Karen Fernanda Felix Da Silva De Albuquerque

**“AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS OXIDATIVOS E
INFLAMATÓRIOS EM NEUTRÓFILOS DE RATOS OBESOS
SUPLEMENTADOS COM EXTRATO DE CHÁ VERDE”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2014

Karen Fernanda Felix Da Silva De Albuquerque

**“AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS OXIDATIVOS E
INFLAMATÓRIOS EM NEUTRÓFILOS DE RATOS OBESOS
SUPLEMENTADOS COM EXTRATO DE CHÁ VERDE”**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof. Dra. Rosemari Otton

Versão original

São Paulo
2014

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

© reprodução total

Albuquerque, Karen Fernanda Felix da Silva de.

Avaliação de parâmetros oxidativos e inflamatórios em neutrófilos de ratos obesos suplementados com extrato de chá verde / Karen Fernanda Felix da Silva de Albuquerque. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Rosemari Otton.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Farmacologia. Área de concentração: Farmacologia. Linha de pesquisa: Imunofarmacologia de compostos bioativos em Doenças Crônicas Não Transmissíveis.

Versão do título para o inglês: Evaluation of oxidative and inflammatory parameters in neutrophils from obese rats supplemented with green tea extract.

1. Obesidade 2. Sistema Imune 3. Neutrófilos 4. Espécies Reativas de Oxigênio 5. Catequinas I. Otton, Rosemari II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia III. Título.

ICB/SBIB024/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Karen Fernanda Felix da Silva de Albuquerque.

Título da Dissertação Avaliação de parâmetros oxidativos e inflamatórios em neutrófilos de ratos obesos suplementados com extrato de chá verde.

Orientador(a): Profa. Dra. Rosemari Otton.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

☐ **Aprovado(a)**

☐ **Reprovado(a)**

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 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **160** nas fls. **137** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Rosemari Otton**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Avaliação sistemática de parâmetros oxidativos e inflamatórios em leucócitos de ratos obesos suplementados cronicamente com extrato de chá verde (Camellia sinensis)*" do qual participam o(s) aluno(s), **Anaysa Paola Bolin, Karen Fernanda Felix de Albuquerque, Nathalia Molina**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **28.05.13**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 29 de maio de 2013.

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

Prof. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

À minha mãe, Sandra Felix e aos meus avós, Francisco Felix e Maria José. Por serem tudo de precioso em minha vida; e por sempre estenderem os braços para me acolher, tanto nos momentos bons, quanto nos ruins. São minha força.

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Agradeço especialmente a **Deus**, que em todos os momentos de minha vida está presente, onde encontro minha força e minhas esperanças.

A minha Família: minha mãe **Sandra Felix**, minha avó **Maria José**, meu avô **Francisco Felix**, e meus tios **Rosângela Felix** e **Renato Rufino** pelo incentivo e apoio que me deram durante esse tempo; pela confiança, cuidado, amor, dedicação e sacrifícios; por acreditarem em meus sonhos e estarem ao meu lado sempre e acompanharem o meu crescimento.

Agradeço a minha orientadora, Prof^a. Dr^a. **Rosemari Otton**, pelos ensinamentos, amizade, atenção e paciência prestados ao longo de toda a pesquisa; por me mostrar o caminho para o conhecimento, sempre incentivando o aperfeiçoamento durante minha trajetória, desde a iniciação científica.

Ao Prof^o. Dr. **Cristoforo Scavone**, pelo acolhimento e oportunidade de realizar o mestrado pelo departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas.

Aos Profs. Dr^a. **Eliana Hiromi Akamine**, Dr^a. **Paulina Sannomiya**, Dr^a. **Lucia Rossetti Lopes** e Dr. **Antonio Carlos Oliveira**, pelas contribuições durante o exame de qualificação.

Às secretárias do departamento de Farmacologia, **Mônica Nunes** e **Camila Trindade**, pelo carinho e auxílio em assuntos burocráticos.

Agradeço também aos meus amigos do laboratório, **Nathalia Molina**, **Marcelo Paradiso**, **Anaysa Bolin**, **Andrea Rocha** e **Rita Macedo**, pela ajuda, companheirismo, carinho e amizade ao longo destes dois anos de mestrado. Vocês foram essenciais para a realização deste estudo!.

Aos meus amigos: **Renan Sargiani**, **Fernando Xavier**, **Paula Facuri** e **Everton Lucas**, pelo carinho, amizade, risos e apoio, sempre me oferecendo um ombro amigo e me encorajando.

A **CAPES** e à **FAPESP**, pelo auxílio financeiro.

Muito Obrigada!!!

“Valeu a pena? Tudo vale a pena
Se a alma não é pequena.
Quem quer passar além do Bojador
Tem que passar além da dor.”

Fernando Pessoa

RESUMO

ALBUQUERQUE, K. F. F. S. **Avaliação de parâmetros oxidativos e inflamatórios em neutrófilos de ratos obesos suplementados com extrato de chá verde.** 2014. 95f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

A obesidade é atualmente um dos mais graves problemas de saúde pública em todo o mundo. A prevalência desta doença tem crescido nas últimas décadas, tanto nos países desenvolvidos como em desenvolvimento. Entre as complicações médicas associadas com a obesidade podemos citar as doenças cardiovasculares, hipertensão arterial, dislipidemias, diabetes mellitus e diversos tipos de câncer. Déficit nas funções de células imunes, mais precisamente em neutrófilos podem agravar essas comorbidades, assim como leva à susceptibilidade em adquirir infecções. As catequinas, os principais compostos polifenólicos no chá verde (*Camellia sinensis*), apresentam uma série de ações farmacológicas como antioxidante/pró-oxidante, anti-hipertensivo, anti-inflamatório, anti-proliferativo, anti-trombogênico, antimutagênico, antidiabético e redutor de lipídios. Este estudo tem como objetivo principal avaliar os efeitos da suplementação crônica com extrato de chá verde sobre os indicadores inflamatórios e da função de neutrófilos de ratos induzidos à obesidade pela ingestão de dieta de cafeteria (hipercalórica). Para a realização deste estudo, ratos machos Wistar (*Rattus norvegicus*) com peso inicial de 150 ± 40 g foram tratados com 500 mg/kg de extrato de chá verde via intragástrica (gavagem), 5 dias/semana por 12 semanas. A obesidade foi induzida por dieta de cafeteria por 8 semanas. Após as 12 semanas, realizamos a indução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal pela injeção de glicogênio de ostra (1% em PBS) 4 h antes do procedimento de eutanásia por decapitação. As avaliações realizadas foram: capacidades quimiotática e fagocítica, atividade da mieloperoxidase (MPO), geração de ácido hipocloroso (HOCl), ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), liberação de citocinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α , atividade das enzimas antioxidantes e metabólicas e mobilização intracelular de Ca^{2+} . Os resultados obtidos demonstram que o modelo de obesidade causa uma diminuição significativa na capacidade de migração de neutrófilos, na produção de H_2O_2 , atividade da MPO, produção de HOCl, na atividade das enzimas antioxidantes SOD total e Mn e das enzimas metabólicas hexoquinase e G6PDH. Por outro lado a obesidade aumenta significativamente a produção de $O_2^{\bullet-}$, a fagocitose de partículas de zimosan opsonizadas, a mobilização intracelular de cálcio, a liberação de interleucinas TNF- α e IL-1 β e a enzima catalase. A suplementação crônica com o extrato de chá verde em ratos obesos demonstrou ser capaz de aumentar significativamente a quimiotaxia de neutrófilos, a produção de H_2O_2 , HOCl e $O_2^{\bullet-}$, assim como diminuiu a liberação de IL-6, TNF- α e IL-1 β e a enzima catalase, comparado ao grupo obeso. De acordo com estes resultados podemos concluir que o modelo de obesidade promove uma redução nas funções efectoras de neutrófilos o que pode aumentar a susceptibilidade à infecções. O tratamento crônico com extrato do chá verde parece melhorar as funções dessas células em ratos obesos, o que talvez possa ser um indício de que o chá verde possa ser utilizado como um tratamento adjuvante para prevenir o aparecimento de infecções relacionadas a obesidade, ou ao menos para melhora da função imune.

Palavras-chave: Obesidade. Sistema Imune. Neutrófilos. Espécies Reativas de Oxigênio. Catequinas.

ABSTRACT

ALBUQUERQUE, K. F. F. S. **Evaluation of oxidative and inflammatory parameters in neutrophils from obese rats supplemented with green tea extract.** 2014. 95p. Master thesis (Pharmacology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

Obesity is currently one of the most serious public health problems worldwide. The prevalence of this disease has increased in recent decades, both developed and developing countries. Among the medical complications associated with obesity can cite cardiovascular disease, hypertension, dyslipidemia, diabetes, and various cancers types. Deficit in the functions of immune cells, specifically in neutrophils may aggravate these comorbidities, to as well as leads susceptibility to infections. Catechins, the main polyphenolic compounds in green tea (*Camellia sinensis*) have a range of pharmacological actions such as antioxidant/pro-oxidant, antihypertensive, anti-inflammatory, antiproliferative, antithrombogenic, antimutagenic, antidiabetic and reducing lipids. This study aims to evaluate the effects of chronic supplementation with green tea extract on inflammatory markers and neutrophil function of rats with obesity induced by cafeteria diet intake (high calorie). For this study, male Wistar rats (*Rattus norvegicus*) with an initial weight of 150 ± 40 were treated with 500mg/kg of green tea extract intragastric (gavage), 5 days/week for 12 weeks. Obesity was induced by the cafeteria diet for 8 weeks. After 12 weeks, conducted the induction of neutrophil migration into the peritoneal cavity by injection of oyster glycogen (1% in PBS) 4 h before euthanasia by decapitation procedure. Evaluations were: chemotactic and phagocytic capacity, activity of myeloperoxidase (MPO), generation of hypochlorous acid (HOCl), superoxide anion ($O_2^{\cdot-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), release of cytokines IL-1 β , IL-6 and TNF- α , and metabolic activity of antioxidant enzymes and intracellular Ca^{2+} mobilization. The results obtained demonstrate that the model of obesity causes a significant decrease in migration capacity of neutrophils, production of H_2O_2 , MPO activity, HOCl production, the activity of antioxidant enzymes SOD Total and Mn and the metabolic enzymes hexokinase and G6PDH. Moreover obesity significantly increases the $O_2^{\cdot-}$ production, phagocytosis of opsonized zymosan particles, intracellular calcium mobilization, the release of TNF- α and interleukins IL-1 β and the enzyme catalase. Chronic supplementation with green tea extract in obese mice has been shown to significantly increase the neutrophil chemotaxis, H_2O_2 , HOCl and $O_2^{\cdot-}$ production as well as decreased the release of IL-6, TNF- α and IL-1 β and catalase, compared to the obese group. According to these results we conclude that the obesity model promotes a reduction in neutrophil effector functions which may increase susceptibility to infections. Chronic treatment with green tea extract seems to improve the functions of these cells in obese mice, which might be an indication that green tea can be used as an adjuvant treatment to prevent the onset of obesity-related infections, or at least to enhance immune function.

Key-words: Obesity. Immune System. Neutrophil. Reactive Oxygen Species. Catechins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Cascata clássica de recrutamento de neutrófilos.....	19
Figura 2 - Infiltração de células imunes no tecido adiposo.	28
Figura 3 - Planta <i>Camellia sinensis</i>	30
Figura 4 - Estrutura química das principais catequinas do chá verde.	32
Figura 5 - Mecanismo de ação antioxidante dos grupamentos galato encontrado nas catequinas (ressonância).....	35
Figura 6 - Mecanismo de ação pro-oxidante da EGCG (auto-oxidação).	36
Figura 7 - Determinação da (A) tolerância à glicose intraperitoneal (GTT), (B) tolerância à insulina (ITT) e constante de decaimento da glicose (K_{ITT}) nos animais, realizada na 11ª semana de tratamento após 6 h em jejum.	58
Figura 8 - Migração de neutrófilos avaliada pelo ensaio de quimiotaxia.	61
Figura 9 - Avaliação da capacidade fagocítica de neutrófilos desafiados com partículas de zimosan opsonizadas.....	62
Figura 10 - Geração de ERO por neutrófilos pelo uso da sonda DHE.....	63
Figura 11 - Determinação do Estresse Oxidativo em neutrófilos por DCFH-DA.	64
Figura 12 - Atividade da enzima mieloperoxidase em neutrófilos.....	65
Figura 13 - Geração de ácido hipocloroso em neutrófilos.	66
Figura 14 - Mobilização intracelular de cálcio em neutrófilos.	68
Figura 15 - Representação das alterações encontradas no estudo.	79

LISTA DE TABELAS/QUADROS

Tabela 1 - Comparação entre a composição da dieta de cafeteria e a dieta padrão.	42
Tabela 2 - Caracterização do modelo de obesidade induzida por dieta de cafeteria.	60
Tabela 3 - Produção de interleucinas por neutrófilos.	67
Tabela 4 - Atividade máxima de enzimas antioxidantes e metabólicas em neutrófilos.	69
Quadro 1 - Design experimental.....	43
Quadro 2 - Obtenção de neutrófilos.	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ERO	Espécies reativas de oxigênio
GCSF	Fator de estimulação de colônia de granulócitos
IL-17A	Interleucina 17A
LPS	Lipopolissacarídeo
fMLP	formil-metionil-leucil-fenilalanina
PAF	Fator de agregação plaquetária
TLR	Receptores <i>Toll-like</i>
AGL	Ácidos Graxos Livres
PAMP	Padrões moleculares associados a patógeno
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
NF-κB	Fator Nuclear –κB
TLR 4	Receptor <i>Toll-like</i> do tipo 4
TNF-α	Fator de necrose tumoral-alfa
IL-1β	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
NO	Óxido nítrico
GLUT-1	Transportador de glicose 1
G6PDH	Glicose-6-fosfato desidrogenase
fMLPR	Receptor para fMLP
CXCR2	Receptor para IL-8
FcγR	Receptores para fragmento cristalizável da IgG
CR3	Receptor de fragmento C3bi do sistema complemento
Syk	<i>Speen tyrosine kinase</i>
PLC/D	Fosfolipase C / D
IP3	Inositol 1,4,5-trisfosfato
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PKC	Proteína quinase C

ERK	Proteína quinase regulada por sinal extracelular
O₂^{•-}	Ânion superóxido
ONOO⁻	Peroxinitrito
PMA	Forbol meristato acetato
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
SOD	Superóxido dismutase
CAT	Catalase
GPx	Glutathione peroxidase
GSH	Glutathione reduzida
GSSG	Glutathione oxidada
GR	Glutathione reductase
MPO	Mieloperoxidase
IMC	Índice de massa corpórea
DM	Diabete Mellitus
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos
EC	Epicatequina
ECG	Epicatequinagalato
EGC	Epicalocatequina
EGCG	Epicatequinagalato
DP	Dieta padrão
DC	Dieta de cafeteria
CV	Chá verde
GTT	Teste de tolerância à glicose
ITT	Teste de tolerância à insulina
K_{ITT}	Constante de decaimento da glicose
DHE	Dihidroetidina
DCFH-DA	2',7'-Diclorodihidrofluoresceína diacetato
PBS	Tampão fosfato salina
EPM	Erro Padrão da Média

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Sistema imune e neutrófilo	16
1.2 Obesidade e inflamação	24
1.3 Chá verde e suas características	30
2 JUSTIFICATIVA	38
3 OBJETIVO GERAL	40
3.1 Estratégia experimental	40
4 MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1 Animais	41
4.2 Indução da obesidade	41
4.3 Suplementação com extrato de Chá Verde.....	42
4.4 Grupos experimentais	42
4.5 Caracterização da obesidade.....	43
4.5.1 Teste de tolerância à insulina (ITT).....	43
4.5.2 Teste de tolerância à glicose (GTT).....	43
4.5.3 Ganho de peso corporal	44
4.5.4 Peso dos depósitos de gordura e índice de adiposidade	44
4.5.5 Determinações bioquímicas.....	44
4.6 Obtenção dos neutrófilos	44
4.7 Avaliação da migração de neutrófilos pelo ensaio de quimiotaxia	45
4.8 Avaliação da atividade fagocítica	46
4.9 Produção de ERO avaliado pelo ensaio de dihidroetidina (DHE)	46
4.10 Produção de ERO avaliado pelo ensaio de DCFH-DA	47
4.11 Atividade da Enzima Mieloperoxidase (MPO).....	47
4.12 Produção de ácido hipocloroso (HOCl)	48

4.13 Liberação de interleucinas inflamatórias.....	48
4.14 Avaliação da concentração intracelular de cálcio.....	49
4.15 Atividade das enzimas antioxidantes.....	49
4.16 Atividade da Hexoquinase	50
4.17 Atividade da Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH).....	51
4.18 Determinação das proteínas totais nos homogenatos	51
4.19 Análise Estatística	51
5 RESULTADOS	52
5.1 Caracterização da obesidade no modelo utilizado no estudo.....	52
5.1.1 Parâmetros bioquímicos e resistência à insulina	52
5.1.2 Ganho de peso e depósitos de gordura	53
5.2 Parâmetros funcionais de neutrófilos.....	53
5.2.1 Avaliação da migração de neutrófilos	53
5.2.2 Avaliação da capacidade fagocítica.....	54
5.2.3 Produção de ERO avaliada no ensaio de dihidroetidina (DHE)	54
5.2.4 Produção de ERO avaliada no ensaio de DCFH-DA	54
5.2.5 Atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO)	54
5.2.6 Produção de ácido hipocloroso (HOCl) por Neutrófilos.....	55
5.2.7 Liberação de interleucinas pró- e anti-inflamatórias.....	55
5.2.8 Avaliação da mobilização intracelular de Ca^{2+}	56
5.2.9 Atividade das enzimas antioxidantes	56
5.2.10 Atividade das enzimas metabólicas Hexoquinase e G6PDH	57
6 DISCUSSÃO	70
7 CONCLUSÕES	81
REFERÊNCIAS	82

1 INTRODUÇÃO

1.1 Sistema imune e neutrófilo

O sistema imune inato abrange diversos tipos de células com a capacidade de identificar e eliminar uma variedade de microrganismos bem como qualquer tipo de ameaça, visando proteger o organismo e retomar a homeostase. Importantes na manutenção da homeostase, células como leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos), monócitos, células natural killer (NK) e células dendríticas, são ativadas quando microrganismos patogênicos conseguem romper as barreiras naturais de proteção do organismo (CRUZ, 2010).

