aos poços um novo meio contendo Naloxona, CTOP, nor-BNI ou Naltrindole, pelo período de 1 hora. Em seguida, as células foram lavadas com PBS e mantidas em incubação, por 24 horas, com **(A)** CRF **(B)** Morfina ou **(C)** apenas meio de cultura (controle), na presença de LPS (5µg/mL). Após este período, o sobrenadante das placas foi transferido para placa de leitura e reagente de Griess, na proporção de 1:1 (v/v) para determinar a quantificação de óxido nítrico, conforme método indireto de Ding (1988). Os valores estão apresentados em µM de nitrito/ 2×10^6 células. * $p < 0,05$ por comparação com os valores obtidos em células controle. ** $p < 0,05$ em (A), por comparação com o grupo nor-BNI+CRF; (B), por comparação ao grupo nor-BNI+Morfina e (C), por comparação ao grupo nor-BNI.

4.4.4 Participação de receptores opióides na ação da Crotalina sobre a secreção de citocinas pró-inflamatórias por macrófagos

4.4.4.1 Sobre a secreção da IL-1 β

A incubação com os diferentes antagonistas acarretou o bloqueio da ação estimulatórias da CRF sobre a secreção da IL-1 β (148%), por macrófagos residentes, quando comparado ao grupo controle e ao grupo CRF (**Figura 20A**). O Naltrindole, além de bloquear induziu inibição de (50%) da secreção desta citocina, como demonstrado na **Figura 20A**. Conforme demonstrado na **Figura 20B**, após o bloqueio dos receptores opióides, as células incubadas com Morfina possuem o mesmo perfil que as células incubadas com CRF e os diferentes antagonistas.

A **Figura 20C** representa a quantificação da secreção de IL-1 β por macrófagos peritoneais residentes após o bloqueio com os diferentes receptores. O bloqueio de MOR, KOR e DOR, por meio do antagonista Naloxona, induziu o aumento em 121% da secreção de IL -1 β e que o bloqueio seletivo de MOR, pelo antagonista CTOP, acarretou no aumento de 61% em relação ao grupo controle. O nor-BNI não modificou os níveis de secreção desta citocina. Já, as células incubadas com o Naltrindole apresentaram diminuição de 22% da secreção de IL-1 β , quando comparado ao grupo controle.

Macrófagos inflamatórios incubadas com CRF ou Morfina apresentam aumento significativo da secreção da IL-1 β (126% e 132%, respectivamente), quando comparado com seu grupo controle (**Figuras 21A e 21B**). A pré-incubação com os diferentes antagonistas opióides permitiu que a quantificação da secreção de IL-1 β permanecesse semelhante aos obtidos pelos respectivos grupos controles, com exceção das células pré-incubadas com Naltrindole que apresentaram uma redução de aproximadamente 57%, em relação aos grupos CRF e Morfina (**Figuras 21A e 21B**).

Os resultados apresentados na **Figura 21C** representa a quantificação de IL-1 β por macrófagos peritoneais inflamatórios, demonstrando novamente, que bloqueio simultâneo de MOR, KOR e DOR, por meio do antagonista não seletivo Naloxona, induziu o aumento (76%) da secreção de IL-1 β . Já, bloqueio seletivo de MOR, pelo antagonista CTOP, acarretou aumento pronunciado (100%), em relação

ao grupo controle. Novamente não se observa ação do nor-BNI sobre o padrão secretório de células inflamatórias, quando comparado ao controle e, da mesma forma que observado para as células residentes, o Naltrindole inibe a secreção da IL-1 β , respectivamente, quando comparado às células controles (**Figura 21C**).

Figura 20 – Participação dos receptores opiídeos na ação da Crotalfina sobre a secreção de IL-1 β por macrófagos residentes

Macrófagos peritoneais foram aderidos no fundo de placas de cultura por uma hora. Em seguida, o meio foi retirado, aos poços lavados com PBS e acrescentado novo meio RPMI contendo Naloxona, ou CTOP ou nor-BNI ou Naltrindole ($1\mu\text{M}$), por 1 hora, em incubação. Após este período, as células foram lavadas com PBS e incubadas, por 24 horas com meio contendo (A) CRF ou (B) Morfina ou (C) apenas meio de cultura (controle). Após esse período, o sobrenadante foi coletado para a posterior quantificação da secreção de IL-1 β , de acordo com as recomendações do fabricante do kit comercial (R&D). Os valores estão apresentados em pg/ml. * $p < 0,05$ por comparação com o grupo controle, ** $p < 0,05$ em (A), por comparação com os grupos Naloxona+CRF, CTOP+CRF, nor-BNI+CRF, Naltrindole+CRF; (B) Naloxona+Morfina, CTOP+Morfina, nor-BNI+Morfina, Naltrindole+Morfina e (C), por comparação aos grupos nor-BNI e Naltrindole.

Figura 21 – Participação dos receptores opióides na ação da Crotalina sobre a secreção de IL-1 β por macrófagos inflamatórios

Macrófagos peritoneais foram aderidos no fundo de placas de cultura por uma hora. Em seguida, o meio foi retirado, os poços lavados com PBS e acrescentado novo meio RPMI contendo Naloxona, ou CTOP ou nor-BNI ou Naltrindole (1 μ M), por 1 hora, em incubação. Após este período, as células foram lavadas com PBS e incubadas, por 24 horas com meio contendo (A) CRF ou (B) Morfina ou (C) apenas meio de cultura (controle), na presença de LPS (5 μ g/mL). Após esse período, o sobrenadante foi coletado para a posterior quantificação da secreção de IL-1 β , de acordo com as recomendações do fabricante do kit comercial (R&D). Os valores estão apresentados em pg/mL. * $p < 0,05$ por comparação com o grupo controle, ** $p < 0,05$ em (A), por comparação com os grupos Naloxona+CRF, CTOP+CRF, nor-BNI+CRF e Naltrindole+CRF; (B) Naloxona+Morfina, CTOP+Morfina, nor-BNI+Morfina e Naltrindole+Morfina e (C), por comparação aos grupos nor-BNI e Naltrindole.

4.4.4.2 Sobre a secreção de IL-6

Do mesmo modo que observado com o comportamento de secreção da IL-1 β , as células residentes incubadas com CRF apresentam aumento significativo no comportamento da secreção de IL-6 (67%), quando comparado ao grupo controle, e foi observado que a ação estimulatória deste peptídeo, sobre o comportamento de secreção da IL-6 por macrófagos foi bloqueada em células pré-incubadas com os diferentes tipos de antagonistas de receptores opióides (**Figura 22A**). É visto efeito estimulatório de menor magnitude da Morfina sobre a secreção da IL-6 por células residentes (12%) (**Figura 22B**), porém, bloqueada, da mesma forma, pelos diferentes tipos de antagonistas de receptores opióides (**Figura 22B**).

O gráfico da **Figura 21C** mostra que macrófagos residentes submetidos ao tratamento com *nor*-BNI, antagonista de KOR, há um aumento de 24% na secreção desta citocina, quando comparado ao grupo controle. Os demais antagonistas não alteraram a secreção desta citocina, quando comparado ao controle.

