



Acta Scientiarum. Health Sciences

ISSN: 1679-9291

eduem@uem.br

Universidade Estadual de Maringá
Brasil

Schebeleski Soares, Cristiano; Cristhiany Occhi, Roberta; Luz de Carvalho, Luana Gomes; Franzói-de-Moraes, Solange Marta; de Oliveira Dalálío, Márcia Machado; Marques de Araújo, Silvana
Produção de fator de necrose tumoral-alfa e peróxido de hidrogênio na infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em camundongos submetidos ao exercício

Acta Scientiarum. Health Sciences, vol. 32, núm. 1, 2010, pp. 57-60

Universidade Estadual de Maringá
Maringá, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=307226626009>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica
Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal
Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

Produção de fator de necrose tumoral-alfa e peróxido de hidrogênio na infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em camundongos submetidos ao exercício

Cristiano Schebeleski Soares¹, Roberta Cristhiany Occhi¹, Luana Gomes Luz de Carvalho², Solange Marta Franzói-de-Moraes³, Márcia Machado de Oliveira Dalálio⁴ e Silvana Marques de Araújo^{4*}

¹Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil. ²Curso de Farmácia, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil. ³Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, Paraná, Brasil. ⁴Departamento de Análises Clínicas, Universidade Estadual de Maringá, Av. Colombo 5790, 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil. *Autor para correspondência. E-mail: smaraujo@uem.br

RESUMO. Este trabalho teve como objetivo determinar os níveis de fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) sérico e produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por macrófagos peritoneais em camundongos experimentalmente infectados pelo *Trypanosoma cruzi* e submetidos ao treinamento físico realizado antes da infecção ou ao exercício físico durante o período de infecção. Foram utilizados camundongos BALB/c fêmeas com 30 dias de idade, inoculados com 1.400 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y. O exercício físico consistia em atividade de intensidade moderada em esteira rolante. As dosagens foram realizadas com material coletado no 13º dia de infecção. Para a dosagem de TNF-alfa, foi utilizada a técnica de ELISA de captura. A produção de H₂O₂ foi expressa por coloração produzida após a incubação de macrófagos peritoneais com peroxidase e a leitura realizada em aparelho de ELISA. Não foram encontradas diferenças significativas nas concentrações de TNF-alfa e produção de H₂O₂ entre os grupos infectados. O treinamento físico realizado antes da infecção e o exercício físico realizado após a infecção não foram capazes de alterar significativamente os níveis de TNF-alfa e a produção de H₂O₂ na infecção pelo *T. cruzi*.

Palavras-chave: exercício físico, *Trypanosoma cruzi*, TNF-alfa, H₂O₂.

ABSTRACT. Production of tumoral necrosis factor-alpha and hydrogen peroxide during *Trypanosoma cruzi* infection in mice submitted to exercise. This study aimed to determine the levels of seric tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) and production of hydrogen peroxide (H₂O₂) by peritoneal macrophages in mice experimentally infected with *T. cruzi* and submitted to pre-infection exercise training and to post-infection acute exercise. Female 30-day-old BALB/c mice were inoculated with 1,400 blood trypomastigotes of Y-strain *T. cruzi*. Exercise programs consisted in moderate-intensity activity and were carried out in a treadmill. The measurements were performed with material collected at the 13th day after infection Serum TNF-alpha was evaluated using capture ELISA. H₂O₂ production was expressed by coloration produced after incubation of peritoneal macrophages and the measurement was performed using an ELISA reader. There were no statistically significant differences in TNF-alpha levels and H₂O₂ production between the trained and non-trained infected groups. Thus, the physical training performed before infection and physical exercise performed after the infection were not able to change the levels of TNF-alpha and production of H₂O₂ in the infection by *T. cruzi*.

Key word: physical, exercise, *Trypanosoma cruzi*, TNF-alpha, H₂O₂.

Introdução

O *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas que afeta entre 16 e 18 milhões de pessoas na América Latina (MONCAYO, 2003). O tratamento etiológico da doença de Chagas é limitado e não possui completa eficácia, além de apresentar efeitos colaterais importantes (ARAÚJO et al., 2001).