Os neutrófilos são células dotadas da capacidade de engolfar e fagocitar patógenos, imunocomplexos e restos ou debris celulares, mediados principalmente por espécies reativas de oxigênio (ERO) e enzimas proteolíticas (FUZISSAKI, 2009). Originam-se de células precursoras mielóides, na medula óssea (BORREGAARD, 2010) cuja produção é induzida pelo fator de estimulação de colônia de granulócitos (GCSF) (LIESCHKE et al., 1994), liberado em resposta a interleucina 17A (IL-17A) a partir de células T reguladoras de neutrófilos como as células NK (LEY; SMITH; STARK, 2006). A taxa de produção diária de neutrófilos chega a cerca de 2×10^{11} (BORREGAARD, 2010), com uma média de vida circulante de até 12,5 horas para neutrófilos de rato e de 5,4 dias para neutrófilos humanos (PILLAY et al., 2010).

Abundantes na corrente sanguínea, os neutrófilos constituem cerca de 50 a 70% do total de leucócitos circulantes em humanos, enquanto representam de 10-25% dos leucócitos circulantes em ratos (DOEING; BOROWICZ; CROCKETT, 2003; MESTAS; HUGHES, 2004). Na circulação, os neutrófilos maduros apresentam um diâmetro médio de 7-10 μM , com núcleo segmentado e citoplasma enriquecido com grânulos e vesículas secretoras (BORREGAARD, 2010; KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013). Estas células são recrutadas para os sítios de lesão por sinais quimiotáticos de quimiocinas, citocinas, metaloproteinases da matriz extracelular, produtos oriundos de microrganismos invasores, entre outros (KOBAYASHI; VOYICH; DELEO, 2003). Devido às suas habilidades específicas como aderência ao endotélio vascular, quimiotaxia ao sítio inflamatório, fagocitose, desgranulação e morte dos microrganismos, são consideradas células da primeira linha de defesa do

organismo (HARTL et al., 2008; HENSON, 2005; LUO; LOISON, 2008; ZHONG et al., 2003).

Já é bem descrito que os neutrófilos possuem três estados de ativação: quiescente, *primed* e ativado. Eles diferem por características distintas que afetam a natureza e a magnitude da resposta dos neutrófilos (HALLETT; LLOYDS, 1995). Nos indivíduos saudáveis, os neutrófilos circulantes apresentam-se no estado quiescente, ou seja, são células circulantes livres, com morfologia redonda, não são aderentes e possuem membrana com poucas projeções (SHEPPARD et al., 2005).

A ativação de neutrófilos refere-se a processos que levam a alterações conhecidas, isto é, processos mensuráveis. Originalmente, este se refere às respostas efetoras como o *burst* oxidativo, mas foi ampliado para se referir a mudanças na morfologia celular e alterações bioquímicas, como aumento no cálcio intracelular (DOWNEY et al., 1995).

Em contraste, neutrófilos "*primed*" são células que passaram por um processo em que foram previamente expostas a um estímulo (*priming*) sendo, agora denominadas de *primed* e, como consequência, a resposta destas células a um estímulo subsequente é amplificada fortemente. Em outras palavras, um estímulo *priming* por si só não inicia as funções efetoras destas células. Por exemplo, a exposição prévia dos neutrófilos a concentrações de lipopolissacarídeo (LPS) não induz o *burst* oxidativo, mas irá potencializar grandemente o *burst* oxidativo em resposta a uma segunda exposição ou a um estímulo secundário como o formil-metionil-leucil-fenilalanina (fMLP), fragmentos do sistema complemento C5a, C3b ou o fator de agregação plaquetária (PAF) (DOWNEY et al., 1995). McPhail, Clayton e Snyderman (1984) foram os primeiros a descrever os neutrófilos *primed* como sendo células que quando expostas a um agonista primário, tipicamente a uma concentração sub-estimulante, pode influenciar/aumentar a produção de superóxido provocada por um segundo estímulo. Muitos destes agentes *priming* são agonistas dos receptores Toll-like (TLR), sendo, portanto, componentes críticos no processo de *priming* mediada por patógenos ou ácidos graxos livres (AGL) (KOBAYASHI et al., 2005).

Receptores TLR exibem um papel crucial na detecção de infecções microbianas e na indução da resposta inflamatória e imune contra estruturas microbianas conservadas, chamadas padrões moleculares associados a patógeno (PAMP) (MEDZHITOV; JANEWAY, 2000). A família dos TLR, também é

sensibilizada por sinais nutricionais, tais como ácidos graxos livres (TORNATORE et al., 2012). A interação dessas moléculas com o TLR desencadeia a ativação da transdução de vias de sinalização, tais como a *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) e a via do fator nuclear κ B (NF- κ B), resultando na ativação das células imunes. Isto por sua vez, origina a produção de citocinas pro-inflamatórias e promove a indução da função efetora antimicrobica (FERWERDA et al., 2008).

Os TLR ativam a via de sinalização intracelular através dos domínios extracelulares Toll/IL-1R e homólogo intracelular (TIR). A ativação da sinalização através do domínio TIR, resulta no recrutamento de moléculas adaptadoras e, finalmente, conduz à degradação de I κ B e translocação de NF- κ B para o núcleo (TAKEDA; AKIRA, 2005). O LPS, um componente importante da membrana externa das bactérias gram-negativas, é um dos mais poderosos ativadores da sinalização do TLR do tipo 4 (TLR 4) e induz a produção de mediadores inflamatórios, tais como fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α), interleucina-1 beta (IL-1 β), interleucina-6 (IL-6) e óxido nítrico (NO), pela ativação da via de sinalização MAPK/NF- κ B, que leva à morte por choque endotóxico em modelos animais (COHEN, 2002; TAKEUCHI; AKIRA, 2001).

Além dessas funções relacionadas à defesa contra patógenos, os TLR também estão relacionados com as funções metabólicas das células. A ativação desses receptores pode aumentar a captação de glicose por neutrófilos através do aumento de transportador de glicose 1 (GLUT-1) presentes na membrana de neutrófilos, via a ativação do fator de transcrição HIF-1 α (SCHUSTER et al., 2007), favorecendo a maior produção de energia em neutrófilos pela via glicolítica, uma vez que a glicose é o substrato preferido para neutrófilos (PITHON-CURI; DE MELO; CURI, 2004). Depois que a glicose é transportada para dentro das células, sofre fosforilação pelas enzimas hexoquinase / glicoquinase (KLETZIEN; HARRIS; FOELLMI, 1994). A glicose-6-fosfato (G6P), produto da fosforilação pela hexoquinase, pode ser utilizada na glicólise para produção de energia na forma de ATP e NADH ou utilizada pela via das pentoses, gerando ribose 5-fosfato para a síntese de ácidos nucleicos (STANTON, 2012) sendo oxidada a 6-fosfoglucoactona pela enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH), produzindo NADPH pela redução do NADP⁺ (HO; CHENG; CHIU, 2007).

Como já mencionado os neutrófilos são as primeiras células a alcançar o sítio inflamatório. Para exercer suas funções, estas células necessitam realizar a

diapedese, que é o extravazamento da célula a partir do sangue para o tecido, que envolve múltiplas etapas como a interação às células endoteliais, mediado por moléculas do tipo L-selectinas, passando por *rolling* pela adesão, através de moléculas de adesão do tipo ICAM-1/VCAM; *crawling* para transmigração e quimiotaxia (migração ao foco inflamatório), seguindo o gradiente quimiotático, através de receptores para agentes quimioatraentes como o fMLPR para fMLP e CXCR2 para seus ligantes como interleucina-8 (IL-8) (PHILLIPSON, M.; KUBES, P., 2011) (**Figura 1**).

Figura 1 - Cascata clássica de recrutamento de neutrófilos. Retirada de Kolaczowska e Kubes (2013).

Para que a fagocitose ocorra há inicialmente a migração da célula em direção ao agente invasor e posteriormente o reconhecimento da partícula ou microrganismo a ser ingerido, o que ocorre via receptores de membrana. Os neutrófilos expressam outros receptores além do TLR que atuam no reconhecimento e engolfamento de patógenos, como o receptor de manose, receptores *scavenger*, receptores para o fragmento cristalizável de imunoglobulinas (FcR) e receptores para proteína do sistema complemento (CR). Os FcR para imunoglobulina de classe G (IgG), os FcγR e os CR são os dois principais grupos envolvidos na ativação de neutrófilos no sítio de inflamação (JAKUS et al., 2009). A estimulação e cooperação funcional destes receptores desencadeia a fagocitose, liberação de mediadores inflamatórios e a geração de ERO (HIRAHASHI et al., 2006; PRICOP et al., 1999).

O sistema complemento é essencial para a resposta imune inata; dentre suas funções está a eliminação de imunocomplexos (IC) e a fagocitose. Os receptores do

complemento CR1 (CD35) e CR3 (CD11b/CD18) medeiam a fagocitose dos agentes patogênicos (SMITH et al., 1990; UNDERHILL; OZINSKY, 2002). Ambos os receptores, associam-se com fragmentos C3b/C3bi do sistema complemento, e estão expressos nos neutrófilos, sendo que o CR3 representa um importante ligante para C3bi nestas células. Sendo assim, a expressão do CR3 facilita a fagocitose de partículas opsonizadas com C3bi e o recrutamento de neutrófilos ao sítio da inflamação (ROSS, 2002).

Já os receptores Fc gama (FcγR) são glicoproteínas de membrana que diferem quanto a sua distribuição celular, função e afinidade por isotipos de IgG. Estes receptores reconhecem a porção Fc da IgG (DAERON, 1997; SCHMIDT; GESSNER, 2005). A ativação simultânea do FcγR e CR3 leva ao *burst* respiratório em neutrófilos, devido ao *cross-linking* entre os receptores, ocorrendo associação ao citoesqueleto (ZHOU; BROWN, 1994). A proteína tirosina quinase Syk (speen tyrosine kinase) é uma proteína sinalizadora envolvida no processo de fagocitose por neutrófilo mediado por receptores CR3 (SHI et al., 2006) e FcγR (RIVAS-FUENTES et al., 2010). Estudos mostram que os receptores Fcγ e CR ativam a fosfolipase C (PLC) e a fosfolipase D (PLD) através da Syk, resultando na mobilização intracelular de Ca^{2+} (NUNES; DEMAUREX, 2010).

Fisiologicamente, o cálcio é liberado do lúmen do retículo endoplasmático (RE) para o citoplasma quando há a ativação de receptores capazes de ativar a PLC e a produção do segundo mensageiro inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3). O IP3 liga-se a receptores de IP3 na membrana do RE e ativa a liberação de cálcio (BERRIDGE, 1993). Essa elevação ou oscilação citosólica de Ca^{2+} é necessária para a ingestão eficiente de partículas estranhas por parte de alguns, mas não todos, os receptores fagocíticos (NUNES; DEMAUREX, 2010). A fagocitose mediada por FcγR é regulada através de uma via de sinalização dependente da fosfatidilinositol-3-quinase (PI3K) (COX et al., 1999; GARCIA-GARCIA; ROSALES; ROSALES, 2002), proteína quinase C (PKC) (BRETON; DESCOTEAUX, 2000; KARIMI; GEMMILL; LENNARTZ, 1999), proteína quinase regulada por sinal extracelular (ERK), MAPK p38 (GARCIA-GARCIA; SANCHEZ-MEJORADA; ROSALES, 2001; MANSFIELD; SHAYMAN; BOXER, 2000; RAEDER et al., 1999) e Rac (CARON; HALL, 1998), podendo também prosseguir de forma independente de alterações na concentração intracelular de cálcio (EDBERG et al., 1995; MYERS; SWANSON, 2002).

Após o reconhecimento do antígeno por receptores que medeiam a fagocitose, há a internalização e formação de uma vesícula fagocítica. O

processamento deste material ocorre através da formação de um fagolisossomo, ou seja, a união da vesícula fagocítica a um lisossomo carregado de enzimas proteolíticas (ADAMS; HAMILTON, 1984). Em neutrófilos o íon Ca^{2+} é importante para um controle rigoroso dos passos subsequentes envolvidos na maturação dos fagossomos, sendo também necessário para a polimerização da malha de actina que rodeia fagossomos nascentes, para a fusão de fagossomos com grânulos contendo as enzimas líticas e para a montagem e a ativação do complexo NADPH-oxidase (NUNES; DEMAUREX, 2010).

A NADPH oxidase compreende uma família de enzimas denominadas Nox, sendo uma importante fonte geradora de ERO, pois apresenta um centro redutor que transfere elétrons do doador NADPH para o oxigênio molecular, levando à geração de radical anion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) no espaço extracelular ou fagossomal (DAHLGREN; KARLSSON, 1999; EL-BENNA; DANG; GOUGEROT-POCIDALO, 2008; ROOS; VAN BRUGGEN; MEISCHL, 2003; SHEPPARD et al., 2005). A estrutura e função da Nox foi primeiramente descrita e caracterizada em neutrófilos (BABIOR, 1999).

A NADPH-oxidase em neutrófilos humanos é constituída de uma porção ligada à membrana, o flavocitocromo b558 (composta pelas subunidades p22phox e gp91phox/NOX2) e pelas subunidades citosólicas: p47phox, p67phox, p40phox e uma proteína G, Rac1 ou Rac2. A ativação da NADPH oxidase é iniciada a partir de dois mecanismos simultâneos: a fosforilação da subunidade p47phox em múltiplos sítios e a ativação da GTPase Rac2, seguida pela migração de componentes citosólicos para a membrana onde se associam com os componentes ligados à membrana para formar a oxidase cataliticamente ativa (EL-BENNA et al., 2005; EL-BENNA et al., 2009). A fosforilação de p47phox coordena a migração dos outros componentes citosólicos para a membrana, com exceção da Rac, que só quando acoplada a oxidase é capaz de efetuar a transferência de elétrons (BABIOR, 2004).

Este complexo pode ser estimulado por peptídeos bacterianos como o fMLP e o ativador farmacológico da PKC, forbol meristato acetato (PMA), induzindo a fosforilação de várias serinas e consequentemente a ativação da NADPH-oxidase (EL-BENNA; DANG; GOUGEROT-POCIDALO, 2008). Além desses estímulos capazes de ativar o complexo enzimático NADPH-oxidase para a produção de $\text{O}_2^{\cdot-}$, outros estímulos também podem levar a ativação deste complexo em fagócitos podendo-se citar algumas citocinas como o GM-CSF, TNF- α e IL-8, porém em menor grau (EL-BENNA; DANG; GOUGEROT-POCIDALO, 2008). Bactérias e

leveduras opsonizadas, que atuam através da porção C3b e, possivelmente, a porção C5a, provenientes da ativação da via do complemento também estimulam a NADPH-oxidase (CHRISTOPHE et al., 2000; HOOGERWERF et al., 1990).

Durante o *burst* oxidativo desencadeado no processo inflamatório, as células do sistema imunológico produzem além do $O_2^{\cdot-}$ também o óxido nítrico. Sob estas condições, o óxido nítrico e o ânion superóxido podem reagir entre si para produzir quantidades significativas de uma molécula oxidativa muito mais ativa, o peroxinitrito ($ONOO^-$), um potente agente oxidante que pode causar fragmentação do DNA e oxidação lipídica e proteica (CARR; MCCALL; FREI, 2000).