Diferentemente do que o observado em células residentes, células inflamatórias apresentaram diminuição da secreção da IL-6 reduzida em presença de CRF ou de Morfina (13% e 16%, respectivamente), quando comparados ao grupo controle (**Figuras 23A e 23B**). Quando os macrófagos foram incubados na presença dos diferentes antagonistas, observou-se que além de bloquear as ações da CRF e da Morfina, os antagonistas Naloxona, CTOP, *nor*-BNI e Naltrindole induziram efeito inibitório (por volta de 34%, 43%, 49% e 52%, respectivamente, para os grupos tratados com CRF e Morfina), sobre a secreção da IL-6, quando comparado ao grupo controle (**Figuras 23A e 23B**).

Macrófagos inflamatórios apresentaram aumento (31%), quando incubados na presença *per se* de Naloxona, e diminuição e, quando tratados com CTOP (17%) e Naltrindole (40%), respectivamente, em comparação ao grupo controle (**Figura 23C**). Ainda, em comparação ao grupo controle, não houve diferença significativa na secreção da IL-6 por macrófagos inflamatórios, após a incubação com *nor*-BNI (**Figura 23C**).

Figura 22 – Participação dos receptores opióides na ação da Crotalina sobre a secreção de IL-6 por macrófagos residentes

C)

Macrófagos peritoneais foram aderidos no fundo de placas de cultura por uma hora. Em seguida, o meio foi retirado, os poços lavados com PBS e acrescentado novo meio RPMI contendo Naloxona, ou CTOP ou nor-BNI ou Naltrindole ($1\mu\text{M}$), por 1 hora, em incubação. Após este período, as células foram lavadas com PBS e incubadas, por 24 horas com meio contendo (A) CRF ou (B) Morfina ou (C) apenas meio de cultura (controle). Após esse período, o sobrenadante foi coletado para a posterior quantificação da secreção de IL-6, de acordo com as recomendações do fabricante do kit comercial (R&D). Os valores estão apresentados em pg/ml. * $p < 0,05$ por comparação com o grupo controle, ** $p < 0,05$ em (A), por comparação com os grupos Naloxona+CRF, CTOP+CRF, nor-BNI+CRF e Naltrindole+CRF; (B) Naloxona+Morfina, CTOP+Morfina, nor-BNI+Morfina e (C), por comparação aos grupos nor-Naloxona, CTOP e Naltrindole.

Figura 23 – Participação dos receptores opióides na ação da Crotalina sobre a secreção de IL-6 por macrófagos inflamatórios

Macrófagos peritoneais foram aderidos no fundo de placas de cultura por uma hora. Em seguida, o meio foi retirado, os poços lavados com PBS e acrescentado novo meio RPMI contendo Naloxona, ou CTOP ou nor-BNI ou Naltrindole ($1\mu\text{M}$), por 1 hora, em incubação. Após este período, as células foram lavadas com PBS e incubadas, por 24 horas com meio contendo (A) CRF ou (B) Morfina ou (C) apenas meio de cultura (controle), na presença de LPS ($5\mu\text{g/mL}$). Após este período, o sobrenadante foi coletado para a posterior quantificação da secreção de IL-6, de acordo com as recomendações do fabricante do kit comercial (R&D). Os valores estão apresentados em pg/ml. * $p < 0,05$ por comparação com o grupo controle, ** $p < 0,05$ em (A), por comparação com os grupos Naloxona+CRF, CTOP+CRF, nor-BNI+CRF e Naltrindole+CRF; (B) Naloxona+Morfina, CTOP+Morfina, nor-BNI+Morfina e Naltrindole+Morfina e (C), por comparação aos grupos CTOP, nor-BNI e Naltrindole.

4.4.4.3 Sobre a secreção de TNF- α

Diferentemente ao observado para IL-1 β e IL-6, foi visto que a CRF acarretou significativa inibição sobre a secreção de TNF- α por macrófagos residentes (51%) e o mesmo comportamento foi notado em macrófagos residentes incubados com Morfina (65%) (**Figuras 24A e 24B**). Entretanto, células residentes, incubadas com CTOP e *nor*-BNI e com CRF, apresentaram níveis de secreção de TNF- α muito próximo ao grupo controle, sugerindo que estes antagonistas bloqueiam a ação inibitória da CRF (**Figura 24A**). Células residentes pré-incubadas com antagonistas de receptores opióides e Morfina, apresentaram bloqueio da ação inibitória deste opióide (**Figura 24B**).

A **Figura 24C** é representativa da secreção de TNF- α por macrófagos peritoneais residentes. Os resultados obtidos demonstraram que bloqueio simultâneo de MOR, KOR e DOR, realizado pela incubação com Naloxona, aumentou em 41% da secreção desta citocina. Por outro lado, o bloqueio seletivo dos MOR, KOR e DOR, pelos seus respectivos antagonistas, reduziu em 26%, 32% e 55%, respectivamente, a capacidade secretória dos macrófagos, quando comparado ao grupo controle, e em 45%, 52% e 69%, respectivamente, quando comparados ao grupo Naloxona (**Figura 24C**).

As **Figuras 25A e 25B** mostram que em macrófagos inflamatórios, a CRF e a Morfina exercem efeito supressor na secreção de TNF- α (47% e 51%, respectivamente) e que, diferentemente ao observado para Morfina, este feito, em células posteriormente tratadas com CRF, não é bloqueado por Naltrindole (**Figura 25A**). O efeito supressor da Morfina foi parcialmente bloqueado quando as células inflamatórias foram pré-incubadas com Naloxona (56%), CTOP (45%) e *nor*-BNI (85%) e totalmente bloqueado pelo Naltrindole, quando comparados ao grupo controle (**Figura 25B**). Apesar do bloqueio, a Naloxona e o CTOP apresentaram secreção de TNF- α significativamente menor (24% e 25%, respectivamente) ao apresentado pelo grupo controle.

Como de demonstrado na **Figura 25C**, macrófagos inflamatórios, que foram incubados na presença *per se* de Naloxona apresentaram significativo aumento (14%) da secreção de TNF- α por estas células. Por outro lado, não foi observada nenhuma outra alteração significativa, quando os macrófagos foram incubados com os antagonistas seletivos (**Figura 25C**).

Figura 24 – Participação dos receptores opiídeos na ação da Crotalina sobre a secreção de TNF- α por macrófagos residentes

Macrófagos peritoneais foram aderidos no fundo de placas de cultura por uma hora. Em seguida, o meio foi retirado, aos poços lavados com PBS e acrescentado novo meio RPMI contendo Naloxona, ou CTOP ou nor-BNI ou Naltrindole ($1\mu\text{M}$), por 1 hora, em incubação. Após este período, as células foram lavadas com PBS e incubadas, por 24 horas com meio contendo (A) CRF ou (B) Morfina ou (C) apenas meio de cultura (controle). Após esse período, o sobrenadante foi coletado para a posterior quantificação da secreção de TNF- α , de acordo com as recomendações do fabricante do kit comercial (R&D). Os valores estão apresentados em pg/ml. $p < 0,05$ por comparação com o grupo controle, $**p < 0,05$ em (A), por comparação com os grupos Naloxona+CRF, CTOP+CRF, nor-BNI+CRF; (B) Naloxona+Morfina, CTOP+Morfina, nor-BNI+Morfina e Naltrindole+Morfina e (C), por comparação aos grupos CTOP, nor-BNI e Naltrindole.