Assim, o estudo de medidas alternativas tais como terapias homeopáticas, influência de estilo de vida, entre outras, as quais possam oferecer benefícios a esta população torna-se necessário. Um exemplo é a pesquisa desenvolvida no Laboratório de doença de Chagas da Universidade Estadual de Maringá sobre a ação do medicamento Canova[®] na resposta à infecção (OLIVEIRA et al. 2008),

O exercício físico também é um agente que possui a capacidade de influenciar o sistema imunológico, onde os estudos apontam que a prática de atividade física em intensidade moderada promove melhoras globais no mecanismo de defesa do organismo (WOODS, 2005). Não existem dados que demonstrem influência dos exercícios físicos na evolução da fase aguda da doença de Chagas. Durante a infecção aguda pelo *T. cruzi*, o fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) é uma das citocinas que atua na resistência ao agente infeccioso (REYES et al., 2006), alcançando pico de produção por volta do 13º dia de infecção. Os macrófagos também fazem parte da resposta do hospedeiro e, quando ativados, são capazes de destruir tripomastigotas de *T. cruzi* pelo aumento da produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), entre outras substâncias (MELO et al., 2003).

Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência de um programa de treinamento aeróbico, realizado antes da infecção e de um programa de exercício aeróbico, realizado durante a infecção na produção de TNF-alfa e de H_2O_2 em camundongos experimentalmente infectados pelo *T. cruzi*.

Material e métodos

Este trabalho foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEa) da UEM. Foram utilizados 63 camundongos BALB/c, fêmeas, com 30 dias de idade, divididos em dois protocolos:

1 - Treinamento pré-infecção: grupo crônico treinado infectado (CTI) (N=15); grupo crônico não-treinado infectado (CNI) (N=14); grupo crônico treinado controle (CTC) (N=5); grupo crônico não-treinado controle (CNC) (N=5). O programa de treinamento físico foi realizado em esteira rolante durante oito semanas, com uma sessão diária de treinamento, cinco vezes na semana, com duração de 30 a 45 min. na primeira semana, 45 a 60 min. na segunda semana e 60 min. nas demais. A velocidade média foi de 14 m min.⁻¹ nas quatro primeiras semanas e de 18 m min.⁻¹ nas quatro últimas.

2 - Exercício físico pós-infecção: grupo agudo treinado infectado (ATI) (N=7); grupo agudo não-treinado infectado (ANI) (N=7); grupo agudo treinado controle (ATC) (N=5); grupo agudo não-treinado controle (ANC) (N=5). O programa de exercício físico foi iniciado em esteira rolante 3h após a inoculação, com uma sessão diária realizada até o sétimo dia de infecção com duração de 30 min. e velocidade de 6 a 8 m min.⁻¹ nos dois primeiros dias, 45 min. e velocidade de 8 a 16 m min.⁻¹ do terceiro ao quinto dia, 55 min. de 10 a 16 m min.⁻¹ nos demais dias.

Esta intensidade de exercício físico aeróbico corresponde a um grau de esforço moderado. A esteira rolante é um modelo para seres humanos com adaptação para treinamento de animais de pequeno porte, com sensibilidade de velocidade de 2 m min.⁻¹. O treinamento foi realizado de segunda à sexta-feira em ambiente com temperatura controlada (20-22°C). Não foram utilizados mecanismos para induzir o animal a se exercitar.

A infecção foi realizada com 1.400 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y, via intraperitoneal.

As concentrações de TNF-alfa foram avaliadas por meio da técnica de ELISA de captura, desenvolvida de acordo com o fabricante (R&D Systems®, Minneapolis, MN, USA). O soro foi obtido no 13º dia de infecção. As concentrações da citocina foram determinadas com referência a uma curva-padrão obtida com a citocina murina recombinante. Os resultados foram expressos em pg mL⁻¹.

Para a produção de H_2O_2 , macrófagos peritoneais de três animais de cada grupo, obtidos no 13º dia de infecção, foram lavados com PBS a 1.500 rpm por 10 min. 2×10^5 células em 100 µL de PBS foram adicionadas a 100 µL de tampão vermelho fenol (0,56 nM) com peroxidase (0,01 mg mL⁻¹ de água destilada) em poços de microplaca de 96 orifícios. Após incubação a 37°C h⁻¹ em câmara úmida, a reação foi interrompida com 10 µL de NaOH, 1M. A leitura da absorbância foi feita a 620 nm em leitor de ELISA. As dosagens foram realizadas em quadruplicata e expressas em nanomol de H_2O_2 (2×10^5)⁻¹ células.