As células mostram um amplo leque de respostas após a exposição à ERO, que vão desde uma maior taxa proliferativa, à prevenção da divisão celular, senescência, necrose ou apoptose (TANG et al., 2004). Outra espécie não radicalar gerada é o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), formada a partir da dismutação do $O_2^{\cdot-}$, processo que pode ocorrer de forma espontânea ou ser catalisado pela enzima superóxido dismutase (SOD) que dismuta o $O_2^{\cdot-}$ em O_2 e H_2O . A SOD é capaz de iniciar o processo de defesa endógena contra o ataque de ERO, impedindo a etapa de iniciação da cadeia radicalar, podendo ser encontrada em mamíferos sob três isoformas: a SOD-CuZn, presente no citosol, a SOD-Mn, localizada na mitocôndria e a SOD-EC que é uma forma extracelular (EC) da enzima e está em equilíbrio entre o plasma e a superfície das células endoteliais (STOCKER; KEANEY, 2004).

O H_2O_2 apresenta característica lipofílica, podendo atravessar membranas celulares e atuar em locais distantes da sua fonte geradora, diferentemente do $O_2^{\cdot-}$, porém ambos apresentam meia vida média suficiente para exercer seus papéis na sinalização redox (GUZIK; HARRISON, 2006). Esta espécie pode ser degradada em O_2 e H_2O pela enzima catalase (CAT), uma hemoproteína citoplasmática muito importante no processo de manutenção da homeostase, encontrada no sangue, medula óssea, mucosas, rim e fígado (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Além da CAT, outra enzima antioxidante, a glutathiona peroxidase (GPx) catalisa a redução do H_2O_2 e peróxidos orgânicos em seus correspondentes alcoóis através da conversão da glutathiona reduzida (GSH) para glutathiona oxidada (GSSG), utilizando como co-fator NADPH (SHAN; AW; JONES, 1990). A GPx por ser uma metaloenzima, é dependente do mineral selênio para sua perfeita atividade (JEROME-MORAIS et al., 2013). A GPx é considerada a enzima mais sensível a baixas concentrações de H_2O_2 , e está inter-relacionada à atividade da G6PDH

sendo portando documentada na literatura, como a primeira fonte de defesa celular contra o (BEZERRA et al., 2010). Após o processo de exposição da GSH ao agente oxidante e a sua devida oxidação à GSSG, uma outra enzima entra em atividade, a glutathione redutase (GR), para promover a restauração da GSH com auxílio do co-fator NADPH. Esta etapa é essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular (GILBERT, 1990). Como visto a integridade da via das pentoses, exerce um papel essencial na regulação e perfeito funcionamento das defesas antioxidantes do organismo, e uma diminuição do fornecimento de NADPH, pode comprometer esse sistema, assim como a atividade da NADPH-oxidase.

Para matar organismos que são muito grandes para serem fagocitados, os fagócitos atacam o agente agressor e secretam substâncias microbidas principalmente oriundas do metabolismo do oxigênio. Neutrófilos possuem grânulos e vesículas em seu citoplasma, formados durante a sua maturação, sendo um reservatório de proteínas com ação microbicida. Os grânulos dos neutrófilos são classificados em três subtipos distintos: azurófilos ou primários, secundários e terciários. Os grânulos azurófilos formados nos pró-mielócitos, contém uma grande quantidade de mieloperoxidase (MPO), proteínas catiônicas de baixo peso molecular, hidrolases ácidas e proteases neutras e componentes da NADPH oxidase. Podem liberar seu conteúdo no fagossomo ou no meio extracelular. Estes mecanismos envolvem uma sequência de eventos, importante para uma resposta inflamatória eficaz (FAURSCHOU; BORREGAARD, 2003). A liberação da MPO dos grânulos azurófilos dos neutrófilos, após a sua ativação, exibe um papel importante na atividade microbicida dessa célula fagocítica (HAMPTON; KETTLE; WINTERBOURN, 1998; KLEBANOFF et al., 2013). Esta enzima cataliza a formação do ácido hipocloroso (HOCl) a partir do cloreto (Cl^-) e H_2O_2 . Este, por sua vez, também oxida uma grande quantidade de substratos para seus radicais correspondentes (KETTLE; VAN DALEN; WINTERBOURN, 1997). O HOCl apresenta várias ações sendo a ação bactericida e fungicida as de maior destaque (HURST, 2012; KLEBANOFF, 2005). Embora o objetivo destes processos seja destruir patógenos invasores, os oxidantes gerados excessivamente por neutrófilos, também podem danificar sua estrutura celular levando à disfunção das células ou até mesmo apoptose (MARTINDALE; HOLBROOK, 2002).

1.2 Obesidade e inflamação

A obesidade é considerada um importante problema de saúde pública sendo classificada hoje como uma epidemia global. Do ponto de vista clínico, pode-se definir obesidade como uma condição de elevado peso corporal, principalmente de gordura, de magnitude suficiente para produzir consequências adversas à saúde (KOPELMAN, 2000). A obesidade é considerada uma doença integrante do grupo de Doenças Crônicas Não-Transmissíveis (DCNT), as quais são de difícil conceituação, gerando aspectos polêmicos quanto à sua própria denominação, seja como doença não-infecciosa, doença crônico-degenerativa ou como doença crônica não-transmissível, sendo esta última a conceituação atualmente mais utilizada (PINHEIRO; FREITAS; CORSO, 2004). Ela pode ser descrita como a “Nova Síndrome Mundial”, sendo uma condição complexa, com dimensões sociais e psicológicas sérias, afetando indivíduos de todas as idades e grupos socioeconômicos, porém o grupo de baixo nível socioeconômico é o mais sujeito aos prejuízos à saúde (BURKERT et al., 2013; NAMMI et al., 2004).

Mundialmente, cerca de 1,2 bilhões de pessoas apresentam sobrepeso, enquanto 475 milhões são obesas (IOTF, 2010). No Brasil, dados do Ministério da Saúde apontaram que no ano de 2012 cerca de 17% da população era obesa e 51% apresentava excesso de peso, mostrando uma grande progressão desta doença comparado ao ano de 2006, onde estes números eram 11,6% e 43,2%, respectivamente (VIGITEL, 2012). Estudos clínicos e populacionais utilizam o índice de massa corpórea (IMC, Kg/m^2) para avaliar a quantidade total de gordura corporal ou a prevalência da obesidade (WILKINSON et al., 2007). O IMC é uma medida de adiposidade útil, porém imprecisa. Adultos com um IMC ≥ 30 são classificados como obesos, enquanto que aqueles com IMC de 25-30 são classificados como sobrepeso (WHO, 2000).

A obesidade também pode ser caracterizada por gerar prejuízo na homeostase do organismo, estando associada com o aumento substancial da morbidade, mortalidade prematura, redução da qualidade de vida e altos custos com cuidados à saúde (FONTAINE et al., 2003; HASLAM; JAMES, 2005; KOPELMAN, 2000). As maiores comorbidades incluem DM tipo 2 (KAHN; HULL; UTZSCHNEIDER, 2006; RICHARDSON; SMITH; CARTER, 2013), hipertensão (KURUKULASURIYA et al., 2011), dislipidemia, doenças cardiovasculares (LOGUE

et al., 2011; MATSUZAWA; FUNAHASHI; NAKAMURA, 2011; NANCHAHAL et al., 2005), certos tipos de câncer (VUCENIK; STAINS, 2012), esteatose hepática, cálculos na vesícula biliar e osteoartrite (KOPELMAN; JEBB; BUTLAND, 2007; SHOELSON; HERRERO; NAAZ, 2007) dentre outras como a síndrome metabólica, alterações menstruais, esterilidade, apnéia do sono e alterações psicológicas (FLEGAL et al., 2007; MUNOZ; MAZURE; CULEBRAS, 2004).

A maioria dos indivíduos obesos apresenta um estado de desregulação metabólica caracterizada pelo aumento da circunferência abdominal, resistência à insulina, hiperglicemia, hipertensão e hipertrigliceridemia (ERVIN, 2009). Isso se deve ao excesso de nutriente ingerido que é armazenado como triglicérides, principalmente no tecido adiposo, mas também em outros tecidos. Além dos efeitos benéficos do armazenamento de nutrientes, no entanto, em longo prazo o armazenamento de quantidades excessivas de lipídios pode ter um impacto negativo na saúde, especialmente em condições de maior longevidade e diminuição da atividade física (SHOELSON; HERRERO; NAAZ, 2007).

Atualmente sabe-se que o tecido adiposo além das muitas funções já conhecidas, tais como termorregulação, proteção corporal contra choques mecânicos, reserva energética e de vitaminas lipossolúveis, possui uma importante função endócrina devido à capacidade dos adipócitos de secretarem uma variedade de substâncias com funções disseminadas em todo o organismo, como a leptina, adiponectina, resistina e marcadores/mediadores inflamatórios como o TNF- α , IL-6, IL-8 e proteínas de fase aguda como a proteína quimiotática de monócitos (MCP-1) (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993; SUGANAMI; NISHIDA; OGAWA, 2005; VÁZQUEZ-VELA; TORRES; TOVAR, 2008).

Sabe-se que a resposta imune inata pode ser desencadeada não apenas a partir de estímulos infecciosos, mas também a partir de estímulos endógenos. Além da grande variedade de mediadores inflamatórios liberados pelos adipócitos e o aumento de AGL circulantes, muitos dos principais reguladores do metabolismo também desempenham papel crítico na regulação da resposta inflamatória. O receptor X do fígado (LXR – *Liver X Receptor*) é um exemplo, pois exibe um duplo controle, no metabolismo lipídico e na inflamação, além de estar estreitamente relacionado com a produção de neutrófilos pela medula óssea (HONG et al., 2012; HONG et al., 2011).

O papel dos neutrófilos na inflamação induzida pela condição de obesidade ainda não está muito bem compreendido. Foi demonstrada a ocorrência de neutrofilia em crianças (a partir dos 3 anos de idade) e adultos obesos, e isto parece estar correlacionado com a presença de concentrações de mediadores inflamatórios (HERISHANU et al., 2006; SKINNER et al., 2010; ZALDIVAR et al., 2006). Além disso, a contagem dos neutrófilos está associada com o IMC, circunferência abdominal e com o tecido adiposo total de obesos adolescentes do gênero feminino (KIM; PARK, 2008).

A obesidade está associada hoje a um estado de inflamação de baixo grau crônico (latente) e também se destaca pelo aumento da quimiotaxia de células imunes para o tecido adiposo (HARVEY; LASHINGER; HURSTING, 2011; OLEFSKY; GLASS, 2010). Muitos trabalhos mostram a grande relação entre o tecido adiposo e as células do sistema imune (**Figura 2**). Tem-se mostrado que o tecido adiposo branco de modelos animais e humanos obesos está infiltrado por células do sistema imune. Na obesidade há a infiltração de células com perfil pró-inflamatório, como células TCD4⁺ e TCD8⁺, células Th1, NK e granulócitos como os mastócitos e basófilos. A elevação de citocinas como o TNF- α e IL-1 β , MCP-1, o aumento de AGL e a liberação de ERO contribuem para o microambiente pró-inflamatório da obesidade, favorecendo a infiltração de células imunes no tecido adiposo (JOHNSON; MILNER; MAKOWSKI, 2012).

Esta infiltração parece ser uma causa importante para a resistência à insulina associada à obesidade. Macrófagos do fenótipo 'M1' se infiltram no tecido adiposo na condição de obesidade e o grau de infiltração destas células correlaciona-se com o índice de massa corporal e o tamanho médio dos adipócitos. Estes eventos medeiam a resistência à insulina através da sensibilização de TLR4 por AGL oriundos do tecido adiposo, liberando mediadores inflamatórios (NGUYEN et al., 2007). Diversos trabalhos mostram que a expressão de mediadores inflamatórios em resposta à agonistas de TLR4 podem interromper a sinalização da insulina através de diversos mecanismos, promovendo a ativação de moléculas, especialmente a IKK e JNK, capazes de fosforilar moléculas em resíduos de serina em proteínas como o IRS-1 e IRS-2, inibindo a sinalização da insulina e levando a um quadro de resistência a insulina ou até ao desenvolvimento de DM tipo 2 (HOWARD; FLIER, 2006; PAULI et al., 2009).

Embora esta infiltração tenha sido mais caracterizada em modelos de obesidade, sabe-se que em períodos de jejum de curto prazo, os macrófagos também são rapidamente recrutados para o tecido adiposo e fornecem sinais que inibem a lipólise e melhoram o armazenamento de nutrientes (KOSTELI et al., 2010). Em condições saudáveis, ocorre a repressão da lipólise mediada pela insulina, ausência de inflamação e níveis fisiológicos de AGL, glicose e ERO. No tecido adiposo de indivíduos magros, os macrófagos com caráter antiinflamatório, conhecidos como tendo fenótipo 'M2', estão presente em maior número. Estas células são residentes e o seu fenótipo é mantido pela presença de células T-reguladoras (Treg), linfócitos Th2 e eosinófilos. Ainda há a secreção de adipocinas como a adiponectina, IL-4 e IL-10, que atuam de modo a manter a sensibilidade à insulina (JOHNSON; MILNER; MAKOWSKI, 2012) (**Figura 2**).

Há evidências de que os neutrófilos também são encontrados infiltrados no tecido adiposo na condição de obesidade. Estudos recentes mostram que após três dias da ingestão de uma dieta hiperlipídica, se observa uma grande porcentagem de neutrófilos infiltrados no tecido adiposo de camundongos e ratos. Considerando que os neutrófilos são células que participam da primeira linha de defesa do organismo e são as primeiras células a serem recrutadas para o sítio inflamatório, os neutrófilos podem ser participantes ativos no recrutamento de outras células imunes, inclusive de macrófagos, o que acaba por conduzir a inflamação induzida pela obesidade e resistência à insulina (ELGAZAR-CARMON et al., 2008; TALUKDAR et al., 2012). Esta evidência mostra o papel importante dos neutrófilos, contribuindo talvez na patogênese da obesidade.

A resposta imunológica frente a agressões agudas e crônicas na obesidade é afetada por alterações nas concentrações de mediadores inflamatórios, de populações linfocitárias, de células fagocitárias, de células apresentadoras de antígenos, pela ativação do sistema de complemento, dentre outras. Portanto a suscetibilidade de adquirir infecções, a capacidade de combatê-las e a possibilidade de desenvolver doenças crônicas inflamatórias, estão elevadas nos indivíduos obesos (GUIMARÃES, 2012).

Figura 2 - Infiltração de células imunes no tecido adiposo. Retirada de Johnson, Milner e Makowski (2012)

Estudos com neutrófilos de pacientes portadores de obesidade mórbida mostraram um aumento da resposta à endotoxinas em baixa dose, com concomitante redução da apoptose e extensão de sua meia-vida em comparação com indivíduos magros, o que sugere possível hiperresponsividade desses neutrófilos (TROTTIER et al., 2012). Também já foi relatado um déficit funcional em neutrófilos de indivíduos obesos incluindo reduzida atividade bactericida destas células (PALMBLAD; HALLBERG; ENGSTEDT, 1980).

Na medida em que as células do tecido adiposo aumentam em tamanho e/ou número, trazem consequências prejudiciais à saúde. Algumas das moléculas secretadas estão ativamente implicadas na regulação da função imune. Uma delas é a leptina, que é secretada de forma proporcional à quantidade de massa adiposa. A leptina além de exercer suas ações hipotalâmicas em neurônios NPY/AgRP e POMC no núcleo arqueado (ARC) para o controle homeostático a longo prazo (SAHU, 2003) da ingestão e da reserva de energia, também está envolvida na deficiência da resposta imune humoral e celular observada em obesos (OTERO et al., 2005). Na forma mais comum de obesidade em geral ocorre hiperleptinemia, associada a uma resistência central e periférica à leptina, com prejuízos na

resposta imune. Este quadro de hiperleptinemia, em geral causa uma ativação das células do sistema imune, estimulando a liberação de citocinas pró-inflamatórias. Desta forma, podemos considerar que a leptina é uma adipocina pró-inflamatória sendo capaz de desencadear a ativação de células imunes, através da estimulação de receptores de leptina presentes nessas células, incluindo neutrófilos (MUNOZ; MAZURE; CULEBRAS, 2004; OTERO et al., 2005; SANCHEZ-MARGALET et al., 2003).

Nos neutrófilos a leptina influencia a expressão de CD11b, um componente essencial da ativação dessas células (MOORE et al., 2003; MUNOZ; MAZURE; CULEBRAS, 2004; ZARKESH-ESFAHANI et al., 2004), que por sua vez, pode facilitar a interação dos neutrófilos com os adipócitos, uma vez que esta interação é mediada por CD11b presente na superfície de neutrófilos e a molécula ICAM-1 presente na membrana dos adipócitos (ELGAZAR-CARMON et al., 2008). Tais alterações mediadas pela leptina observadas em neutrófilos não ocorrem em concentrações fisiológicas desta adipocina, apenas em altas concentrações como encontrada na obesidade (KAMP et al., 2013).