Figura 25 – Participação dos receptores opióides na ação da Crotalina sobre a secreção de TNF- α por macrófagos inflamatórios

Macrófagos peritoneais foram aderidos no fundo de placas de cultura por uma hora. Em seguida, o meio foi retirado, os poços lavados com PBS e acrescentado novo meio RPMI contendo Naloxona, ou CTOP ou nor-BNI ou Naltrindole ($1\mu\text{M}$), por 1 hora, em incubação. Após este período, as células foram lavadas com PBS e incubadas, por 24 horas com meio contendo **(A)** CRF ou **(B)** Morfina ou **(C)** apenas meio de cultura (controle), na presença de LPS ($5\mu\text{g/mL}$). Após esse período, o sobrenadante foi coletado para a posterior quantificação da secreção de TNF- α , de acordo com as recomendações do fabricante do kit comercial (R&D). Os valores estão apresentados em pg/ml $p < 0,05$ por comparação com o grupo controle, $**p < 0,05$ em (A), por comparação com os grupos Naloxona+CRF, CTOP+CRF, nor-BNI+CRF ; (B) Naloxona+Morfina, CTOP+Morfina, nor-BNI+Morfina e Naltrindole+Morfina e (C), por comparação aos grupos CTOP, nor-BNI e Naltrindole.

5 DISCUSSÃO

Como assinalado na Introdução, a Crotalina (CRF), um peptídeo isolado a partir do veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus*, com potente atividade analgésica em diferentes modelos de dor exerce seus efeitos por meio da ativação de receptores opióides, principalmente receptores do tipo κ e δ , em células (DRG) e tecidos (nervo da pata de rato) e é observada que sua eficiência ocorre apenas na vigência de lesão tecidual/inflamação. Células imune/inflamatórias são moduladas por opióides, além de sintetizarem e secretarem opióides endógenos e ativam seus receptores opióides presentes na membrana dessas células, resultando em autoregulação. Dentre essas células, estão os macrófagos, que possuem uma alta capacidade secretora e participação fundamental no primeiro mecanismo de defesa do organismo.

Assim, esse estudo teve como objetivo caracterizar a possível ação da CRF sobre a funcionalidade de macrófagos, avaliar as possíveis alterações na expressão e funcionalidade de receptores opióides nestas células, além de investigar a importância da ativação dos receptores opióides para a ação modulatória de CRF, utilizando antagonistas (seletivo e não-seletivos). Esse estudo foi realizado por meio de ensaios *in vitro*, utilizando macrófagos residentes, obtidos da cavidade peritoneal de ratos e células residentes incubadas na presença de LPS (5 $\mu\text{g/mL}$) para eliciar os macrófagos, acarretando comportamento funcional e secretório de células inflamatórias.

Na primeira etapa deste estudo, a CRF (1 μM) foi adicionada em culturas de macrófagos residentes ou concomitante à adição de LPS (5 $\mu\text{g/mL}$) e estes macrófagos foram incubados por 24 ou 48 horas. Simultaneamente, foram realizadas culturas utilizando a morfina (1 μM), nas mesmas condições experimentais, como controle positivo, uma vez que as ações imunomodulatórias deste opióide estão muito bem estabelecidas (BRASKARAN et al., 2001). É importante salientar que a concentração de CRF determinada para este estudo foi baseada em estudos *in vitro* (BRESSAN et al., 2011; ZAMBELLI, 2011) que demonstram que a CRF, nas concentrações de 0,001; 1 e 10 μM modula, na mesma magnitude, mecanismos moleculares envolvidos com a expressão de receptores opióides e canabinóides em células DRG, bem como com a liberação de peptídeos opióides endógenos por estas células. Da mesma forma, a concentração de morfina

estabelecida para este estudo, está baseada em ensaios *in vitro* descritos anteriormente (BRASKARAN et al., 2001; BRESSAN et al., 2011). É interessante salientar que, as concentrações entre 10 nM a 1 µM utilizadas em estudos *in vitro* mimetizam suas ações fisiológicas (NINKOVIC; ROY, 2013). Conforme citado anteriormente, a concentração estabelecida para a CRF, bem como para a morfina não acarretaram perda de viabilidade celular, após os diferentes períodos de incubação, na presença ou ausência de LPS.

Após a incubação dos macrófagos residentes e inflamatórios na presença da CRF, após 24 horas foram determinadas a capacidade de fagocitose, liberação de H₂O₂ e produção das citocinas IL-1β, IL-6, TNF-α, e, 48 horas, a produção de NO*.

Os resultados obtidos demonstraram que a CRF foi capaz de inibir a fagocitose de partículas de zimosan opsonizados, por macrófagos residentes. Essa inibição foi observada também para as células incubadas com morfina, nas mesmas condições experimentais. O mesmo efeito inibitório da CRF foi observado sobre a liberação de H₂O₂ e produção de NO*, por estas células. O mesmo perfil inibitório foi observado sobre estes diferentes parâmetros funcionais, quando a CRF foi incubada na presença da LPS (5µg/mL). Cabe ressaltar que, conforme demonstrado nos resultados, a adição de LPS acarretou aumento da capacidade fagocítica e de liberação e produção dos reativos de oxigênio e nitrogênio por macrófagos, compatível com o estado inflamatório. Nossos dados corroboram com a literatura que demonstra que LPS estimula, *in vitro*, a atividade secretória de macrófagos peritoneais, por até 48 horas (VUJIC et al., 2004). Ainda, esses mesmos autores testaram a ação modulatória de diferentes peptídeos opióides sobre a funcionalidade de macrófagos, incubando simultaneamente esses peptídeos com o LPS.

Como citado na Introdução, macrófagos são conhecidos como “fagócitos profissionais” dada a sua capacidade de reconhecer, capturar e internalizar patógenos ou partículas estranhas, sendo posteriormente, destruídas em seus fagolisossomos. Essa atividade é pronunciada durante a resposta inflamatória, seguida pela ativação de NADPH oxidase e, conseqüentemente, a geração de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio (JOHNSTON; KITAGAWA, 1985) e a ativação da óxido nítrico sintase induzível (HIBBS et al., 1988) nestas células.

Em relação à fagocitose, foi demonstrado que a morfina, na concentração utilizada no presente estudo, é capaz de inibir a expressão de receptores do

complemento e receptores- $\text{Fc}\gamma$ de macrófagos e neutrófilos, após duas horas da incubação na presença deste opióide (TOMASSINI et al., 2004; WELTERS et al., 2000). O decréscimo da expressão de receptores fagocíticos foi associado à consequente ação inibitória sobre a produção de H_2O_2 , uma vez que esse reativo seria liberado durante a fusão dos lisossomas com os vacúolos contendo as partículas fagocitadas (WELTERS et al., 2000). Ainda, a produção de H_2O_2 pode ser estimulada pelo PMA, um ativador da fosforilação da subunidade regulatória da NADPH oxidase, mediada pela PKC (CROSS; SEGAL, 2004), mecanismo que pode ser regulado por opióides e peptídeos opióides (STANOJEVIC et al., 2008). Em nosso modelo, observamos a ação inibitória da CRF sobre a fagocitose e a liberação de H_2O_2 , após 24 horas de incubação, independentemente do estado de ativação dos macrófagos. Outro mecanismo aceito para a ação supressora de opióides sobre a liberação de reativos do oxigênio é o fato de que o aumento da ligação de opióides exógenos ou endógenos aos receptores opióides, inibe a Adenil-ciclase, resultando em um decréscimo na concentração intracelular de AMPc e inibição de canais de Ca^{2+} voltagem-sensível (NINKOVIC; ROY, 2013).