Foram realizados os testes T de *student* e ANOVA, com nível de significância de 5%, utilizando-se o programa *Statistica*® versão 6.0.

Resultados e discussão

O protocolo de exercício físico utilizado foi bem aceito pelos camundongos. Lightfoot et al. (2001) relatam que camundongos BALB/c têm grande afinidade com a atividade física realizada em esteira.

No experimento com treinamento físico pré-infecção, os animais infectados (CTI e CNI) apresentaram níveis séricos de TNF-alfa 680% maiores que animais não-infectados ($p < 0,0001$) (Figura 1). Embora a diferença não tenha sido significativa, os grupos infectados que foram submetidos ao programa de treinamento pré-infecção ou ao exercício pós-infecção (CTI e ATI) apresentaram níveis de TNF-alfa 14 e 10%

respectivamente maiores que seus controles não-treinados. O grupo CTC apresentou nível de TNF-alfa 73% maior que o grupo CNC ($p < 0,05$) (Figura 1).

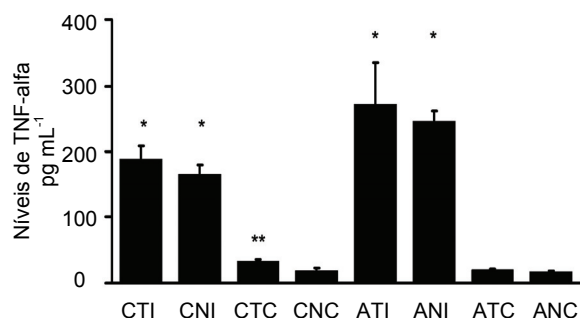


Figura 1. Níveis de TNF-alfa (média \pm erro-padrão) medidos no 13º dia de infecção experimental pela cepa Y do *T. cruzi*, em camundongos fêmeas BALB/c submetidos ou não ao treinamento antes da infecção ou ao exercício durante a infecção e seus controles não infectados. Grupos descritos em material e métodos. * $p < 0,0001$, comparando animais infectados com seus controles não-infectados. ** $p < 0,05$, comparando os grupos CTC x CNC.

Neste trabalho, os níveis de TNF-alfa foram maiores nos grupos submetidos ao exercício físico quando comparados aos seus controles não-treinados (CTI x CNI, CTC x CNC, ATI x ANI e ATC x ANC). No entanto, esta diferença só foi significativa na comparação do grupo não-infectado submetido ao treinamento físico comparado com o seu controle não-treinado (CTC x CNC), sugerindo que as adaptações nos mecanismos que regulam a produção de TNF-alfa causadas pelo treinamento físico foram menos influenciadas pelo exercício físico que pela infecção.

A produção de H_2O_2 é indicador do grau de ativação de macrófagos e está ligada à resposta do hospedeiro ao *T. cruzi* (MELO et al., 2003). No protocolo com treinamento pré-infecção, a produção de H_2O_2 para os grupos infectados foi significativamente maior que para os controles não-infectados ($p < 0,0001$), fato que não ocorreu no experimento com exercício durante a infecção (Figura. 2). Este resultado indica a importância da infecção na produção deste reagente.

Não foi observada diferença significativa entre os grupos CTI, CTC e ATI, em relação aos seus respectivos controles não-treinados, ANI, CNI e CNC embora os macrófagos de animais do grupo CTC tenham produzido 17,6% a menos de H_2O_2 que o grupo-controle não-treinado CNC. Este comportamento também foi observado por Bacuau et al. (2000).