Além disso, em outros estudos é descrito um aumento da expressão de outras moléculas aderentes e de superfície como a molécula de adesão CD62L e receptor de morte CD95 (Fas ligante) em neutrófilos de indivíduos obesos (COTTAM et al., 2002; COTTAM et al., 2003). De fato, os neutrófilos apresentam-se alterados pelo estado de obesidade, e este cenário pode contribuir para o aparecimento de comorbidades associadas a esta doença e/ou na progressão das já existentes como a aterosclerose, doenças microvasculares e neuropatologias (NOELS; WEBER, 2011; RUMMEL et al., 2010; SEITZ et al., 2010).

1.3 Chá verde e suas características

Desde a antiguidade as plantas têm sido utilizadas como medicamentos na prevenção, no tratamento e na cura de distúrbios, disfunções ou doenças em homens e animais. O chá verde é produzido a partir da planta *Camellia sinensis*, uma planta cultivada no oeste da China há quase 2000 anos (**Figura 3**) (COOPER, 2012). O chá é consumido principalmente nos países Asiáticos, aonde seu significado vai além de uma simples bebida, é sinônimo de prosperidade, harmonia, beleza e seu consumo torna-se um ritual de grande importância social e cultural (CLARKE, 2007; RATES, 2001).

Figura 3 - Planta *Camellia sinensis*.

A composição das folhas do chá depende de uma variedade de fatores, incluindo clima, estação do ano, processo utilizado na horticultura, além do tipo e idade da planta. O chá feito a partir de folhas processadas de *Camellia sinensis* é consumido em diferentes partes do mundo e pode ser diferenciado em três tipos que diferem entre si pelo grau de inativação das enzimas foliares durante o processamento (GRAHAM, 1992). Dependendo do nível de fermentação ou oxidação que as folhas da *Camellia sinensis* sofrem, podem dar origem a pelo menos 3 tipos de: chá verde, o qual não sofre fermentação durante o processamento das folhas e deste modo retém a cor original de suas folhas, além do conteúdo bioativo ser preservado, sendo amplamente consumido em países da Ásia; o chá *oolong* o qual é parcialmente fermentado, resultando em um chá com coloração um pouco mais escura, tendo sua produção e o consumo

acentuados na China; e o chá preto, cujo processo de fermentação é maior do que o do chá *oolong*, com posterior secagem das folhas, contribuindo assim para uma coloração escurecida, além de lhe conferir sabor característico. Este tipo de chá é mais popular na América do Norte e Europa (LAMARÃO; FIALHO, 2009).

A composição química do chá verde é complexa; as proteínas perfazem de 15-20% do peso seco, sendo que as enzimas constituem uma fração importante; os aminoácidos correspondem de 1 - 4% do peso seco, entre eles a teanina ou 5-N-etilglutamina, ácido glutâmico, triptofano, glicina, serina, ácido aspártico, tirosina, valina, leucina, treonina, arginina e lisina são os mais abundantes; os carboidratos representam 5 - 7% do peso seco do extrato, sendo os principais a celulose, pectinas, glicose, frutose e sacarose; os minerais e oligoelementos (5% peso seco) como cálcio, magnésio, cromo, ferro, manganês, cobre, zinco, molibdênio, selênio, sódio, fósforo, cobalto, estrôncio, níquel, potássio, flúor, alumínio e vestígios de lipídios (ácidos linoléico e α -linolênico), esteróis (estigmasterol), vitaminas (B, C, E), cafeína, teofilina, pigmentos (clorofila, carotenóides), e compostos voláteis (aldeídos, álcoois, ésteres, lactonas, hidrocarbonetos). O chá verde ainda possui polifenóis, que incluem os flavanóis, flavandióis, flavonóides e ácidos fenólicos, como o ácido gálico. Estes compostos podem ser responsáveis por até 30% do peso seco do extrato de chá verde e contribuem para o sabor, o aroma e a coloração dos vegetais em geral (CHACKO et al., 2010; SCHMIDT et al., 2005).

Os polifenóis apresentam uma estrutura contendo mais de um anel aromático com pelo menos um grupo hidroxila ligado em cada anel. Estão distribuídos amplamente no reino vegetal, porém os animais são praticamente incapazes de sintetizar o anel aromático. São derivados metabolicamente do ácido chiquímico e fenilpropanóides (ROBARDS et al., 1999). Nas plantas, encontram-se armazenados nos vacúolos, no estado reduzido ou frequentemente como heterosídeos, que não são tóxicos às plantas (BECKMAN, 2000). Dentre os polifenóis presentes no chá verde se destacam os flavonóides, e dentre estes, predominam as catequinas (MUKHTAR; AHMAD, 2000). As catequinas possuem, portanto, como característica anéis aromáticos e grupamentos hidroxila. As catequinas e epicatequinas são constituídas por um anel de benzeno (A) condensado com um anel pirano (C). Na posição 2 do anel (C) existe um anel benzênico como substituinte (B), contendo hidroxilas. Essas estruturas ainda

podem ser esterificadas com o ácido gálico na posição 3 do anel C, originando epicatequina-3-galato e a epigalocatequina 3-galato (AHERNE; O'BRIEN, 2002).

As catequinas e as epicatequinas estão presentes em diversos alimentos, enquanto os galatos e galatocatequinas estão presentes exclusivamente em chás, especialmente no chá verde. Existem quatro principais catequinas encontradas no chá verde: epicatequina (EC), epigalocatequina (EGC), epicatequina-3-galato (ECG) e a epigalocatequina 3-galato (EGCG) (**Figura 4**), esta última representando cerca de 50% a 80% dos polifenóis antioxidantes totais do chá verde (BODE; DONG, 2009; SANO et al., 2001).

Figura 4 - Estrutura química das principais catequinas do chá verde.

O consumo de chá verde ou seu extrato é considerado seguro, já que nenhum efeito colateral significativo foi observado diante de vários ensaios clínicos realizados (CHOW et al., 2003). Recentemente, o chá verde tem atraído grande atenção por seus efeitos benéficos para a saúde humana. As catequinas do chá

verde têm apresentado várias ações farmacológicas, como efeitos antihipertensivos, hipocolesterolêmico, anti-angiogênico e antitumoral, além de modulador da resposta de células tumorais (IHM et al., 2012; KIM et al., 2012; LECUMBERRI et al., 2013; SINGH; SHANKAR; SRIVASTAVA, 2011). O consumo de chá verde tem sido proposto também para o tratamento da obesidade por apresentar correlação inversa entre obesidade generalizada, obesidade abdominal, morbidade e mortalidade cardiovascular e risco de câncer, promovendo respectivamente, uma diminuição de gordura corporal, inibindo a adipogênese e promovendo a apoptose de adipócitos (LIN; DELLA-FERA; BAILE, 2005).

Além disso, os flavonóides do chá verde podem atuar aumentando a termogênese e a oxidação de gordura, através da modulação da noradrenalina no sistema nervoso simpático, evitando, dessa forma, o aumento no tamanho e na quantidade de adipócitos, prevenindo o depósito de gordura no organismo e consequentemente regulando o peso corporal. Alguns estudos mostram que as catequinas desempenham um papel importante no controle do tecido adiposo, principalmente pela regulação que a EGCG exerce sobre algumas enzimas relacionadas ao anabolismo e catabolismo lipídico, como a acetil CoA carboxilase, AG sintetase, lipase pancreática, lipase gástrica e lipooxigenase (LIN; LIN-SHIAU, 2006).

A mais abundante catequina presente no chá-verde, a EGCG, tem mostrado efeitos benéficos em vários estudos possuindo uma atividade antioxidante no diabetes (BALUCHNEJADMOJARAD; ROGHANI, 2011), na doença de Parkinson (GUO et al., 2007) e na doença de Alzheimer (LOPEZ DEL AMO et al., 2012; REZAI-ZADEH et al., 2008). Outras propriedades biológicas e farmacológicas incluem a atividade antialérgica (FUJIMURA; TACHIBANA; YAMADA, 2001; SHIN et al., 2007) e anti-inflamatória (AKHTAR; HAQQI, 2011; BYUN et al., 2012; COOPER; MORRE; MORRE, 2005).

Quimicamente os flavonóides do chá verde são atenuadores muito eficazes de espécies reativas, dentre elas ERO e espécies reativas de nitrogênio (ERN) (HALLIWELL, 2008). A atividade antioxidante das catequinas deve-se ao mecanismo de transferência de elétron destas para as ERO estabilizando estas substâncias. A adição de um grupo galato e hidroxilas à estrutura do anel B dos compostos do chá verde aumenta a sua eficiência como *scavenger* de ERO (NAKAGAWA; YOKOZAWA, 2002). Estudos realizados em voluntários demonstram

aumento da capacidade antioxidante do sangue nos seres humanos que consomem quantidades moderadas do chá, ou seja, de 1-6 copos/dia (COOPER; MORRE; MORRE, 2005; GOUNI-BERTHOLD; SACHINIDIS, 2004; RIETVELD; WISEMAN, 2003).

Dentre os aspectos necessários para compreender a atividade das catequinas nos sistemas biológicos, é preciso conhecer sua forma de absorção, distribuição, metabolismo e eliminação pelo organismo. Após a ingestão do extrato de chá verde evidências sugerem que as catequinas absorvidas são submetidas a um extenso processo de biotransformação, incluindo metilação, glucuronidação, sulfatação e metabolismo no trato gastro intestinal (LAMBERT et al., 2003).

Hoje se sabe que dentre as catequinas a EGCG é a mais rapidamente absorvida, distribui-se por todos os tecidos e possui um tempo de meia vida maior na corrente sanguínea. Quando administrada isoladamente, apresenta meia vida menor do que associada com outros compostos do extrato de chá verde. Esta propriedade está relacionada com a sua complexação, competição, metabolização e a interação com os demais compostos do extrato do chá verde (CHEN et al., 1997).

Apesar da biodisponibilidade das catequinas ser baixa, grande parte escapa do efeito de primeira passagem, indicando que a permeabilidade, o transporte ou o metabolismo das catequinas na membrana celular da região gastrointestinal, são fatores limitantes, que resultam em baixa biodisponibilidade oral (CAI; ANAVY; CHOW, 2002). Numerosas proteínas podem se ligar diretamente com a EGCG no plasma entre elas o fibrinogênio e a glicoproteína rica em histidina, que podem atuar como proteínas transportadoras de EGCG no plasma. Entretanto, a EGCG pode se ligar a tecidos como pulmão, mama, cólon e pele através de outras proteínas diferentes das presentes existentes no plasma (SAZUKA; ISEMURA; ISEMURA, 1998).

Mais de 80% das principais catequinas do chá são encontradas conjugadas no plasma e na urina. No entanto, estes conjugados ainda contem porções catecol e galato intactas e podem eliminar superóxido com eficácia, sugerindo que a capacidade antioxidante de alguns dos metabólitos das catequinas é semelhante à dos seus compostos progenitores (**Figura 5**). Mesmo apresentando baixa biodisponibilidade, as catequinas podem ser absorvidas em quantidade suficiente para exercer efeitos benéficos sobre os parâmetros cardiovasculares *in vivo* (BABU; LIU, 2008).

Figura 5 - Mecanismo de ação antioxidante dos grupamentos galato encontrado nas catequinas (ressonância) (LAMBERT; ELIAS, 2010).

A taxa de oxidação das catequinas aumenta em função do pH (faixa de 4-7) e muitas vezes a oxidação dos compostos fenólicos é referida como um processo de “auto-oxidação” (MILLER; BUETTNER; AUST, 1990). Os metais de transição (por exemplo, ferro e cobre) são capazes de iniciar a oxidação de compostos fenólicos e são catalisadores essenciais neste processo (DANILEWICZ, 2003). Essa reação é capaz de produzir ERO como o $O_2^{\cdot-}$ (ou a sua forma protonada, o $HO_2^{\cdot-}$) que é ainda reduzida a H_2O_2 em condições ácidas (**Figura 6**) (LAMBERT; ELIAS, 2010). A reação das catequinas como a EGCG com tais metais, produz radicais $O_2^{\cdot-}$ e radicais EGCG ($EGCG^{\cdot}$). O radical $O_2^{\cdot-}$ pode ainda reagir com outra molécula de EGCG para produzir H_2O_2 e $EGCG^{\cdot}$. Duas moléculas $EGCG^{\cdot}$ podem colidir para formar um dímero, porém é mais provável que a $EGCG^{\cdot}$ tenha o anel B de uma outra molécula de EGCG como alvo, para formar um radical dímero (Dímero $^{\cdot}$). O radical dímero pode reagir com oxigênio molecular para formar o dímero de EGCG e regenerar o radical $O_2^{\cdot-}$. Em qualquer caso, a reação é propagada por meio da reação de $O_2^{\cdot-}$ com EGCG, levando a geração de dímeros EGCG e H_2O_2 , mostrando uma ação pró-oxidante destes compostos polifenólicos (HOU et al., 2005).

Figura 6 - Mecanismo de ação pro-oxidante da EGCG (auto-oxidação) (HOU et al., 2005).

As catequinas também apresentam uma ação anti-inflamatória. Recentemente, a EGCG protegeu camundongos contra a endotoxemia letal induzida por LPS, resgatando os animais de uma sepse letal (LI et al., 2007). Também foi identificado um possível receptor de superfície celular para EGCG que pode mediar suas ações celulares (FUJIMURA et al., 2012; TACHIBANA et al., 2004). O receptor de laminina 67-kDa (67LR) é uma não-integrina de superfície celular com alta afinidade para laminina (MENARD et al., 1997). O seu papel como receptor de laminina, o torna uma molécula importante na adesão celular para a membrana basal e a metástase de células tumorais (TANAKA et al., 2000). A laminina em si pode, ao ativar este receptor em neutrófilos, promover uma resposta quimiotática (TERRANOVA et al., 1986).

Este receptor foi caracterizado em neutrófilos humanos ativados por fMLP. A sua expressão é dependente da ativação da célula (YOON et al., 1987), e tem sido demonstrado ser responsável por mediar os efeitos anti-alérgicos da EGCG em basófilos (FUJIMURA; YAMADA; TACHIBANA, 2005). Em pré-adipócitos a EGCG medeia a sinalização anti-insulina através da via do 67LR (KU et al., 2009). Segundo alguns autores, a ação da EGCG através 67LR envolve o efeito de regulação negativa da resposta inflamatória, mostrando-se capaz de diminuir a expressão de TLR4. A proteína Tollip é indispensável para mediar a ação anti-inflamatória de EGCG, uma vez que está aumentada quando esta catequina está presente (HONG BYUN et al., 2010). Além disso, a EGCG é um regulador negativo da sinalização do TLR4, inibindo as vias de sinalização de TLR4 dependente de MyD88 e TRIF em células RAW264.7, suprimindo assim a resposta inflamatória (YOUN et al., 2006).

A atividade anti-inflamatória da EGCG pode ser explicada pela sua capacidade em atuar inibindo a ativação de fatores de transcrição como o NF- κ B e AP-1, que são induzidos por estímulos pró-inflamatórios, tais como a radiação UV e LPS (BARTHELMAN et al., 1998; LIN; LIN, 1997). Ao mesmo tempo ela inibe a degradação do I κ B- α induzida pela ativação celular mediada pelo TNF- α e ligantes de TLR4. O mecanismo de ação anti-inflamatório da EGCG parece estar associado à diminuição da atividade da proteína IKK, envolvida na fosforilação do I κ B- α (RAHMAN; BISWAS; KIRKHAM, 2006), tendo por resultado a diminuição da expressão de produtos de genes inflamatórios incluindo a lipoxigenase (YANG; KOO, 2000), ciclooxigenase (COX) (SINGH; KATIYAR, 2011), NO-sintase (CHAN et al., 1997) e TNF- α (AL-AMRI; HAGRAS; MOHAMED, 2013).

2 JUSTIFICATIVA

No Brasil de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), alimento funcional é “aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutritivas básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica”. Tendo em vista estas definições, atualmente o chá verde é considerado um alimento funcional, e a planta *Camellia sinensis* tem sido amplamente investigada devido ao seu conteúdo específico de flavonóides (catequinas), que lhe confere inúmeras propriedades terapêuticas.

Diante de evidências apresentadas a partir de estudos *in vitro* e *in vivo*, mostrou-se que as catequinas do chá verde apresentam um papel na proteção contra doenças degenerativas e inflamatórias, apresentando efeitos antioxidantes, antiobesidade, anti-inflamatórios, antiaterogênicos, hipoglicemiantes, além da sua atividade antibacteriana e antiviral. No entanto, as concentrações utilizadas *in vitro* são muitas vezes superiores às encontradas em animais ou no plasma humano, sendo assim, evidências *in vivo* são necessárias para demonstrar qualquer efeito protetor conferido às catequinas.