Diversos trabalhos descrevem a conexão entre peptídeos opióides e espécies reativas do oxigênio e do nitrogênio. Em particular, o NO é um mediador fundamental na regulação de processos, tais como inflamação e neuromodulação (NAGY et al., 2007). Assim, em continuidade, foi investigado o efeito da CRF sobre a produção de óxido nítrico. É importante ressaltar que o método para quantificar a produção de NO é indireto, ou seja, quantifica-se a produção de nitrito gerado na via. Em nossa padronização, o período de 48 horas foi o mais adequado para detectar e quantificar esse produto, corroborando aos em diferentes estudos que determinaram a produção de NO, neste mesmo período (BALOG; 2010; SAMPAIO et al., 2001; VUJIC et al., 2008).

Nossos resultados demonstram que este peptídeo é capaz de inibir a produção de $\text{NO}^\bullet$ por macrófagos residentes. A incubação dos macrófagos na presença do LPS acarretou pronunciada produção deste reativo do nitrogênio. É interessante notar que, neste estado de ativação, a CRF foi capaz de induzir inibição mais marcante. Neste sentido, é relatado que alguns peptídeos opióides, tais como a endorfina, são capazes de inibir, de modo mais pronunciado a produção de $\text{NO}^\bullet$ por macrófagos incubados com o LPS (BALOG et al., 2010). Esses autores

demonstraram que na presença de LPS os macrófagos aumentam a expressão de receptores opióides do tipo μ , favorecendo a ligação destes peptídeos e posterior liberação de peptídeos opióides endógenos por macrófagos.

Na presença da endotoxina (LPS), macrófagos apresentam aumento na produção de IL-6 e do $\text{TNF}\alpha$, fato observado em nossos ensaios. Adicionalmente a esses dados, observamos que o LPS também aumentou a produção de IL-1 β . Em relação às ações da CRF, observamos que este peptídeo inibe a produção de IL-6 e de $\text{TNF}\alpha$ por células inflamatórias. Esta ação inibitória, sobre a produção de $\text{TNF}\alpha$, também foi observada em células residentes incubadas com o peptídeo. Por outro lado, os macrófagos residentes, na presença de CRF, apresentaram a produção aumentada de IL-6. Já, a produção da IL-1 β apresenta-se aumentada na presença do CRF, independentemente do estado de ativação dos macrófagos.

As citocinas IL-6 e $\text{TNF}\alpha$ são secretadas principalmente por monócitos e macrófagos em resposta à reação inflamatória, participando da regulação de diferentes processos fisiopatológicos. Experimentalmente, na presença de LPS, a supressão das citocinas IL-6 e $\text{TNF}\alpha$ é observada após o tratamento com a morfina (ROY et al., 1998b). O fator de transcrição $\text{NF}\kappa\text{B}$, responsável pelo aumento da regulação de diferentes citocinas como a IL-6 e $\text{TNF}\alpha$, e também da produção de NO, é suprimido por este opióide (AZUMA; OHURA, 2002). Apesar da IL-1 β ser uma citocina pró-inflamatória, sua produção está associada, diretamente, ao aumento da liberação de peptídeos opióides endógenos, favorecendo, no sítio inflamatório, os efeitos analgésicos induzidos por diferentes opióides exógenos (NINKOVIC; ROY, 2013). Ainda, estas citocinas são descritas como potentes reguladores da expressão gênica de receptores opióides, enfatizando a importância da participação desses mediadores na base molecular envolvida na interação entre receptores opióides com o sistema neuro-imune (KRAUS, 2009).

Interessantemente, os nossos dados demonstram que a morfina, utilizada como controle positivo, nas mesmas condições experimentais, apresenta ações inibitórias ou estimulatórias similares e de magnitude semelhante ao observado para a CRF. Esse comportamento modulatório da morfina está de acordo com o demonstrado em outros estudos (BHASKARAN et al., 2001), sugerindo que a CRF possa interferir com esses parâmetros por mecanismos semelhantes aos demonstrados para a morfina e peptídeos opióides.

Como citado anteriormente, diferentes estudos demonstram que morfina ou outras drogas opióides exógenas, bem como peptídeos opióides modulam a funcionalidade de leucócitos, particularmente, macrófagos (HOLAN et al., 2003; STANOJEVIC et al., 2008; TOMASSINI et al., 2004). Essas ações são moduladas por receptores tipo opióide.

Assim, para investigar essa hipótese, na etapa seguinte de desenvolvimento do projeto, fomos investigar se CRF seria capaz de modular, a expressão e ativação de receptores opióides em macrófagos. Inicialmente, quantificamos a expressão e ativação dos receptores μ , κ e δ em macrófagos residentes e incubados na presença do LPS. Conforme demonstrado em nossos resultados, macrófagos peritoneais de ratos, após 24 horas de cultura apresentaram significativa expressão de receptores tipo κ , seguido da expressão de receptores μ e δ . Na presença de LPS (inflamatório) os macrófagos apresentaram principalmente a expressão dos receptores μ , seguido da expressão dos receptores κ e δ . Conforme demonstrado em nossos dados, macrófagos estimulados com LPS apresentam aumento da produção de NO^* e de citocinas pró-inflamatórias, tais como $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IL-1}\beta$, que, por sua vez, induzem o aumento da transcrição de receptores opióides tipo μ (KRAUS et al., 2003; KRAUS, 2009). Baseados nestes dados, mostrando que os receptores opióides podem ser diferentemente regulados, dependendo do estímulo aplicado (residente ou inflamatório), foi nosso próximo objetivo avaliar se os receptores estariam ativados. Dados de literatura obtidos em estudos de atividade funcional, utilizando macrófagos murinos da linhagem J774, mostram que o estímulo inflamatório favorece a ativação de receptor opióide e o acoplamento deste receptor à proteína G, com consequente ampliação da sinalização intracelular (GABRILOVAC et al., 2012). No presente estudo, a técnica escolhida para a avaliação da ativação de receptores opióides (ELISA), está baseada em estudos realizados por Gupta et al. (2006). Nestes estudos foram desenvolvidos anticorpos capazes de reconhecer receptores opióides na sua forma ativada (conformação específica). Receptores acoplados à proteína G, como os receptores opióides, apresentam alterações conformacionais na porção N-terminal citoplasmática quando ativados por seu agonista (GUPTA et al., 2006). Em nossos estudos, os anticorpos anti-receptor opióide foram incubados, diretamente, com os macrófagos. Além dos anticorpos que reconhecem apenas o receptor na sua forma ativa, utilizamos nestes ensaios, como controle adicional, os

mesmos anticorpos usados nos ensaios de *western blotting*, ou seja, anticorpos que reconhecem os receptores independentemente de seu estado de ativação. Os resultados mostraram que, quando utilizados anticorpos que reconhecem apenas o receptor ativado, ocorrem da mesma forma que o observado nos ensaios de *western blotting*, alterações na expressão dos receptores opióides, que se traduziu em aumento ou diminuição, dependendo do estímulo e do receptor avaliado.