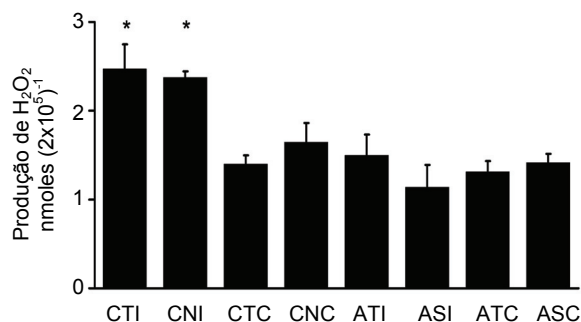


Figura 2. Produção de H_2O_2 por macrófagos (média \pm erro-padrão) no 13º dia de infecção experimental pela cepa Y do *T. cruzi*, em camundongos fêmeas BALB/c submetidos ou não ao treinamento antes da infecção ou ao exercício após a infecção e seus controles não-infectados, descritos em material e métodos. * $p < 0,0001$ comparando animais infectados do protocolo com treinamento antes da infecção com seus controles não-infectados.

Conclusão

Embora estatisticamente não significativa, a maior concentração de TNF-alfa, tanto no grupo submetido ao treinamento físico pré-infecção quanto no grupo infectado e subsequentemente submetido ao exercício físico, quando comparados com seus respectivos controles infectados pode ser um indicio de influência do exercício físico na resposta à infecção pelo *T. cruzi*.

Ajustes no modelo experimental, envolvendo entre outras características, linhagem de camundongos, cepa e inóculo do parasito podem gerar informações importantes para esclarecer a relação entre o exercício físico e os mecanismos de controle do TNF-alfa e da produção do peróxido de hidrogênio enquanto agentes controladores da infecção.

Agradecimentos

Agradecemos à Professora Dra. Margareth Cizuka Toyama Udo, pela orientação, do Departamento de Estatística (UEM), pelas orientações técnicas e aos técnicos do Departamento de Ciências Morfofisiológicas e do Departamento de Análises Clínicas (UEM), pelo apoio técnico.

Referências

- ARAÚJO, S. M.; CASSAROTTI, D. J.; GUILHERME, A. L. F.; TOLEDO, M. J. O.; PUPULIM, A. R. T.; MOTA, D. C. G. D.; GOMES, M. L. Dez anos do laboratório de doença de Chagas da Universidade Estadual de Maringá: melhoria da atenção ao paciente chagásico. *Revista de Ciências da Saúde*, v. 1, n. 2, p. 25-29, 2001.
- BACUAU, R. F.; BELMONTE, M. A.; SEELAENDER, M. C.; COSTA ROSA, L. F. Effect of a moderate intensity exercise training protocol on the metabolism of macrophages and lymphocytes of

tumour-bearing rats. **Cell Biochemistry and Function**, v. 18, n. 4, p. 249-258, 2000.

LIGHTFOOT, J. T.; TURNER, M. J.; DEBATE, K. A.; KLEEBERGER, S. R. Interstrain variation in murine aerobic capacity. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 33, n. 12, p. 2053-2057, 2001.

MELO, R. C.; FABRINO, D. L.; D'AVILA, H.; TEIXEIRA, H. C.; FERREIRA, A. P. Production of hydrogen peroxide by peripheral blood monocytes and specific macrophages during experimental infection with *Trypanosoma cruzi* in vivo. **Cell Biology International**, v. 27, n. 10, p. 853-861, 2003.

MONCAYO, A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the southern cone countries. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 5, p. 577-591, 2003.

OLIVEIRA, V. T. C.; CARDOZO, D. M.; DALALIO, M. M. O.; ARAUJO, S. M.; AMADO, C. A. B.; MOLITERNO, R. A. Action of the medicine Canova® on peritoneal resident macrophages infected with

Trypanosoma cruzi. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 30, n. 1, p. 33-39, 2008.

REYES, J. L.; TERRAZAS, L. I.; ESPINOZA, B.; CRUZ-ROBLES, D.; SOTO, V.; RIVERA-MONTOYA, I.; GÓMES-GARCÍA, L.; SNIDER, H.; SATOSKAR, A. R.; RODRÍGUES-SOSA, M. Macrophage migration inhibitory factor contributes to host defense against acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 6, p. 3170-3179, 2006.

WOODS, J. A. Physical activity, exercise, and immune function. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 19, n. 5, p. 369-370, 2005.

Received on February 25, 2009.

Accepted on April 22, 2009.

License information: This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.