A obesidade é considerada hoje uma doença inflamatória, onde as células do tecido adiposo em uma condição de excesso de armazenamento de nutrientes em forma de triglicérides, podem secretar substâncias com ação parácrina, autocrina e endócrina, que são capazes de ativar direta e indiretamente o sistema imune. Dentre estas substâncias destaca-se a leptina e as citocinas pró inflamatórias como o TNF- α . Além disso, há um maior aporte de ácidos graxos livres no plasma, devido à dieta hipercalórica/hiperlipídica e de LPS proveniente da microbiota intestinal. Estes são potentes ativadores de TLR4, levando à sensibilização de neutrófilos.

No momento, nenhum dos estudos já realizados avaliou os efeitos da suplementação crônica com extrato de chá verde em animais obesos, avaliando parâmetros celulares de neutrófilos, relacionados à obesidade e ao estresse oxidativo com o objetivo de traçar um perfil oxidativo e inflamatório nestas células.

Considerando aspectos funcionais, inflamatórios e relacionados ao estresse oxidativo, hipotetizamos que o modelo de obesidade proposto mimetiza uma condição de obesidade, apresentando um estado inflamatório de baixo grau,

levando à exposição contínua de neutrófilos a agentes *priming*, atenuando as funções destas células, bem como aumentando a vulnerabilidade a infecções. Além disso, propomos que a suplementação crônica com chá verde, pode modular o quadro inflamatório destas células, melhorando suas funções efectoras e diminuindo a produção de interleucinas.

Os dados deste estudo são de grande importância, uma vez que essas células pertencem à resposta imune inata, formando a primeira linha de defesa do organismo e participam ativamente de uma diversidade de doenças relacionadas à obesidade. Este estudo poderá contribuir para a compreensão do envolvimento do processo de ativação dos neutrófilos e inflamação na obesidade e elucidar os efeitos farmacológicos do chá verde sobre o sistema imune. A perspectiva deste estudo é futuramente este alimento funcional ser indicado também como um adjuvante no tratamento das complicações da obesidade ou ao menos para melhora da função imune diante do quadro de obesidade.

3 OBJETIVO GERAL

Este estudo tem como objetivo principal avaliar os efeitos da suplementação crônica com extrato de chá verde em um modelo de obesidade induzida por dieta de cafeteria sobre alguns indicadores de função de neutrófilos de ratos.

3.1 Estratégia experimental

- a) Avaliar a capacidade de migração (quimiotaxia) de neutrófilos;
- b) Avaliar a capacidade fagocítica de neutrófilos;
- c) Avaliar a produção de ânion superóxido e peróxido de hidrogênio;
- d) Avaliar a atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO);
- e) Avaliar a produção de ácido hipocloroso;
- f) Avaliar as citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , IL-6 e TNF- α ;
- g) Avaliar a mobilização intracelular de cálcio;
- h) Avaliar a atividade das enzimas hexoquinase, G6PDH, superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Utilizamos nesse estudo ratos Wistar (*Rattus norvegicus*, var. *albinus*) machos com 8 semanas de idade e peso inicial médio de 150 ± 40 g, provenientes do Biotério da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Os animais foram mantidos durante 12 semanas em grupo de 5 animais por caixa no Biotério da Universidade Cruzeiro do Sul campus Anália Franco, com temperatura constante de 23 ± 2 °C, sob ciclo de iluminação claro/escuro de 12/12 horas. Os animais receberam alimentação e água *ad libitum* no primeiro mês de suplementação com chá verde e, após o início da dieta de cafeteria os animais foram submetidos a um *pair feeding* para padronização da quantidade de ingestão de alimento entre os grupos experimentais. Após este período, os animais foram eutanasiados por decapitação entre 12:00 e 14:00 h, para a posterior realização dos experimentos. Os procedimentos gerais foram realizados de acordo com as normas estabelecidas pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEEI-ICB/USP nº 160/2013).

4.2 Indução da obesidade

A indução da obesidade nos animais foi realizada por meio de uma dieta hipercalórica (cafeteria) segundo Cesaretti e Kohlmann Junior (2006), sendo um modelo de indução de obesidade exógena que mais se assemelha a grande parte da obesidade humana, onde é oferecido ao animal um maior aporte calórico, através de uma sobrecarga de carboidratos ou de gordura, isoladamente ou em associação. Esta dieta é denominada dieta “ocidentalizada”, de *fast-food* ou ainda dieta cafeteria. A composição da dieta de cafeteria varia consideravelmente na literatura. A ração hipercalórica ou dieta de cafeteria utilizada neste estudo foi constituída de 37,5% de ração padrão para ratos, 25% de chocolate, 12,5% de amendoim, 12,5% de leite condensado e 12,5% de bolacha maisena; perfazendo um aumento de 46% de Kcal (**Tabela 1**) a mais comparada à ração padrão ofertada aos grupos com dieta padrão sem (DP) ou com chá verde (DP+CV).

Tabela 1 - Comparação entre a composição da dieta de cafeteria e a dieta padrão.

	Ração Hipercalórica (Cafeteria)		Ração Padrão	
	Kcal/100g	%	Kcal/100g	%
Valor Energético Total (Kcal/100g)	419 Kcal	46% *	288 Kcal	-
Carboidratos	-	44,63%	-	55,55%
Proteínas	-	13,6%	-	31,94%
Lipídios	-	35,79%	-	12,5%

* porcentagem de Kcal a mais comparada à ração padrão.

4.3 Suplementação com extrato de Chá Verde

Neste estudo administramos 500 mg/Kg de peso corporal (LAMBERT et al., 2003) de extrato de chá verde adquirido comercialmente da empresa Tovani-Benzaquen, São Paulo, SP. O estudo seguiu o design experimental proposto no **Quadro 1**. Os animais foram suplementados diariamente (2^a a 6^a feira) com extrato aquoso de chá através de gavagem intragástrica. O período total de experimentação foi de 12 semanas, no entanto, os animais foram suplementados com chá verde por apenas 66 dias em função dos finais de semana. Decorrido o período inicial de 4 semanas de gavagem com chá verde, os animais receberam uma dieta hipercalórica durante 8 semanas. Neste período os animais foram suplementados com extrato de chá verde e a dieta de cafeteria.

4.4 Grupos experimentais

Os animais foram divididos em 4 grupos experimentais. Grupo controle (DP), o qual não recebeu tratamento e foram alimentados com dieta padrão; grupo DP+CV, alimentado com dieta padrão e submetido à suplementação com extrato de chá verde; grupo obeso (DC), alimentado com dieta de cafeteria para indução da obesidade e não recebeu tratamento; grupo obeso suplementado com extrato de chá verde (DC+CV).

Quadro 1 - Design experimental.

4.5 Caracterização da obesidade

4.5.1 Teste de tolerância à insulina (ITT)

Uma semana antes do processo de eutanásia dos animais, após ficarem por 6 h em jejum, os animais receberam uma dose de insulina via intraperitoneal (1U/kg peso corpóreo) e foi avaliada a glicemia por meio de glicofita e glicosímetro (Biocheck TD-4225 /Bioeasy Diagnóstica Ltda / MG -Brasil) nos tempos: 0 (basal - antes da administração do hormônio), 5 , 15, 30, 60 e 90 minutos após a administração de insulina. Foi calculada a área total sob a curva da concentração plasmática de glicose entre os grupos e a constante de decaimento da glicose (K_{ITT}) (KAMEI et al., 2006; WILASRUSMEE et al., 2002).

4.5.2 Teste de tolerância à glicose (GTT)

Uma semana antes do processo de eutanásia dos animais e após 6 h de jejum, foi realizado o GTT administrando-se por via intraperitoneal uma solução salina 0,9% contendo 20% de glicose. As amostras de sangue foram coletadas

antes da aplicação de glicose (tempo 0) e 5, 15, 30, 60 e 90 minutos após a aplicação. Foi realizada uma pequena secção na extremidade distal da cauda do animal e a glicemia foi mensurada por meio de glicofita e glicosímetro (Biocheck TD-4225 / Bioeasy Diagnóstica Ltda / MG -Brasil). Foi calculada a área total sob a curva da concentração plasmática de glicose entre os grupos.

4.5.3 Ganho de peso corporal

Os animais foram pesados semanalmente durante o período de experimentação. O ganho de peso foi calculado pela diferença entre o peso final menos o peso inicial e expresso em gramas de ganho de peso.

4.5.4 Peso dos depósitos de gordura e índice de adiposidade

O peso dos depósitos de gordura epididimal, subcutâneo, perirenal e tecido adiposo marrom foram determinados após a retirada desses tecidos. O índice de adiposidade foi determinado pela soma do peso dos depósitos de gordura e expresso por 100 g de peso corporal.

4.5.5 Determinações bioquímicas

Após um jejum de 12 horas, os animais foram eutanasiados por decapitação. O sangue foi coletado em tubos contendo anticoagulante e posteriormente foi centrifugado para obtenção do plasma. O plasma foi acondicionado em freezer - 80 °C até o momento das análises. Testes de laboratório foram utilizados para avaliar a concentração plasmática de leptina e AGL. As amostras foram analisadas utilizando um método enzimático e realizadas de acordo com as instruções do fabricante.

4.6 Obtenção dos neutrófilos

Para a obtenção dos neutrófilos foi realizado a indução da migração dessas células para a cavidade peritoneal pela injeção de 10 mL de uma solução de glicogênio de ostra (Tipo II) 1% em solução de tampão fosfato salina PBS (133,8 mM

NaCl, 2,7 mM KCl, 0,9 mM KH_2PO_4 , 6,4 mM $\text{Na}_2\text{H}_2\text{PO}_2$, pH 7,4) na cavidade abdominal dos animais 4 h antes do processo de eutanásia por decapitação (MARIN et al., 2011) (**Quadro 2**). Após o processo de eutanásia os neutrófilos foram coletados da cavidade peritoneal injetando-se uma solução PBS (10 mL) na cavidade. O fluído peritoneal foi removido com a ajuda de uma pipeta Pasteur e centrifugado por 10 min, $600 \times g$ e 4°C . O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* foi resuspendido em meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino. Os neutrófilos foram contados em câmara de Neubauer utilizando tripan blue (1%) em PBS. Após a contagem, a concentração inicial de $2,5 \times 10^6$ células/mL foram utilizadas para a realização de todos os experimentos.

Quadro 2 - Obtenção de neutrófilos.

4.7 Avaliação da migração de neutrófilos pelo ensaio de quimiotaxia

A resposta quimiotática de neutrófilos foi avaliada utilizando-se uma placa de 24 poços segundo Hatanaka et al. (2007). Neste método, as câmaras inferiores foram preenchidas com o agente quimiotático N-formil-Metil-Leucil-fenilalanina (fMLP – 10 nM) em PBS + 0,01% de albumina, ou apenas com PBS (basal sem estímulo). Uma membrana quimiotática com um tamanho de poro de $5 \mu\text{m}$ foi afixada ao banco

de filtro e uma suspensão de células (1×10^6 células) foi adicionada ao topo de cada cavidade da placa. A câmara foi incubada em 5% de CO_2 , à 37 °C por 60 min. Após a incubação, a câmara foi desmontada e as células contidas no compartimento inferior foram contadas em câmara de Neubauer. A resposta quimiotática foi definida como o número médio de células que migraram para a câmara inferior.

4.8 Avaliação da atividade fagocítica

A capacidade fagocítica de neutrófilos foi avaliada através do ensaio de internalização de partículas opsonizadas de zimosan (5×10^6 partículas). As partículas de zimosan (Sigma) foram opsonizadas na proporção 1:1 com soro homólogo, diluído em PBS e colocado em banho seco, à 37 °C sob agitação durante 30 min. Depois de opsonizadas, as partículas foram centrifugadas e resuspendidas em 500 μL meio de cultura RPMI 1640. Os neutrófilos (1×10^6 células) foram desafiados com zimosan num volume final de 1 mL em meio RPMI 1640. As células foram incubadas por 30 min à 37 °C com 5% de CO_2 . Após a incubação uma suspensão de 300 μL foi colocada em uma lâmina de microscopia para citocentrifugação e posteriormente a lâmina foi corada com corante Rosenfeld. A contagem foi realizada em microscópio óptico (Nikon Eclipse E-100). As células, num total de 100 por lâmina, foram contadas e multiplicadas por 1 (uma ou duas partículas fagocitadas), 2 (três ou quatro partículas) ou 3 (mais que 4 partículas), de acordo com os critérios de escore estabelecidos previamente pelo nosso grupo. O índice de atividade fagocítica foi calculado pela soma dos pontos obtidos por animal.

4.9 Produção de ERO avaliado pelo ensaio de dihidroetidina (DHE)

A sonda fluorescente dihidroetidina (DHE) foi utilizada para avaliação da produção de ERO pelas células. A dihidroetidina é uma sonda lipofílica que se difunde prontamente através das membranas das células. Uma vez dentro da célula, ela é oxidada por ERO, levando a formação de compostos fluorescentes (ZHAO et al., 2003). As células (5×10^5 células) foram incubadas com dihidroetidina (5 μM) em tampão Tyrode (NaCl 137 mM; KCl 2,68 mM; MgCl 0,49 mM; NaH_2PO_4 12,0 mM; D-glicose 5,6 mM NaHCO_3 12,0 mM; Hepes 5,0 mM; pH 7,4) por 15 minutos, a

temperatura ambiente, no escuro. Após a marcação, as células foram centrifugadas e resuspendidas em 300 μL de Tyrode. Os experimentos foram realizados na presença e na ausência de 6,5 μM (20 ng) de PMA utilizado como ativador de *burst* respiratório para neutrófilos. Após esta incubação a fluorescência dos produtos de oxidação da DHE foi monitorada em espectrofluorímetro Tecan (Salzburg, Áustria), com excitação a 396 nm e emissão a 590 nm. Os resultados deste experimento foram expressos como unidades relativas de fluorescência.

4.10 Produção de ERO avaliado pelo ensaio de DCFH-DA

O método utilizando a sonda 2',7'-Diclorodihidrofluoresceína diacetato (DCFH-DA) também foi utilizado para avaliar a produção de ERO pelas células. As células (5×10^5) foram previamente encubadas com 5 μM da sonda DCFH-DA e incubadas em Tyrode por 60 min. Após este período de incubação, as células foram centrifugadas e resuspendidas em 300 μL de Tyrode. Os experimentos foram realizados na presença e na ausência de PMA (6,5 μM) como ativador da produção de ERO por 60 min. A fluorescência foi monitorada em espectrofluorímetro Tecan (Salzburg, Áustria), com excitação a 485 nm e emissão a 530 nm após o período de tratamento. Os resultados deste experimento foram expressos como unidades relativas de fluorescência.

4.11 Atividade da Enzima Mieloperoxidase (MPO)

A atividade da enzima MPO liberada por neutrófilos após a desgranulação foi realizada segundo Hatanaka et al. (2006). Os neutrófilos (6×10^5) em tampão Tyrode foram expostos a 15 μL de uma solução de PMA 6,5 μM por 30 min à 37 °C, sob agitação para estímulo da desgranulação. Após a incubação, o meio foi imerso em gelo e centrifugado a 500 $\times$ g por 10 min à 4 °C, para separar o sobrenadante das células. O sobrenadante foi usado para medir a atividade da MPO, acrescentando H_2O_2 (0,1 mM) como disparador da reação e luminol (1 mM) como um amplificador de luz em um volume final de 0,3 ml. A quimioluminescência foi determinada conforme descrito anteriormente.

4.12 Produção de ácido hipocloroso (HOCl)

A produção de ácido hipocloroso por neutrófilos foi avaliada pela técnica descrita por Dypbukt et al. (2005). Nesta técnica, o HOCl gerado pela ação da mieloperoxidase sobre o H_2O_2 formado nos neutrófilos reage com a taurina formando taurina cloroamina. Em meio ácido e na presença de iodeto, a taurina cloroamina é oxidada, havendo a formação de ácido hipoiodoso, o qual oxida o cromóforo tetrametilbenzidina (TMB), gerando assim um produto de coloração azulada. Neutrófilos (6×10^5) em PBS suplementado com CaCl_2 1 mM; MgCl_2 1,5 mM; $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ 10 mM; Taurina 5 mM; pH 7,4; foram estimulados com PMA (15 μL de uma solução 6,5 μM) por 1 hora, a 37 °C e em atmosfera contendo 5% de CO_2 . Após esse período a reação foi interrompida pela adição de 3 μL de catalase (8 mM) e os tubos foram mantidos por 10 minutos em banho de gelo. A seguir os tubos foram centrifugados a 2400 $\times g$, por 5 minutos e o sobrenadante foi separado e plaqueado. Ao sobrenadante foi adicionado 50 μL de solução TMB 2 mM, iodeto de potássio 10 μM e 10% de dimetilformamida em tampão acetato 400 mM, pH 5,4. Após 5 minutos, a leitura correspondente à redução do TMB foi realizada por espectrofotometria em comprimento de onda de 650 nm. A quantificação foi realizada utilizando-se curva padrão de HOCl (0 – 40 μM). Os resultados estão expressos como μM de HOCl/ 6×10^5 células.