Em ensaios subsequentes, foi avaliado se a CRF seria capaz de alterar a expressão ou ativação desses receptores. Observamos que este peptídeo foi capaz de alterar a expressão dos macrófagos residentes, que passaram a apresentar maior expressão dos receptores μ , seguido de κ e baixa alteração sobre a ativação de receptores δ . Diferentemente, em células estimuladas com LPS, a CRF foi capaz de diminuir a expressão de μ e aumentar a expressão de κ e δ . Os ensaios de ativação confirmam os resultados obtidos nos ensaios de *western blotting*. Estes dados são interessantes e mostram que a CRF é capaz de regular tanto a expressão quanto à ativação dos receptores opióides. Cabe ressaltar que, nos ensaios de conformação específica (forma ativa), a morfina foi utilizada como controle. Interessantemente, foi observado que a CRF foi capaz de modular a ativação dos receptores opióides μ e κ de forma similar à morfina, com exceção dos receptores δ , que apresentam aumento significativo da sua ativação, quando comparado à morfina. Adicionalmente, nossos dados demonstram, pela primeira vez, que a CRF é capaz de induzir a expressão de receptores opióides em macrófagos residentes e modular a expressão desses receptores em macrófagos estimulados pelo LPS.

Baseados nestes dados e, em continuidade aos objetivos propostos, avaliamos a participação dos receptores opióides nos efeitos imunomodulatórios presentemente demonstrados para a CRF.

Para tanto, antagonista não seletivo (Naloxona) e seletivos (CTOP: μ , *nor*-BNI: κ e Naltrindole: δ) foram incubados 60 minutos antes da adição da CRF ou morfina (controle positivo), na ausência ou presença do LPS. Após os diferentes tempos de incubação, a funcionalidade dos macrófagos foi avaliada. Ainda, culturas controles, compostas de macrófagos incubados apenas na presença dos diferentes antagonistas, na ausência ou presença do LPS, foram mantidas simultaneamente. Cabe salientar que a viabilidade dos macrófagos foi novamente avaliada para confirmar que os antagonistas de receptores opióides, nas concentrações e tempos

avaliados, não acarreta ação citotóxica. Nossos resultados demonstraram viabilidade sempre superior a 98%. A pré-incubação com os diferentes tipos de antagonistas (seletivo ou não seletivos) bloqueiam a ação inibitória da CRF sobre a capacidade fagocítica de macrófagos residentes e inflamatórios. O mesmo foi observado para a morfina. Os antagonistas *per se*, não interferiram com essa função. A participação de diferentes receptores opióides na ação inibitória da morfina sobre a função de fagocitose por leucócitos foi demonstrada (TOMASSINI et al., 2004).

Assim como observado para a fagocitose, o efeito inibitório da CRF sobre a liberação de H_2O_2 por macrófagos residentes foi, novamente, bloqueada pelos diferentes antagonistas de receptores opióides, da mesma forma como observada para a morfina. Adicionalmente, observou-se ação estimulatória adicional sobre a produção de H_2O_2 , acarretada pelo tratamento dos antagonistas e posterior incubação com CRF ou morfina. Esses dados corroboram aos observados por Vujic et al. (2004), quando testaram a ação da metionina-encefalina (MET), um peptídeo opióides que modula funções de macrófagos. Nestes ensaios, os autores demonstraram que antagonistas seletivos para MOR e KOR bloqueiam a ação modulatória deste peptídeo sobre a liberação de reativos de oxigênio e de nitrogênio por macrófagos inflamatórios e sugerem uma possível ação agonística parcial para estes antagonistas, possivelmente por bloquear peptídeos endógenos secretados pelos macrófagos, durante sua adesão. De fato, a atividade agonística de alguns antagonistas específicos já foi relatada anteriormente. Um exemplo é o antagonista específico para os subtipos $\delta_{1,2}$ (NTI), que em ensaios *in vivo* e *in vitro* mimetiza a ação estimulatória do agonista deltorfina I, sobre a proliferação de mononucleares obtidos do sangue periférico (NOVIELLO et al., 1997) e a ação inibitória da MET, sobre o edema de pata induzido por concanavalina A, em ratos (STANOJEVIĆ et al., 2002).

Diferentemente ao observado para macrófagos residentes, em macrófagos inflamatórios, a ação inibitória da CRF sobre a produção de H_2O_2 foi bloqueada apenas pelo Naltrindole, evidenciando importante participação dos receptores δ (*delta*) nas ações da CRF, nesta condição experimental. É importante ressaltar que, conforme demonstrado anteriormente, macrófagos incubados com CRF na presença de LPS, apresentam significativo aumento da ativação de receptores opióides tipo δ .

Este fato pode ter contribuído para o importante envolvimento deste receptor na ação da CRF sobre a H_2O_2 . Outra importante diferença observada entre as células residentes e inflamatórias foi que os diferentes antagonistas não bloquearam a ação da morfina sobre a liberação deste reativo do oxigênio. Neste sentido foi descrito MET, um ligante de alta afinidade a receptores δ e de baixa afinidade a receptores μ , tem suas ações modulatórias, sobre a liberação de H_2O_2 , bloqueadas quando incubada na presença da combinação de dois ou três diferentes antagonistas de receptores opióides, demonstrando a importância da interação funcional destes receptores (DIMITRIJEVIC et al., 2000; RADULOVIC et al., 1996). Estes dados podem explicar, pelo menos em parte, os resultados presentemente obtidos com a morfina.

Em continuidade, foi avaliada a participação dos receptores opióides sobre a ação inibitória da CRF sobre a produção de NO. Neste caso, apenas o *nor*-BNI boqueou o efeito da CRF, mostrando a importância do receptor κ para a ação da CRF sobre esta função, tanto por macrófagos residentes como inflamatórios. É interessante ressaltar que, conforme demonstrado nos ensaios de expressão e ativação de receptores opióides, macrófagos residentes incubados na presença da CRF, apresentaram mais expressos e ativos os receptores tipo μ . Ainda, macrófagos residentes, estimulados com LPS aumentam a expressão de receptores opióides do tipo μ que, por sua vez, estão envolvidos com a regulação da produção de NO (BALOG et al., 2010).

É importante ressaltar que o *nor*-BNI não interferiu *per se* com a produção deste reativo enquanto que a Naloxona, CTOP e Naltrindole acarretaram ação inibitória sobre a produção de NO. Já foi demonstrada as ações *per se* desses antagonistas sobre a liberação basal de NO por macrófagos incubados apenas na presença de meio de cultura (VUJIC et al., 2004).

Em continuidade aos estudos com os antagonistas, nossos resultados mostram que a ação estimulatória da CRF sobre a produção de IL-1 β por macrófagos residentes ou inflamatórios foi bloqueada totalmente por todos os antagonistas investigados. Esses resultados nos permite sugerir que os receptores μ , κ e δ participam da modulação da CRF sobre a produção desta citocina pelos macrófagos. Novamente, os antagonistas bloquearam a ação estimulatória da

morfina, de maneira similar ao observado para CRF. A participação de diferentes receptores sobre a ação modulatória opióides e de peptídeos opióides sobre a funcionalidade de macrófagos peritoneais de ratos vem sendo demonstrada em outros estudos (STANOJEVIC et al., 2008; VUJIC et al., 2004).

Em relação à produção de IL-6, a ação estimulatória da CRF por macrófagos residentes foi completamente abolida pelos diferentes antagonistas. O mesmo perfil foi observado para a morfina, sugerindo, mais uma vez, a importância dos diferentes tipos de receptores opióides nas funções de macrófagos. Conforme demonstrado anteriormente, em macrófagos estimulados com LPS, a CRF e a morfina induziram inibição sobre a produção da IL-6. Esta inibição não foi revertida por nenhum antagonista. Ainda, é observado que esses opióides, em associação com os diferentes antagonistas acarretam efeito inibitório mais pronunciado. É interessante ressaltar que, em alguns estudos com peptídeos opióides, a associação de antagonistas, tais como $\kappa+\mu$ ou $\mu+\delta_{1,2}$, foram necessárias para antagonizar as ações moduladoras de peptídeos opióides sobre função de macrófagos estimulada por LPS (VUJIC et al., 2004). Baseados nestes dados da literatura, podemos sugerir que, provavelmente a incubação dos macrófagos na presença da CRF e dois ou mais antagonistas conjugados, poderia contribuir para demonstrar se a interação funcional de diferentes receptores é importante para bloquear a ação inibitória da CRF observadas sobre produção deste mediador.

Diferentemente ao observados para as citocinas IL-1 β e IL-6, a CRF foi capaz de inibir significativamente a produção de TNF- α por macrófagos residentes e inflamatórios. Em macrófagos residentes, os antagonistas CTOP e *nor*-BNI (antagonistas de receptores μ e κ , respectivamente) bloquearam totalmente a ação da CRF. Já, para a morfina, os antagonistas CTOP, *nor*-BNI e naltrindole (antagonistas de receptores μ , κ e δ , respectivamente), bloquearam totalmente a ação deste opióide. Este perfil foi mantido em células inflamatórias, uma vez que a ação inibitória da CRF foi bloqueada, novamente, tanto pelo CTOP como *nor*-BNI e a ação da morfina bloqueada pelos antagonistas CTOP, *nor*-BNI e naltrindole.

De qualquer forma, os dados nos levam a sugerir que os receptores opióides apresentam participações distintas e/ou específicas, dependendo da função celular. De fato, macrófagos expressam todos os componentes necessários para regular a síntese, processamento e liberação de peptídeos opióides que podem agir de

maneira autócrina ou parácrina (MOUSA et al., 2004; SARAIVA et al., 1998) e dependente do grau de ativação das células (STANOJEVIĆ et al., 2008). Ainda, alguns peptídeos opióides modulam a liberação de H_2O_2 por macrófagos via receptores opióides $\delta 1$ e $\delta 2$ ou pela interação funcional dos receptores opióides μ e κ , dependendo do estímulo (STANOJEVIĆ et al., 2008). Em macrófagos, a ativação dos receptores opióides, por agonistas ou antagonistas, podem atingir diversas vias sinalizadoras intracelulares, resultando na mudança da atividade celular (MAKMAN et al., 1998). Portanto, essas evidências podem explicar, pelo menos em parte, os resultados presentemente obtidos. Conforme observado, no decorrer da discussão foram citados diferentes trabalhos que relata a importante modulação de peptídeos opióides sobre as funções de macrófagos e a participação de diferentes peptídeos opióides secretados por estas células, durante o processo inflamatório, induzido, principalmente por corticotrofina e $IL1-\beta$. Esses peptídeos interagem com múltiplos receptores opióides localizados em terminações nervosas nociceptivas, resultando em potente ação analgésica. Em nosso estudo, detectamos importante aumento da produção de $IL1-\beta$ por macrófagos incubados na presença de CRF. Assim, entendemos que a quantificação de peptídeos opióides em culturas de macrófagos residentes e inflamatórios, na presença da CRF contribuirá de maneira importante para a explicar a participação dos diferentes receptores opióides nas ações deste peptídeo.

6 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo permitem concluir que a CRF modula diferentes funções de macrófagos, conforme o estado de ativação dessas células. Ainda, este peptídeo aumenta a expressão e ativação dos receptores μ , κ e δ , importantes para as ações da CRF sobre as diferentes funções dos macrófagos. Portanto, assim como descrito para morfina e peptídeos opióides, a CRF, um importante peptídeo com ação analgésica pode ser uma molécula regulatória fundamental para as ações sobre o sistema imune e na neuromodulação.

REFERÊNCIAS²

- ADAMS, D. O.; HAMILTON, T. A. The cell biology of macrophage activation. **Ann. Rev. Immunol.**, v. 2, p. 283- 318, 1984.
- ADAMON, W. T et al. Ontogeny of δ - and κ -opiate receptor control of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. **Endocrinology**, v. 129, p. 956 – 964, 1991.
- AIRD, S. D. et al. The amino acid sequence of the acidic subunit B-chain of crotoxin. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 3, n. 1040, p. 217-224, 1990.
- AKIL, H. et al. Endogenous opioids: biology and function. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 7, p. 223–255, 1984.
- BALOG, T. et al. Endomorphin-suppressed nitric oxide release from mice peritoneal macrophages. **Neuropeptides**, v. 44, n. 1, p. 25-29, 2010.
- BALOG, T. et al. The effect of methionine-enkephalin on nitric oxide release in mice is age and gender related. **Pharmacol. Res.**, v. 44, p. 287–292, 2001.
- BON, C. et al. Crotoxin, half-century of investigations on a phospholipase A₂ neurotoxin. **Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.**, v. 39, n.4, p. 439-448, 1989.
- BORNER, C. et al. T-cell receptor/CD28-mediated activation of human T lymphocytes induces expression of functional mu-opioid receptors. **Mol. Pharmacol.**, v. 74, p.496 – 504, 2008.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248 - 253, 1976.
- BRIGATTE, P. et al. Peripheral kappa and delta opioid receptors are involved in the antinociceptive effect of crotaline in a rat model of cancer pain. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 109, p. 1 - 7, 2013.
- BRIGATTE, P. et al. Walker 256 tumor-bearing rats as a model to study cancer pain. **J. Pain.**, v. 5, p. 412 - 421, 2007.
- BRYANT, H. U. et al. Morphine pellet-induced immunomodulation in mice: temporal relationships. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 245, p. 913 – 920, 1988a.
- BRYANT, H. U. et al. Role of adrenal cortical activation in the immunosuppressive effects of chronic morphine treatment. **Endocrinology**, v.128, p. 3253–3258, 1991.
- BRYANT, H. U. et al. Morphine-induced immunomodulation is not related to serum morphine concentrations. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 149, p.165 –169, 1988b.

² De acordo:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

- CABOT, P. J. et al. Immune cell-derived beta-endorphin. Production, release, and control of inflammatory pain in rats. **J. Clin. Invest.**, v.100, p. 142 – 148, 1997.
- CAHILL, C. M. et al. Up-regulation and trafficking of delta opioid receptor in a model of chronic inflammation: implications for pain control. **Pain**, v.101, n.1 - 2, p.199 - 208, 2003.
- CARVALHO, W. A.; VIANA, W. Analgésicos opióides. In: SILVA, P (Ed). Farmacologia. 5ª ed, Rio de Janeiro:Editora Guanabara,1998.
- CASELLAS, A. M. et al. Inhibition by opioids of phagocytosis in peritoneal macrophages. **Neuropeptides.**, v.18, p. 35 – 40, 1991.
- CHATURVEDI, K. et al. mu Opioid receptor: role for the amino terminus as a determinant of ligand binding affinity. **Brain Res. Mol. Brain**, v. 76, n. 1, p. 64 - 72, 2000.
- CHUANG, T. K. et al. Mu opioid receptor gene expression in immune cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 216, n. 3, p. 922 - 930,1995.
- COHN, Z. A. The activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy and future. **J. Immunol.**v. 121, p. 813 - 816, 1978.
- COX, B. M.; MULLER, G. P. Endogenous opioide peptides. In: BECKER, K. L. (Ed.). **Principles and practice of endocrinology and metabolismo.** 2. ed. Philadelphia: JB Lippincott Company, 1995. p. 1430 -1457.
- DAHAN, A. et al. Morphine-6-glucuronide (M6G) for postoperative pain relief. **Eur. J. Pain.**,v. 12, n. 4, p. 403 - 411, 2008.
- DING, A. H. et al. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **J. Immunol.**, v. 141, p. 2407-2412, 1988.
- EISENSTEIN, T. K; HILBURGER, M. E. Opioid modulation of immune responses: effects on phagocyte and lymphoid cell populations. **J. Neuroimmunol.**, v. 83, p. 36 – 44, 1998.
- FILIPCZAK-BRYNIARSKA, I. et al. The influence of opioids on the humoral and cell-mediated immune responses in mice. The role of macrophages. **Pharmacol. Rep.** v. 64, n. 5, p. 1200 - 1215, 2012.
- FRANCHI, S. et al. Mu opioid receptor activation modulates Toll like receptor 4 in murine macrophages. **Brain. Behav. Immun.**, v. 26, n .3, p. 480- 488, 2012.
- FLIERL, M. L. et al. Catecholamines-crafty weapons in the inflammatory arsenal of immune/inflammatory cells or opening pandora's box? **Mol. Med.**,v.14,n. 3 - 4, p. 195 - 204, 2008.