4.13 Liberação de interleucinas inflamatórias

A avaliação das interleucinas IL-1 β , IL-6 e TNF- α foi realizada por imunoensaio quantitativo através de kits (R&D Systems, Mineápolis, EUA) segundo instruções do fabricante. As células (5×10^6) foram cultivadas por 18 h na presença de LPS (10 $\mu\text{g/mL}$). Após este período as células foram coletadas, centrifugadas e o sobrenadante da cultura foi utilizado para a detecção das interleucinas.

4.14 Avaliação da concentração intracelular de cálcio

Mudanças na concentração intracelular de cálcio foram monitoradas fluorimetricamente usando a sonda cálcio-sensível Fura 2-AM (CAMPOIO; OLIVEIRA; OTTON, 2011). O período de marcação da sonda Fura 2-AM (5 μM) foi de 1 hora para 1×10^6 células/mL em solução Tyrode em banho seco a 37 °C no escuro. Após este período, as células foram lavadas com o mesmo tampão e tratadas com ácido palmítico (0,3 mM) utilizado como um indutor da mobilização de cálcio. O monitoramento da mudança da concentração intracelular de cálcio $[\text{Ca}^{2+}]_i$ foi realizado por 20 minutos. A fluorescência do Fura 2-AM foi avaliada em alíquotas de 300 μL da suspensão de células em espectrofluorímetro Tecan (Salzburg, Áustria) ajustado nos comprimentos de excitação a 340 e 380 nm e emissão a 510 nm. Uma curva de calibração foi executada no final de cada experimento. A transformação do sinal fluorescente de cálcio foi executada pela calibração com o ionóforo ionomicina (100 μM concentração máxima) seguida pela adição do quelante de cálcio EGTA (60 μM concentração mínima) de acordo com a equação de (GRYNKIEWICZ; POENIE; TSIEN, 1985), usando a constante de dissociação de 224 nM (de acordo com o catálogo Molecular Probes). Os resultados deste experimento foram expressos como quantidade total de cálcio (nM) durante 20 minutos pela análise da área sobre a curva (AUC).

4.15 Atividade das enzimas antioxidantes

Os ensaios para avaliar a atividade das enzimas antioxidantes utilizaram 5×10^6 células. Os neutrófilos sofreram ruptura por ultrasonicação em 300 μL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7,4 e em seguida foram centrifugados por 10 minutos, 10000 $\times g$ e à 4 °C. O sobrenadante foi utilizado para a análise.

A atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) glutationala peroxidase (GPx) e glutationala redutase (GR) foram determinadas usando um leitor de microplaca (Tecan, Salzburg, Austria). A atividade da CAT foi determinada como descrito por Aebi (1984), baseado na decomposição direta do H_2O_2 . O sobrenadante (25 μL) foi adicionado a 200 μL de H_2O_2 10 mM em microplaca UV.

A atividade da SOD foi mensurada usando o método descrito por Ewing e Janeiro (1995) na qual envolve a redução dos radicais superóxido por nitroblue tetrazolium (NBT) seguindo uma cinética durante 3 minutos. Utilizou-se 25 µL do sobrenadante para realização do ensaio, adicionado de 200 µL de solução A (tampão fosfato 50 mM, pH 7,4; EDTA 1 mM; NBT 0,32 mM; β-NADH 98 µM) e 25 µL de solução B (metassulfato de fenazina (PMS) 3,26 mM; EDTA 0,2 M; tampão fosfato 50 mM, pH7,4).

Para avaliar a atividade da glutathione redutase, em uma placa de 96 poços foi adicionado 25µL de amostra, 150 µL de tampão fosfato (0,2 M) sem EDTA, 25 µL de glutathione oxidada (10 mM em tampão fosfato 0,2 M) e 25 µL de β-NADPH (3,6 mM), como disparador da reação. Este ensaio baseia-se na catálise de glutathione oxidada para glutathione reduzida numa reação dependente de NADPH. Esta catálise é essencial para a manutenção dos níveis intracelulares de glutathione reduzida.

Para avaliar a atividade da glutathione peroxidase em uma placa de 96 poços foi adicionado 25 µL de amostra, 25 µL de azida sódica como inibidor de catalase (2,5 mM), 25 µL de β- NADPH (1,2 mM), 75 µL de glutathione reduzida (10 mM em ácido fosfórico a 5%) e 50 µL de glutathione redutase (2,5 U/mL). A reação foi disparada com a adição de 50 µL de terc-butil-hidroperóxido 4,8 mM. Este ensaio baseia-se na redução de hidroperóxidos pela glutathione. Neste método, a produção de glutathione oxidada foi monitorada pelo acoplamento da reação à enzima glutathione redutase, processo que consome NADPH. Para a atividade de ambas as enzimas, a oxidação de NADPH foi registrada espectrofotometricamente a 340 nm por 3 minutos.

4.16 Atividade da Hexoquinase

A atividade máxima da hexoquinase (enzima que catalisa a fosforilação da glicose na primeira reação da via glicolítica) foi determinada segundo Crabtree e Newsholme (1972). Os neutrófilos (5×10^6 células) foram ressuspensos em 100 µL de tampão de extração (Tris-HCl 50 mM; EDTA 1 mM; $MgCl_2$ 2 mM e mercaptoetanol 30 mM; com pH 7,5) e sofreram ruptura por ultrasonicação. Em seguida foram centrifugados por 10 minutos e $10000 \times g$ a 4 °C. 25 µL do sobrenadante foi utilizada para realização do ensaio, adicionado a 290 µL de tampão de ensaio (Tris-HCl 75 mM; $MgCl_2$ 7,5 mM; EDTA 0,8 mM; KCl 2,95 mM;

mercaptoetanol 4 mM, pH 7,5) adicionado de NADP⁺ 0,4 mM; ATP 2,5 mM; creatina-fosfato 10 mM, creatina quinase 1,8 U, glicose-6-fosfato desidrogenase 14 U e Triton X-100 0,05% (v/v)). Dezessete (17) µL de glicose-6-fosfato a 1 mM foi o disparador da reação. A atividade da enzima foi determinada utilizando um leitor de microplaca (Tecan, Salzburg, Austria) e a leitura da absorbância foi realizada a 340 nm.

4.17 Atividade da Glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH)

A enzima G6PDH catalisa a primeira reação da via das pentoses, sendo uma importante geradora de NADPH. Para a realização deste ensaio as células (5×10^6) foram coletadas, centrifugadas e ao pellet foi adicionado tampão de extração constituído de Tris-HCl 50 mM; EDTA 1 mM em pH 8,0. Os neutrófilos ressuspendidos em 300 µL de tampão de extração, sofreram ruptura por ultrasonicação, em seguida foram centrifugados por 10 minutos e $10000 \times g$ a 4°C. 25 µL do sobrenadante foi usado para a análise, adicionado de 290 µL do tampão de ensaio (Tris-HCl 86 mM; MgCl₂ 6,9 mM; NADP⁺ 0,4 mM; glicose-6-fosfato 1,2 mM e Triton X-100 0,05% (v/v), em pH 7,6) em uma microplaca de 96 poços. O início da reação ocorreu pela adição de glicose-6-fosfato 1,2 mM ao meio. A atividade da enzima foi determinada utilizando um leitor de microplaca (Tecan, Salzburg, Austria) e a leitura da absorbância foi realizada a 340 nm.

4.18 Determinação das proteínas totais nos homogenatos

A determinação do conteúdo de proteínas totais das amostras foi realizada segundo o método de Bradford (1976), usando-se albumina bovina sérica como padrão e a leitura da absorbância a 595 nm em espectrofotômetro.

4.19 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se análise de Two way ANOVA, seguida por teste de Bonferroni para homogeneidade das variâncias, adotando-se como limite mínimo de significância $p < 0.05$. O software utilizado para análise estatística foi o GraphPad Prism (versão 4; GraphPad Software, San Diego, CA, EUA).

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da obesidade no modelo utilizado no estudo

5.1.1 Parâmetros bioquímicos e resistência à insulina

Algumas características são marcantes em indivíduos obesos entre elas estão a hiperinsulinemia, hiperglicemia e resistência à insulina. Neste estudo foram realizados testes de tolerância à glicose (GTT) (**Figura 7A**) e tolerância à insulina (ITT) (**Figura 7B**) na 11^a semana de tratamento dos animais. Os valores obtidos após a análise dos valores da área sob a curva (AUC) mostram que o grupo DC (obeso) apresentou um aumento significativo na glicemia em relação ao grupo DP (controle) no teste de GTT. O tratamento dos animais obesos com extrato de chá verde (DC+CV) reverteu o aumento da glicemia no grupo DC.

Com intuito de confirmar estes dados de GTT, foi realizado o ITT nos animais. A hiperglicemia constatada após o teste no grupo DC indica resistência à insulina nesse grupo, que apresentou um aumento na glicemia comparado ao grupo DP, havendo melhora nesse quadro na presença do tratamento com chá verde (grupo DC+CV). Também foi realizado um cálculo para avaliar o índice de utilização da glicose pelos tecidos, o K_{ITT} (**Figura 7C**), mostrando uma média de utilização da glicose significativamente menor no grupo obeso (DC) comparado ao grupo controle (DP). Estes dados confirmam que houve aumento da resistência à insulina após indução da obesidade pela dieta de cafeteria.

Analizamos também a concentração plasmática de leptina e a concentração sérica de AGL. Nossos resultados mostram um aumento plasmático de leptina (30%) e AGL (33%) nos animais obesos (DC), em comparação aos animais controle (DP). O tratamento dos animais obesos com chá verde (DC+CV) foi capaz de diminuir os níveis de AGL em 34% comparado ao grupo DC, mas não os de leptina (**Tabela 2**).

5.1.2 *Ganho de peso e depósitos de gordura*

Após o procedimento de suplementação com extrato de chá verde e indução da obesidade com dieta de cafeteria foi observada um aumento de 32% no ganho de peso no grupo DC em relação aos animais com dieta padrão (DP). A suplementação com o extrato de chá verde nos animais que receberam a dieta de cafeteria (DC+CV) e a dieta padrão (DP+CV) foi capaz de promover uma diminuição significativa de 39% e 24%, respectivamente no ganho de peso desses animais comparado aos seus respectivos controles, DC e DP (**Tabela 2**).

Outros parâmetros de caracterização da obesidade como gordura epididimal, perirrenal e subcutânea foram avaliados e observamos um incremento significativo de 43%, 39% e 54%, respectivamente nos animais que receberam dieta de cafeteria (DC) em relação aos animais com dieta padrão (DP). O grupo DC que recebeu a suplementação com extrato de chá verde diminuiu o incremento desses depósitos em 36%, 13% e 26%, respectivamente (**Tabela 2**). O tecido adiposo marrom também mostrou aumento de 50% nos animais DC comparado ao controle (DP). O tratamento com extrato de chá verde nos animais com dieta padrão (DP+CV) foi capaz de aumentar em 28% esse depósito comparado ao controle DP. O Índice de adiposidade (IA) também apresentou um valor maior nos animais DC (36%) e o tratamento com extrato de chá verde, nas duas condições, dieta de cafeteria (DC+CV) e dieta padrão (DP+CV) foi capaz de reduzir este valor em 16% e 30%, respectivamente, comparados aos seus respectivos controles.

5.2 **Parâmetros funcionais de neutrófilos**

5.2.1 *Avaliação da migração de neutrófilos*

Para avaliar a capacidade migratória dos neutrófilos para o sítio inflamatório, nós realizamos o ensaio de quimiotaxia. Nossos resultados mostraram que os animais do grupo DC estimulados ou não com fMLP apresentaram uma diminuição significativa ($p < 0,001$) de 55% em relação ao controle (DP) estimulado com fMLP (**Figura 8**).

5.2.2 Avaliação da capacidade fagocítica

Para avaliar a capacidade fagocítica dos neutrófilos foi realizado o ensaio de internalização de partículas de zimosan opsonizado. Os resultados obtidos mostraram que houve uma diminuição na capacidade fagocítica de 41% ($p < 0,05$) no grupo de animais tratados com chá verde e dieta padrão (DP+CV) e um aumento de 33% ($p < 0,05$) nos animais obesos (DC) em relação ao grupo DP (**Figura 9**).

5.2.3 Produção de ERO avaliada no ensaio de dihidroetidina (DHE)

Para determinar a geração de ERO (**Figura 10**) realizamos a análise da fluorescência dos produtos de oxidação da sonda DHE. Dentre os grupos estimulados com PMA, a análise mostrou um aumento ($p < 0,001$) de 35% na produção de ERO no grupo de animais obesos (DC) comparado aos animais controle (DP). Houve um aumento adicional de 25% no grupo de animais obesos suplementado com chá verde (DC+CV) em relação aos animais obesos DC ($p < 0,001$).

5.2.4 Produção de ERO avaliada no ensaio de DCFH-DA

Na determinação da geração de ERO (**Figura 11**) utilizando a sonda DCFH-DA observamos que dentre os grupos estimulados com PMA, os animais obesos (DC) apresentaram uma diminuição na geração de ERO de 46% em comparado ao controle (DP). O grupo de animais obesos suplementado com extrato de chá verde (DC+CV) mostrou um aumento de 69% comparado ao grupo obeso. Não houve diferença significativa no grupo de animais apenas tratados com chá verde (DP+CV).

5.2.5 Atividade da enzima Mieloperoxidase (MPO)

Avaliamos a atividade da MPO, enzima presente em grânulos citoplasmáticos do neutrófilo e responsável pela conversão do H_2O_2 e íons cloreto (Cl^-) em HOCl, um potente agente microbicida. A **Figura 12** apresenta os resultados obtidos com a análise da atividade desta enzima em neutrófilos estimulados ou não (basal) com

PMA. Houve uma diminuição na atividade da MPO em ambos os grupos de animais suplementados com chá verde (DP+CV e DC+CV) ($p<0,01$) e no grupo, obeso DC ($p<0,001$) de 36%, 52% e 51%, respectivamente comparados ao grupo controle (DP).

5.2.6 Produção de ácido hipocloroso (HOCl) por Neutrófilos

Com o intuito de avaliar a capacidade microbicida dessas células, determinamos a produção de HOCl por neutrófilos estimulados com PMA, utilizando um grupo basal como controle negativo do experimento (**Figura 13**). O ensaio mostrou uma diminuição significativa ($p<0,001$) de 45% apresentada no grupo de animais obesos (DC) comparado ao controle (DP). Já os animais obesos que foram suplementados com extrato de chá verde (DC+CV) aumentaram a produção de HOCl em 35% comparado aos animais obesos (DC) ($p<0,05$).

5.2.7 Liberação de interleucinas pró- e anti-inflamatórias

Para avaliar a resposta inflamatória de neutrófilos, determinamos a liberação de interleucinas pró-inflamatórias IL-6, TNF- α e IL-1 β , sob estímulo de LPS, e também na condição basal (controle interno). Observamos uma redução de 61% ($p<0,05$) na produção de IL-6 nos neutrófilos de animais suplementados com extrato de chá verde (DP+CV) e no grupo de animais obesos que foram suplementados com chá verde (DC+CV) de 63% ($p<0,05$), comparados ao grupo de animais controle (DP) (**Tabela 3**). Na produção de TNF- α observamos que houve um aumento de 17% no grupo de animais obesos (DC) comparado ao grupo controle (DP) e uma tendência não significativa de redução de TNF- α no grupo suplementado com extrato de chá verde (DP+CV). O tratamento dos animais obesos com extrato de chá verde (DC+CV) promoveu uma diminuição de 46% ($p<0,05$) na liberação de TNF- α comparado ao grupo de animais obesos (DC). Não houve diferença estatística entre os grupos analisados referentes à produção de IL-1 β .

5.2.8 Avaliação da mobilização intracelular de Ca^{2+}

Avaliamos a mobilização intracelular de Ca^{2+} , um importante segundo mensageiro capaz de regular vários processos em células imunes, dentre elas a quimiotaxia, adesão, desgranulação, fagocitose, secreção de citocinas pró- e anti-inflamatórias, etc. Nós observamos que os animais obesos (DC) apresentaram um aumento na mobilização de cálcio intracelular ($p < 0,05$) de 138% na condição estimulada com AG e comparado ao grupo controle (DP) e também um aumento de 191% na mobilização de Ca^{2+} no grupo de animais suplementados com extrato de chá verde (DP+CV) ($p < 0,01$) comparado aos animais controle (DP). Embora tenhamos observado uma diminuição na mobilização de Ca^{2+} nos animais DC+CV comparado ao grupo DC, essa diferença não foi estatisticamente significativa. Entretanto, houve diferença entre os grupos de animais DP+CV comparado ao grupo de animais DC+CV, que diminuiu 60% ($p < 0,05$) (**Figura 14**).