- GAVAN, P. M; HUDA, A. Opioid peptides and their receptors: overview and function in pain modulation. In: KENNETH, L.D; Charney, D; Coyle, J.T and Nemeroff, C (Eds). **Neuropsychopharmacology**. The fifth generation of progress. American College of Neuropsychopharmacology, 35 - 46, 2002.
- GAVERIAUX, C. et al. Identification of kappa- and delta-opioid receptor transcripts in immune cells. **FEBS Lett.**, v. 369 ,p. 272 – 276, 1995.
- GORDON, S. Biology of the macrophages. **J. Cell. Sci.**, v.4,p. 267 - 286, 1986.
- GORDON, S. The macrophage. **Bioessays**., v. 17, p. 977 - 986, 1995.
- GORDON, S. The role of the macrophage in immune regulation. **Res. Immunol.** v. 149, p. 685-688, 1998.
- GRIMM, M. C. Opiate inhibition of chemokine-induced chemotaxis. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** v. 840, p. 9 – 20, 1998.
- GUPTA, A. et al. Conformation state sensitive antibodies to G-protein coupled receptors. **J. Biol. Chem.**, v. 282, n .8, p. 5116 - 5124, 2006.
- GUTIERREZ, V. P. et al. Crotalphine induces potent antinociception in neuropathic pain by acting at peripheral opioid receptors. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 594, n.1 - 3, p. 84 - 92, 2008.
- GUTIERREZ, V. P. et al. The peripheral L-arginine-nitric oxide-cyclic GMP pathway and ATP-sensitive K⁺ channels are involved in the antinociceptive effect of crotalphine on neuropathic pain in rats. **Behav. Pharmacol.**, v. 23,n .1,p .14 - 24, 2012.
- GUTIERREZ, V. P. Efeito antinociceptivo da crotalfina sobre a dor óssea induzida pelo tumor de Walker 256 em fêmur de ratos/ Vanessa Pacciari Gutierrez – São Paulo, 2012.
- HOUSE, R. V. et. al. A comparative study of immunomodulation produced by in vitro exposure to opioid receptor agonist peptides. **Peptides**, v. 17, p. 175–181, 1996.
- JACOBOWITZ, D. M.; O'DONOHUE, T.L.alpha-Melanocyte stimulating hormone: immunohistochemical identification and mapping in neurons of rat brain. **Proc. Natl.Acad. Sci. USA.**, v. 75, p. 6300 – 6304, 1978.
- JANKOVIC, B. D; MARIC', D. Enkephalins as regulators of inflammatory immune reactions. In SCHARRER, M.; SMITH, E.M.; STEPHANO, G.B. (eds). **Neuropeptides and Immunoregulation**. Berlin:Springer, p. 76 –100, 1994.
- JORENS, P. G. et al. Modulation of nitric oxide synthase activity in macrophages. **Mediators of Inflammation**, v. 4,p. 75 - 89, 1995.
- KAMPHIUS, S. et al. Role of endogenous pro-enkephalin A-derived peptides in human T cell proliferation and monocyte IL-6 production. **J. Neuroimmunol.**, v. 84, p. 53– 60, 1998.

- KONNO, K. et al. Crotalphine, a novel potent analgesic peptide from the venom of the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Peptides**, v. 29,n. 8,p. 1293-1304, 2008.
- KRAUS, J. Regulation of mu-opioid receptors by cytokines. **Front. Biosci. (Schol Ed)**.v. 1,p. 164-70, 2009.
- KRAUS, J. et al. The role of nuclear factor κ b in tumor necrosis factor regulated transcription of the human l-opioid receptor gene. **Mol. Pharmacol.**, v. 64,p. 876–884, 2003.
- KUENG, W. et al. Quantification of cells cultured on 96-well plates. **Anal. Biochem.**, v.182,n.1,p.16-19, 1989.
- MACHADO, F. C. et al. CB1 and CB2 cannabinoid receptors are involved in the effect of crotalphine, an opioid-like analgesic peptide. *Memórias do Instituto Butantan*, 67, resumo 12.22, December 2010, XII Annual Scientific Meeting São Paulo, SP – Brazil. ISSN1982-3045.
- MADDEN, K. S.; FELTEN, D. L. Experimental basis of neural-immune interactions. **Physiol. Rev.**, v. 75,p. 77-106,1995.
- MAKMAN ,M. H. et al. Properties of mu 3 opiate alkaloid receptors in macrophages, astrocytes and HL-60 human promyelocytic leukemia cells. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 437,p. 137– 148,1998.
- MAO, J. NMDA and opioid receptors: Thiers interaction in antinociception, tolerance and neuroplasticity. **Brain. Res. Reviews**, v. 30,p. 289-304,1990.
- MAROTTI, T. et al. The role of cytokines in METenkephalin-modulated nitric oxide release. **Neuropeptides** v. 32,p. 57–62, 1998.
- MATTHEW, J. R., et al. Inhibition of NF κ b DNA binding by nitric oxide. **Nucl. Acid. Res.**, v.24, p. 2236–2242, 1996..
- McCARTHY, L. et al. Opioids, opioid receptors, and the immune response. **Drug Alcohol. Depend.**,v. 62,p. 111–123, 2001.
- METCALF, D. Transformation of granulocytes to macrophages in bone marrow colonies in vitro. **J. Cell. Physiol.**, v. 77,p. 277-280, 1971.
- METCHNIKOFF, E. 1905. Apud AUGER & ROSS, 1992.
- MOLINA, P. E. Opioids and opiates: analgesia with cardiovascular, haemodynamic and immune implications in critical illness. **J. Intern. Med.**, v .259, n. 2,p. 138-154, 2006.
- MOORE, M. A. S.; METCALF, D. Ontogeny of the haemopoietic system: yolk sac origin of in vivo and in vitro colony forming cells in the developing mouse embryo. **Br. J. Haematol.**, v. 18,p. 279-296, 1970.

MOUSA, S. A. et al. Subcellular pathways of beta-endorphin synthesis, processing, and release from immunocytes in inflammatory pain. **Endocrinology**, v.145,p.1331–1341, 2004.

MOUSA, S. A. et al. b-Endorphin-containing memory-cells and l-opioid receptors undergo transport to peripheral inflamed tissue. **J. Neuroimmunol.**, v. 115, p. 71–78, 2001.