5.2.9 Atividade das enzimas antioxidantes

Para investigar as alterações observadas nas análises de geração de ERO, realizamos ensaios enzimáticos analisando a atividade das enzimas antioxidantes. Podemos observar uma diminuição significativa da atividade da SOD total de 30%, 44% e 58%, nos grupos de animais DP+CV, DC e DC+CV, respectivamente em relação ao grupo DP ($p < 0,001$). A SOD Mn também foi inibida em todos os grupos. Na avaliação da atividade da enzima catalase, observamos um aumento significativo ($p < 0,01$) de 162% nos animais obesos (DC) em relação ao controle (DP). Os neutrófilos de animais obesos que foram tratados com extrato de chá verde (DC+CV), apresentaram uma diminuição na atividade desta enzima de 61% ($p < 0,01$), restaurando para os níveis do controle. A avaliação das enzimas antioxidantes GPx e GR (**Tabela 4**) não demonstrou alterações significativas, embora a GPx tenha apresentado uma tendência de diminuir no grupo de animais obesos (DC).

5.2.10 Atividade das enzimas metabólicas Hexoquinase e G6PDH

A **Tabela 4** mostra a atividade máxima das enzimas metabólicas G6PDH e hexoquinase em neutrófilos. Na avaliação da enzima hexoquinase, os animais do grupo DP+CV mostraram uma pequena diminuição não significativa em sua atividade, enquanto o grupo obeso (DC) e o grupo de animais DC+CV aumentaram significativamente, em torno de 48% a atividade da hexoquinase em relação ao controle (DP). Considerando a atividade da enzima G6PDH, observamos que os grupos de animais DP+CV, DC e DC+CV, apresentam uma diminuição de 85%, 76% e 89%, respectivamente comparada ao grupo controle (DP) ($p < 0,001$).

Figura 7 - Determinação da (A) tolerância à glicose intraperitoneal (GTT), (B) tolerância à insulina (ITT) e constante de decaimento da glicose (K_{ITT}) nos animais, realizada na 11ª semana de tratamento após 6 h em jejum.

c

Valores da glicemia média dos animais. A glicemia foi avaliada nos tempos: 0, 5, 15, 30, 60 e 90 minutos após início. Os resultados foram expressos como área sob a curva (AUC) da concentração plasmática de glicose entre os grupos (DP=dieta padrão; DC=dieta cafeteria, CV=chá verde) e os dados apresentados como média $\pm$ EPM da somatória de glicemia observada de 6 animais até 2h após a realização dos testes. ($p < 0,05$; Two-Way ANOVA seguido de teste de Bonferroni). (a) Diferença significativa comparada ao grupo DP ($p < 0,05$). (b) Diferença significativa em comparação ao grupo DC ($p < 0,05$).

Tabela 2 - Caracterização do modelo de obesidade induzida por dieta de cafeteria.

	DP	DP + CV	DC	DC + CV
Ganho de Peso (g)	203,5 ± 11,57	155,2 ± 11,85 ^a	269,2 ± 15,52 ^a	164,4 ± 6,50 ^b
IA (g/100g PC)	3,44 ± 0,35	2,67 ± 0,14	5,13 ± 0,30 ^a	3,64 ± 0,26
Epididimal (g/100g PC)	1,44 ± 0,05	1,07 ± 0,08 ^a	1,90 ± 0,12 ^a	1,33 ± 0,08 ^b
Subcutâneo (g/100g PC)	0,84 ± 0,06	0,54 ± 0,05	1,47 ± 0,13 ^a	0,87 ± 0,11 ^b
Perirrenal (g/100g PC)	1,00 ± 0,03	0,44 ± 0,03 ^a	1,28 ± 0,13 ^a	0,79 ± 0,14 ^b
Tecido Adiposo Marrom (g/100g PC)	0,09 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,15 ± 0,01 ^a	0,14 ± 0,01 ^a
Leptina (ng/mL)	5101 ± 126,7	5015 ± 247,1	6627 ± 237,3 ^a	6680 ± 246,4
AGL (μM)	245,7 ± 30,2	274,9 ± 19,2	326,5 ± 12,4 ^a	216,0 ± 19,0 ^b

IA= Índice de Adiposidade; PC= Peso Corporal. ANOVA de duas vias ($p < 0,05$). (DP=dieta padrão; DC=dieta cafeteria, CV=chá verde) (a) Diferença significativa comparada ao grupo DP; (b) Diferença significativa comparada ao grupo DC.

Figura 8 - Migração de neutrófilos avaliada pelo ensaio de quimiotaxia.

Neutrófilos ($2,5 \times 10^6$ células) foram ativados com fMLP (10 nM) por 60 min. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM de 5 animais ($p < 0,05$; Two-Way ANOVA seguido de teste de Bonferroni). (DP=dieta padrão; DC=dieta cafeteria, CV=chá verde) (a) Diferença significativa comparada ao grupo DP sem tratamento ($p < 0,001$). (b) Diferença significativa comparada ao grupo DC sem tratamento ($p < 0,01$).

Figura 9 - Avaliação da capacidade fagocítica de neutrófilos desafiados com partículas de zimosan opsonizadas.

Escore da capacidade fagocítica de neutrófilos (5×10^5 células) incubados por 30 min com partículas de zimosan opsonizado. Os resultados são apresentados como média $\pm$ EPM de 5 animais, ($p < 0,05$; Two-Way ANOVA seguido de teste de Bonferroni). (DP=dieta padrão; DC=dieta cafeteria, CV=chá verde) (a) Diferença significativa comparada ao grupo DP sem tratamento ($p < 0,05$). (b) Diferença significativa comparada ao grupo DP com CV ($p < 0,01$).

Figura 10 - Geração de ERO por neutrófilos pelo uso da sonda DHE.

Análise da fluorescência dos produtos de oxidação da sonda dihidroetidina ($5\mu\text{M}$) em neutrófilos (5×10^5) ativados ou não com PMA. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM de 5 animais, ($p < 0,05$ pelo teste de Two-Way ANOVA seguido de teste de Bonferroni). (DP=dieta padrão; DC=dieta cafeteria; CV=chá verde) (a) Diferença significativa comparada ao grupo DP sem tratamento ($p < 0,001$). (b) Diferença significativa comparada ao grupo DC ($p < 0,001$).

Figura 11 - Determinação do Estresse Oxidativo em neutrófilos por DCFH-DA.

Análise da fluorescência do composto DCF formado após oxidação da sonda DCFH por ERO em neutrófilos (5×10^5 células) ativados ou não com PMA por 60 min. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM de 5 animais, ($p < 0,05$; Two-Way ANOVA seguido de teste de Bonferroni). (DP=dieta padrão; DC=dieta cafeteria; CV=chá verde) (a) Diferença significativa comparada ao grupo DP sem tratamento ($p < 0,001$). (b) Diferença significativa comparada ao grupo DC sem tratamento ($p < 0,001$).

Figura 12 - Atividade da enzima mieloperoxidase em neutrófilos.

Análise da luminescência obtida a partir do luminol após sua oxidação pelo HOCl em neutrófilos (6×10^5 células) estimulados ou não com PMA por 30 min. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM de 5 animais. ($p < 0,05$; Two-Way ANOVA seguido de teste de Bonferroni). (DP=dieta padrão; DC=dieta cafeteria; CV=chá verde) (a) Diferença significativa, comparado ao grupo DP sem tratamento ($p < 0,01$).

Figura 13 - Geração de ácido hipocloroso em neutrófilos.

Neutrófilos (6×10^5 células) foram estimulados com PMA por 30 min. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM de 5 animais. ($p < 0,05$; Two-Way ANOVA seguido de teste de Bonferroni). (DP=dieta padrão; DC=dieta cafeteria; CV=chá verde) (a) Diferença significativa comparada ao grupo DP sem tratamento ($p < 0,001$). (b) Diferença significativa comparada ao grupo DC sem tratamento ($p < 0,05$).

Tabela 3 - Produção de interleucinas por neutrófilos.

	Basal	DP + LPS	DP + CV + LPS	DC + LPS	DC + CV + LPS
TNF-α	1441 $\pm$ 344	3852 $\pm$ 638	2711 $\pm$ 389	4519 $\pm$ 450 ^a	2437 $\pm$ 309 ^b
IL-6	4124 $\pm$ 920	21846 $\pm$ 975	8586 $\pm$ 2474 ^a	20983 $\pm$ 3909	7674 $\pm$ 3379 ^b
IL1-β	1406 $\pm$ 1123	2857 $\pm$ 340	2911 $\pm$ 454	3786 $\pm$ 386	2883 $\pm$ 145

Valores em pg/mL da produção de interleucinas por neutrófilos (1×10^6 células) estimulados com LPS (10 μ g/mL) por 18 h. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM de 5 animais. ($p < 0,05$ pelo teste de Two-Way ANOVA seguido de teste de Bonferroni). (DP=dieta padrão; DC=dieta cafeteria; CV=chá verde). (a) Diferença significativa comparada ao grupo DP + LPS ($p < 0,05$). (b) Diferença significativa comparada ao grupo DC + LPS ($p < 0,05$).

Figura 14 - Mobilização intracelular de cálcio em neutrófilos.

Área sob a curva da concentração de cálcio intracelular em neutrófilos (1×10^6 células) previamente incubados com Fura-2 AM ($5 \mu\text{M}$) durante 60 min e posteriormente estimulados com ácido palmítico (AG $0,3 \text{ mM}$) por 35 min. Os resultados estão apresentados como média $\pm$ EPM de 5 animais. ($p \leq 0,05$ pelo teste de Two-Way ANOVA seguido de teste de Bonferroni). (DP=dieta padrão; DC=dieta cafeteria; CV=chá verde) (a) Diferença significativa comparada ao grupo DP sem tratamento ($p < 0,01$). (b) Diferença significativa comparada ao grupo DP com CV ($p < 0,05$).

Tabela 4 - Atividade máxima de enzimas antioxidantes e metabólicas em neutrófilos.

		DP	DP Com CV	DC	DC Com CV
I	SOD Total	4,67 ± 0,23	3,27 ± 0,18 ^a	2,62 ± 0,36 ^a	1,97 ± 0,20 ^a
II	SOD Mn	0,21 ± 0,02	0,08 ± 0,01 ^a	0,12 ± 0,02 ^a	0,11 ± 0,01 ^a
III	CAT	0,85 ± 0,10	1,00 ± 0,18	2,23 ± 0,41 ^a	0,87 ± 0,07 ^{a, b}
IV	GPx	61,32 ± 5,70	64,12 ± 5,40	54,50 ± 3,18	52,29 ± 2,29
V	GR	625,8 ± 156,1	893,2 ± 55,76	637,3 ± 73,83	725,4 ± 50,46
VI	Hexoquinase	3,44 ± 0,41	2,14 ± 0,18	5,11 ± 0,44 ^a	5,01 ± 0,54
VII	G6PDH	7,24 ± 0,76	1,06 ± 0,05 ^a	1,72 ± 0,19 ^a	0,78 ± 0,06 ^a

I. (U/mg de proteína);

II. (U/mg de proteína);

III. (μmol/min/mg de proteína);

IV. (mU/mg de proteína).

V. (mU/mg de proteína);

VI. (nmol/min/mg de proteína);

VII. (μmol/min/mg de proteína).

Os resultados estão apresentados como média ± EPM de 5 animais, (p<0,05; Two-Way ANOVA seguido de teste de Bonferroni). (DP=dieta padrão; DC=dieta cafeteria; CV=chá verde) (a) Diferença significativa comparada ao grupo DP (p<0,05). (d) Diferença significativa comparada ao grupo DC (p<0,01).

6 DISCUSSÃO

Neste estudo demonstramos que a alimentação de animais com dieta de cafeteria (hipercalórica) durante 8 semanas foi capaz de promover alterações na capacidade funcional de neutrófilos, levando a diminuição de suas funções efetoras. Com intuito de investigar as ações do extrato de *Camellia sinensis* na funcionalidade dessas células e na busca de melhorar a condição inflamatória observada na obesidade, os animais foram suplementados com 500 mg de extrato de chá verde/ kg de peso corpóreo do animal durante 12 semanas, totalizando 60 dias de tratamento.

Para garantir que a dieta de cafeteria ocasionou a instalação do quadro de obesidade nos nossos animais, avaliamos alguns parâmetros bioquímicos característicos da obesidade. A caracterização do modelo de obesidade demonstrou que a dieta hipercalórica induziu o aumento do ganho de peso, aumentou o índice de adiposidade e os depósitos de gordura epididimal, subcutânea e perirrenal dos animais. A suplementação com o extrato de chá verde reverteu estes parâmetros, devido às suas propriedades antiobesidade já bem descritas, provavelmente aumentando o gasto energético através da redução da expressão de enzimas lipogênicas.

Em relação aos parâmetros bioquímicos, encontramos um aumento na concentração plasmática de leptina, uma importante adipocina secretada pelo tecido adiposo com funções na manutenção da homeostase metabólica, incluindo a sensibilidade à insulina, regulação dos depósitos energéticos, diminuindo a ingestão alimentar e aumentando o gasto energético (JEQUIER, 2002) e a concentração sérica de AGL. Os ácidos graxos livres também foram aumentados no nosso modelo de obesidade e sabe-se que estão bastante envolvidos no desenvolvimento da resistência à insulina, através da estimulação da gliconeogênese e glicogenólise. Neste estudo a resistência à insulina foi confirmada pelos testes de GTT e ITT realizados em nossos animais. O tratamento com chá verde reverteu estas alterações.

Há muitas evidências de que o chá verde apresenta efeitos antihiperglicemiantes e antidiabéticos, promovendo a redução da absorção de glicose através da inibição da enzima α -glicosidase, enzima chave que catalisa a etapa final do processo digestivo dos carboidratos, retardando a liberação de glicose na dieta, reduzindo a captação de glicose no intestino e aumentando a captação de

glicose pelo músculo enquanto diminui no tecido adiposo (MATSUI et al., 2007). Embora o tratamento de animais obesos com extrato de chá verde (DC+CV) tenha sido capaz de diminuir os níveis de AGL em relação ao grupo obeso, não diminuiu a concentração plasmática de leptina. Esta caracterização foi de extrema importância para garantirmos que nos experimentos utilizando neutrófilos, estes eram provenientes de animais obesos.

Obesidade e inflamação são dois fatores que se inter-relacionam. Muitos trabalhos têm mostrado a resposta inflamatória observada em indivíduos obesos como um processo multifatorial que pode ser mediada por células do sistema imune, dentre elas os neutrófilos. A exposição destas células a diversos agentes como o AGL e LPS, ambos sensibilizadores de receptores TLR4, assim como TNF- α e a leptina, podem levar ao estado *priming* de neutrófilos circulantes. Embora o estado *priming* destas células não ocasione a ativação celular, neutrófilos *primed* uma vez que, aguardando um estímulo subsequente, são ativados e promovem uma resposta exacerbada ao se comparar a resposta promovida por células *non-primed* ativadas (HALLETT; LLOYDS, 1995).

Para exercer todas as suas funções efectoras, os neutrófilos requerem uma grande produção de energia. Na condição de obesidade, nós encontramos alterações em parâmetros metabólicos, como a atividade das enzimas hexoquinase e G6PDH, que metabolizam glicose, a principal fonte de produção de energia em neutrófilos. Trabalhos mostram que a ativação de TLR4 em neutrófilos pode culminar na ativação de MAPK p38 e ativação do fator de transcrição HIF-1, levando ao aumento da expressão de GLUT-1 (SCHUSTER et al., 2007). Assim, hipotetizamos que o grande aporte calórico, devido à dieta de cafeteria ofertada aos animais para induzir a obesidade e o aumento de GLUT-1 na membrana (via estimulação de TLR4) favoreceriam a entrada de glicose para a célula, aumentando a atividade da enzima chave para o metabolismo da glicose, a hexoquinase conforme observado neste estudo (**Tabela 4**). Apesar do aumento na atividade da hexoquinase em neutrófilos de ratos obesos, a atividade da G6PDH apresentou-se diminuída (**Tabela 4**).

A G6PDH forma uma via alternativa de oxidação da glicose-6-fosfato, levando à geração de NADPH, que é exigido por enzimas responsáveis pela produção de radicais livres, como a iNOS e a NADPH-oxidase, enzimas antioxidantes como a GR e também necessário para a formação de novas proteínas, DNA ou RNA, sendo de suma importância para a homeostase celular. A deficiência da enzima G6PDH

acarreta em redução da razão NADPH/NADP⁺ intracelular, debilitando as defesas antioxidantes, podendo culminar em dano oxidativo à célula (HO; CHENG; CHIU, 2007). Embora o tratamento de animais obesos com o extrato de chá verde (DC+CV) não tenha apresentado uma melhora na atividade desta via metabólica, as funções celulares não foram debilitadas.