NATHAN, C. F. Secretory products of macrophages. **J. Clin. Invest.**, v. 79, p. 319-326, 1987.

NESTLER, E. J. Molecular basis of long-term plasticity underlying addiction. **Nat Rev Neurosci.**, v.2,n.2,p.119-128, 2001. Review. Erratum in: **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 2, n.3 ,p. 215, 2001.

NINKOVIC', J.; ROY, S. Role of the mu-opioid receptor in opioid modulation of immune function. **Amino Acids**, v. 45 ,n. 1,p. 9-24, 2013.

PARK, S. K., et al. Nitric oxide regulates nitric oxide synthase-2 gene expression by inhibiting NF-kb binding to DNA. **Biochem. J.**, v.322,p. 609–613,1997.

PEREZ-CASTRILLON, J. L, et al. Opioids depress in vitro human monocyte chemotaxis. **Immunopharmacology**, v. 23,p. 57–61, 1992.

PICK, E.; MIZEL, M. Rapid micro assay for the measurement of super oxide and hydrogen peroxide production by macrophages using an automatic enzyme immunoassay reader. **J. Immunol. Meth.**, v. 46,p. 211-226, 1981.

PRZEWLOCKI, R. et al. Gene expression and localization of opioid peptides in immune cells of inflamed tissue: functional role in antinociception. **Neuroscience** , v. 48,p. 491– 500, 1992.

RAPPOLEE, D. A. ; WERB, Z. Secretory products of phagocytes. **Curr. Opin. Immunol.**, v.1,p. 47-55, 1988.

RITTNER, H. L. et al. Opioid peptide-expressing leukocytes: identification, recruitment, and simultaneously increasing inhibition of inflammatory pain. **Anesthesiology** , v. 95, p. 500–508, 2001.

RITTNER, H. L. et al. Leukocytes in the regulation of pain and analgesia. **J. Leukoc. Biol.**, v.78, p. 1215–1222, 2005.

RODA, L. G. et al. Positive and negative immunomodulation by opioid peptides. **Int J. Immunopharmac.**, v.18,n.1,p.1-16, 1996.

ROJAVIN, M. Morphine treatment in vitro or in vivo decreases phagocytic functions of murine macrophages. **Life Sci.**, v. 53,p. 997–1006,1993.

ROSENFELD, G. Symptomathology, Pathology and Treatment of snakes bites in South America. In: Bücherl, W and Buckley, E. (eds) **Venomous Animals and Their Venoms**, New York: Academic Press 2, p. 345 - 384, 1971.

- ROY, S. et al. MU-opioid receptor-knockout mice: role of mu-opioid receptor in morphine mediated immune functions. **Brain Res. Mol. Brain Res.**, v. 61, p. 190–194, 1998a.
- ROY, S. et al. Morphine accelerates the progression of sepsis in an experimental sepsis model. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 437, p. 21–31, 1998b.
- ROY, S.; LOH, H. H. Effects of opioids on the immune system. **Neurochem. Res.**, v.21,p.1375–1386, 1996.
- SAMPAIO, S. C. et al. Lipoxygenase-derived eicosanoids are involved in the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* venom or crotoxin on rat macrophage phagocytosis. **Toxicon.**, v.47,n.3,p. 313-321, 2006.
- SAMPAIO, S. C. et al. *Durissus terrificus* snake venom regulates macrophage metabolism and function. **J. Leuk. Biol.**, v.7,p. 551-558, 2001.
- SAMPAIO, S. C. et al. Contribution of crotoxin for the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom on macrophage function. **Toxicon.**, v. 41,p. 899-907, 2003.
- SARAIVA, F. Differential response to a stress stimulus of proenkephalin peptide content in immune cells of naive and chronically stressed rats. **Neuropeptides**, v. 32,p. 351–359, 1998.
- SHARP, B. M. et al. Evidence for opioid receptors on cells involved in host defense and the immune system. **J. Neuroimmunol.**, v. 83,p. 45–56, 1998.
- STANOJEVIC',S. et al. Methionine-enkephalin modulation of hydrogen peroxide (H₂O₂) release by rat peritoneal macrophages involves different types of opioid receptors. **Neuropeptides**, v. 42,n. 2, p. 147-158 ,2008.
- STEIN, C.; LANG, L. J. Peripheral mechanisms of opioid analgesia. **Curr. Opin. Pharmacol.**, v. 9, n. 1, p. 3-8. 2009.
- SZABO, I. et al. Suppression of peritoneal macrophage phagocytosis of *Candida albicans* by opioids. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 267,p. 703 – 706,1993.
- TAKEMURA, R.; WERB, Z. Secretory products of macrophages and their physiological functions. **Am. J. Physiol.**, v. 246, p. C1-C9, 1984.
- TAPPER, H. The secretion of preformed granules by macrophages and neutrophils. **J. Leukoc. Biol.**,v. 59, p. 613-620, 1996.
- TARLING, J. D. et al. Self renewal of pulmonary alveolar macrophages. **J. Leukoc. Biol.**, v. 42, p. 443-446, 1987.
- TOMASSINI, N. et al. Morphine inhibits Fc-mediated phagocytosis through mu and delta opioid receptors. **J. Neuroimmunol.**, v. 147, p. 131–133, 2004
- VACCARINO, A. L.; KASTIN, A. J. Endogenous opiates. **Peptides**, v. 22, p. 2257–2328, 2000.

VALE, L. B.; OLIVEIRA FILHO, R. M. Farmacologia dos opioides. In: _____. **Farmacologia integrada: fundamentos farmacológicos da terapêutica**. Vol II. Rio de Janeiro: Atheneu Editora, 1996.

Van FURTH, R. ; COHN, Z. A. The origin and kinetics of mononuclear phagocytes. **J. Exp. Med.**, v.128,p. 415-435, 1968.

Van FURTH, R. Origin and turnover of monocytes and macrophages. **Curr. Top. Pathol.**, v. 79, p. 125-150, 1989.

Van FURTH, R. et al. Quantitative study on the production and kinetics of mononuclear phagocytes during an acute inflammatory reaction. **J. Exp. Med. Med.**, v. 138, p. 1314-1330, 1973.

Van FURTH, R. et al. Characteristics, origin and kinetics of human and murine mononuclear phagocytes. In: van FURTH, M. N. (Ed.). **Mononuclear phagocytes. Functional aspects**. London: The Hague, 1980.

Van RIJIN, R. M. et al. Opioid-receptor-heteromer-specific trafficking and pharmacology. **Curr, Opin, Pharmacol.**, v.10,n.1,p.73-79, 2010.

WALKER, J. S. et al. The anti-inflammatory effects of opioids: Their possible relevance to the pathophysiology and treatment of rheumatoid arthritis. **Rheumatoid Arthritis**, v. 1, p. 291–299, 1997.

WERB, Z. et al. Commitment to expression of metalloendopeptidases, collagenase and stromelysin: relationship of inducing events to changes in cytoskeletal architecture. **J. Cell Biol.**, v. 102, p. 697-702, 1986.

WHITELOW, D. M. The intravascular lifespan of monocytes. **Blood**, v. 28, p. 445-464, 1966.

ZAMBELLI, V. O. **Avaliação da expressão e ativação de receptores opióides após injúria periférica em ratos**. 2011. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

ZHANG, Y. Specific cross-linking of Lys233 and Cys235 in the mu opioid receptor by a reporter affinity label. **Biochemistry**, v. 44 ,n. 7, p- 2271-2275, 2005.