O neutrófilo é uma célula cuja meia vida é muito curta, e desta forma nossos resultados sugerem que a sensibilização destas células ocorra de maneira constante na obesidade, visto que há o aumento de AGL plasmático (**Tabela 2**). Encontramos em nossas análises um aumento de interleucinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-1 β e uma diminuição da capacidade migratória dessas células em animais obesos (DC). Tanto o aumento de interleucinas, quanto a diminuição da capacidade migratória de neutrófilos talvez possa ser explicado pela capacidade dos AGL em estimular receptores TLR4 levando à ativação de fatores de transcrição como o NF κ B. A ativação inadequada de neutrófilos por produtos bacterianos e AGL pode resultar também na ativação sistêmica de TLR4. Nos neutrófilos pode ocorrer a dessensibilização e internalização do receptor de quimiocina IL-8 (CXCR2), de fMLP (fMLPR) e diminuição de moléculas de adesão tais como L-selectina. O aumento de quimiocinas e citocinas circulantes também pode levar a dessensibilização e internalização de CXCR2, por promover sua ativação constante e excessiva. Deste modo, o rolamento/aderência e a quimiotaxia de neutrófilos são reduzidos e como consequência tem-se diminuição da migração de neutrófilos (ALVES-FILHO et al., 2008; RIOS-SANTOS et al., 2007).

Nossos resultados reforçam estes achados. A migração de neutrófilos de ratos obesos foi atenuada na obesidade na presença de fMLP (**Figura 8**). A MAPK p38 tem sido mostrada ser capaz de se ligar e fosforilar o receptor de fMLP. Esta fosforilação previne a ligação da GRK2, proteína que dessensibiliza o receptor fMLP (LIU et al., 2012). Embora sensibilizadores de TLR4 não sejam agentes quimiotáticos podem agir como um sinal *stoping*, substituindo agentes quimioatrativos, ação também atribuída à citocina TNF- α (HEIT et al., 2002; LOKUTA; HUTTENLOCHER, 2005). Sendo assim, a ativação de p38 MAPK, uma via de sinalização fundamental para quimiotaxia induzida por fMLP, pode interromper este processo quimiotático (PHILLIPSON, MIA; KUBES, PAUL, 2011). Nossa hipótese seria de que o aumento de AGL no plasma de animais obesos observado neste estudo, assim como os níveis de TNF- α podem estar contribuindo para a

ativação dessas células, de modo a ativar a p38 MAPK, levando a diminuição da atividade quimiotática.

Nossos resultados mostram também uma melhora na atividade quimiotática de neutrófilos de animais obesos tratados com o extrato de chá verde e estimulados com fMLP (**Figura 8**). Este efeito pode ser explicado pelo fato da EGCG diminuir a sinalização via TLR4 conforme já relatado por Hong Byun et al. (2010) e assim diminuir a expressão proteica de algumas citocinas como IL-6, bloqueando ou/atenuando a ligação do fator NF κ B ao DNA, inibindo a fosforilação de ERK1/2, JNK e p38 (FUJIMURA; TACHIBANA; YAMADA, 2004; JOO et al., 2012). Este fato corrobora com os resultados que obtivemos relacionados à redução da liberação de citocinas pró-inflamatórias IL-6 e TNF- α e IL1- β por neutrófilos de animais obesos suplementados com extrato de chá verde (**Tabela 3**).

Também demonstramos neste estudo um aumento da capacidade fagocítica das células frente à obesidade (**Figura 9**). Dados da literatura relatam que na condição de obesidade um hormônio secretado pelas células adiposas após o armazenamento excessivo de nutrientes, a leptina, pode atuar de forma direta na estimulação de neutrófilos na corrente sanguínea, se ligando à receptores de leptina na membrana celular ou de modo indireto, por meio da estimulação da liberação de TNF- α . Essa ação pode levar ao aumento na expressão de receptores de complemento do tipo CD11b-CR3 (MOORE et al., 2003). Assim, o aumento da expressão do CR3 facilita a fagocitose de partículas opsonizadas com C3bi e o recrutamento de neutrófilos ao sítio da inflamação (HED et al., 1988; O'SHEA et al., 1985). De acordo com estes achados, a leptina que apresenta-se aumentada em nosso modelo de obesidade pode estar aumentando a expressão de tais receptores, e em decorrência disto, podemos observar uma maior taxa de partículas fagocitadas por neutrófilos de ratos obesos.

Nossos resultados também mostraram uma diminuição da capacidade fagocítica de neutrófilos de animais controle que foram suplementados com extrato de chá verde (DP+CV) e tal fato pode ser justificado pela capacidade da EGCG de modular a expressão de receptores Fc ϵ R1 específico para IgE. Embora neutrófilos expressem mais receptores específicos para IgG (FcYRII), acredita-se que tal catequina pode agir de modo semelhante, atenuando a expressão deste receptor e a resposta ao agente opsonizado (FUJIMURA; TACHIBANA; YAMADA, 2001; 2004). A suplementação com extrato de chá verde diminuiu a ingestão de partículas, contudo,

o tratamento dos animais obesos com chá verde não afetou negativamente a capacidade fagocítica de neutrófilos.

Na fagocitose, após a ingestão e formação do fagolisossomo, inicia-se o processo de morte bacteriana. Este processo é acompanhado pela ativação da NADPH-oxidase, um complexo enzimático que se organiza na membrana fagossomal e converte oxigênio para o radical ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$). O $O_2^{\cdot-}$ é gerado na superfície exterior (isto é, no interior do fagossoma) com equivalentes redutores fornecidos pelo NADPH intracelular (WINTERBOURN et al., 2006). A produção de superóxido é importante para uma defesa antimicrobiana eficaz, porém os oxidantes gerados excessivamente por neutrófilos, também podem danificar sua estrutura celular levando à disfunção das células ou até mesmo apoptose (MARTINDALE; HOLBROOK, 2002).

Os dados obtidos neste trabalho mostram um aumento na produção de ânion superóxido em neutrófilos de ratos obesos comparados aos ratos controle (**Figura 10**). De fato, os níveis de ERO estão aumentados na obesidade e síndrome metabólica, e a redução destes compostos foi observada com a perda de peso (ROBERTS et al., 2006; VINCENT; TAYLOR, 2006). A princípio esperava-se que o tratamento com o chá verde fosse efetivo, diminuindo os níveis de superóxido na obesidade. Porém houve um aumento em relação ao grupo obeso estimulado com PMA. Isso pode ser explicado pela estabilidade das catequinas. Considerando um sistema *in vivo*, a geração de metabólitos do chá, mais ativos que a EGCG, pode apresentar um efeito pró-oxidante (LI et al., 2010) levando a geração de ERO, conforme mencionado anteriormente.

O ânion superóxido gerado principalmente pela NADPH-oxidase é posteriormente dismutado a H_2O_2 , uma espécie muito mais reativa. A mensuração dos níveis de liberação de peróxido de hidrogênio é considerada como um parâmetro de avaliação da ativação de fagócitos e a sonda DCFH-DA é amplamente utilizada para a avaliação de estresse oxidativo (TSUCHIYA; SUEMATSU; SUZUKI, 1994). Desta forma, o método utilizando a sonda DCFH-DA é utilizado principalmente como indicador da produção de H_2O_2 (KESTON; BRANDT, 1965). Em nosso estudo, o grupo de animais obesos apresentou uma redução na geração de H_2O_2 em relação ao controle, ressaltando que o H_2O_2 é o principal substrato para a enzima MPO. Nesta análise também observamos um efeito pró-oxidante proveniente da suplementação com extrato de chá verde observado nos

animais obesos, havendo aumento na geração desta espécie reativa (**Figura 11**). Este fato é evidenciado em outros trabalhos, destacando a atividade preventiva das catequinas no câncer, levando a formação de H_2O_2 , através de um mecanismo de auto-oxidação (SANG et al., 2005). Embora este efeito pró-oxidante esteja presente na condição de obesidade, não observamos tal fenômeno em neutrófilos de animais alimentados com dieta padrão e estimulados com PMA, indicando que mudanças no microambiente ocasionadas pela dieta de cafeteria podem corroborar para tal efeito promovido pelo extrato de chá verde.

Mesmo com a demasiada geração de ERO no interior do fagolisossomo de neutrófilos, esta quantidade não é suficiente para eliminar totalmente as bactérias e outros microorganismos. Portanto, a enzima MPO produzida nos grânulos azurofílicos dos neutrófilos quando combinada com a H_2O_2 gera ácido hipocloroso que apresenta uma atividade antimicrobiana mais eficaz. Já foi demonstrada a alta correlação entre a superexpressão da MPO com o quadro de hiperlipidemia e ganho de peso (CASTELLANI et al., 2006) e a superativação de neutrófilos, levando ao aumento plasmático de MPO e calprotectina em pacientes com obesidade mórbida (NIJHUIS et al., 2009). Contudo, a atividade da MPO não tem sido analisada nesses estudos. Em nosso trabalho analisamos a atividade desta enzima (**Figura 12**) e nossos dados mostram que na condição de obesidade há redução da atividade da enzima MPO e consequentemente uma deficiência na geração do seu produto HOCl (**Figura 13**). Uma das hipóteses para a atenuação da atividade da MPO é o fato desta enzima poder se complexar com o $O_2^{\cdot -}$ gerado em excesso na obesidade, levando à sua inativação, diminuindo assim sua atividade (WINTERBOURN; KETTLE, 2004). Também têm sido relatado sua capacidade em formar complexos com o receptor CD11b aumentado na obesidade e, através desta interação pode haver a ativação da via de sinalização mediada por TLR, aumentando a translocação de NF κ B para o núcleo (LAU et al., 2005).

A diminuição da atividade desta enzima pode levar a sérios prejuízos relacionados à defesa contra patógenos, uma vez que os neutrófilos necessitam desta enzima para exercer sua atividade microbicida. A formação de HOCl é importante, pois tem uma variedade de ações dentre elas, ação bactericida e fungicida (HURST, 2012; KLEBANOFF, 2005). A diminuição na formação do HOCl vista em nossos dados, pode possivelmente ser consequência da diminuição da atividade enzimática da MPO e a ausência do principal substrato desta enzima, o

H₂O₂, como vimos em nossos resultados (**Figura 11**). Assim neutrófilos de animais obesos, deficientes na produção de um dos mais potentes agentes microbicidas, o HOCl, não são capazes de eliminar o agente fagocitado. Esses resultados juntos indicam uma deficiência dessas células, pois embora tenham uma melhora na capacidade fagocítica, sua capacidade de eliminar e combater ameaças ao organismo está debilitada pela obesidade. Entretanto, uma fragilidade do nosso estudo foi não termos avaliado a capacidade fungicida dessas células, o que poderia reforçar nossa hipótese. Nossos dados mostram que o tratamento de animais obesos com extrato de chá verde apresentou uma melhora na produção de HOCl, embora a atividade da MPO não tenha se alterado. Este resultado pode se correlacionar com a atividade pró-oxidante das catequinas em melhorar a geração do principal substrato para a formação de HOCl. Esse aumento da geração de HOCl pode representar uma melhora na capacidade funcional destas células.

A fim de traçar um possível mecanismo pelo qual essas mudanças estão ocorrendo, verificamos a mobilização intracelular de Ca²⁺ (**Figura 14**), pois muitas das atividades pró-inflamatórias do neutrófilo, são dependentes da mobilização de Ca²⁺ armazenados em vesículas, mitocôndria, ou até mesmo provenientes do influxo através de canais de cálcio (TINTINGER; STEEL; ANDERSON, 2005). Desde os primeiros estudos realizados por Stossel (1973), foi demonstrado o papel do cálcio na fagocitose. Além disso, outros estudos mostram que os sinais de Ca²⁺ controlam também a proliferação, diferenciação, apoptose, geração de ERO e uma variedade de vias de transcrição gênica (HOGAN et al., 2003; HOGAN; RAO, 2007; LEWIS, 2007; NUNES; DEMAUREX, 2010; STOSSEL, 1973).

Mostramos neste estudo um aumento na mobilização intracelular de cálcio tanto nos grupos tratados com a dieta hipercalórica, quanto nos grupos suplementados com extrato de chá verde. Embora haja um aumento na mobilização de Ca²⁺ no grupo obeso, alguns parâmetros analisados que necessitam desta mobilização, como por exemplo, a quimiotaxia não foi melhorada. Isto indica que as alterações observadas são independentes desta mobilização, podendo estar relacionadas com outras vias intracelulares conforme mencionado anteriormente. Curiosamente, observamos que a suplementação com extrato de chá verde promoveu um grande aumento na mobilização deste íon. Já foi demonstrado que flavonoides presentes na dieta promovem o aumento da captação mitocondrial de Ca²⁺, processo importante na regulação da produção de ATP, na permeabilidade de

poros envolvida no processo apoptose e na regulação de alguns processos dependentes de alta concentração de Ca^{2+} citosólico, como a secreção. Embora os neutrófilos apresentem baixa quantidade de mitocôndrias e retículo endoplasmático escasso, acreditamos que esta mobilização a favor da captação de Ca^{2+} possa estar ocorrendo em outra organela bastante abundante em células PMN, os lisossomos que também apresentam um sistema de bomba de captação de Ca^{2+} ATP-dependente (KLEMPER, 1985). Outros trabalhos relatam que a EGCG é capaz de causar um aumento de Ca^{2+} citosólico dependente de estoques intracelulares, em neurônios do hipocampo e em células U87 de astrocitoma humano, o que sugere fortemente a ativação da liberação de Ca^{2+} a partir do lúmen do retículo endoplasmático. Este efeito parece ser em parte devido à ativação de PLC, acompanhada por um aumento da formação de fosfatos de inositol e pode ser parcialmente atenuada por inibidores de PLC (REVESZ et al., 2011). Em nosso modelo, este efeito pode ser benéfico para neutrófilos, visto que suas funções são dependentes da mobilização de Ca^{2+} intracelular. Além disso, este fato pode estar melhorando o desempenho dos neutrófilos frente a possíveis ameaças ao organismo de indivíduos obesos.

Em resumo, o presente estudo mostra que em resposta à obesidade induzida por uma dieta hipercalórica (cafeteria), neutrófilos apresentam-se alterados de modo a afetar suas atividades efectoras como atividade quimiotática e microbicida, uma vez que há um déficit na migração, produção de H_2O_2 e HOCl, acompanhada pelo declínio da atividade da MPO, algumas enzimas antioxidantes e do metabolismo, além do aumento da liberação de $\text{TNF-}\alpha$. Embora a capacidade fagocítica e a mobilização intracelular de Ca^{2+} tenham sido aumentadas, todos os demais resultados são indicativos de um estado de déficit funcional dessas células. Esses resultados estão representados na **Figura 15**.

Nossos resultados mostram ainda que o tratamento com 500 mg de extrato de chá verde/Kg de peso corpóreo, na condição de obesidade mostrou-se capaz de melhorar tanto parâmetros característicos da obesidade, quanto parâmetros funcionais de neutrófilos, restaurando algumas das funções debilitadas, levando ao aumento da resposta ao estímulo quimiotático, agindo como um pró-oxidante através do aumento dos níveis de H_2O_2 , substrato para enzima MPO e, consequente aumento da formação do seu produto, o HOCl. Além disso, observamos uma

diminuição na liberação das citocinas TNF- α e IL-6 e aumento na mobilização de Ca^{2+} independente da condição de obesidade (**Figura 15**).

Desta forma este estudo mostra um importante efeito imunomodulador do chá verde na obesidade no que se refere à função de neutrófilos. No entanto, outros estudos são necessários para compreender melhor os mecanismos envolvidos nos resultados encontrados neste estudo. Estes resultados abrem uma nova perspectiva de novas terapias com compostos bioativos auxiliando o sistema imune de indivíduos com obesidade, com o intuito de melhorar parâmetros funcionais de neutrófilos, podendo representar um importante impacto clínico e na qualidade de vida desses pacientes.

animais induzidos a obesos. Também foi observado uma redução na via de sinalização TLR4, diminuindo as interleucinas TNF- α , IL-6 e IL-1 β e melhorando a atividade quimiotática, uma vez possivelmente pela não ativação da MAPK p38. A atividade fagocítica e a mobilização de Ca²⁺ se mantiveram elevadas. A produção de O₂⁻ e H₂O₂ também foi aumentada, assim como de HOCl, havendo uma redução na atividade da CAT, evidenciando uma atividade pró-oxidante do extrato agindo neste tipo celular.

7 CONCLUSÕES

Parâmetros característicos da obesidade:

1. Houve aumento no peso corpóreo, índice de adiposidade, depósitos de gordura, resistência à insulina, aumento de leptina e AGL nos animais obesos.
2. O tratamento com extrato de chá verde foi capaz de diminuir e restaurar estes valores, com exceção da concentração plasmática de leptina.

Parâmetros funcionais de neutrófilos:

3. A capacidade fagocítica dessas células apresentou-se aumentada na condição de obesidade enquanto a capacidade quimiotáxida de neutrófilos mostrou-se atenuada. O tratamento com chá verde melhorou a migração dessas células e não alterou a fagocitose;
4. A capacidade microbicida das células parece estar prejudicada no modelo de obesidade, devido a redução da atividade da enzima MPO e do seu produto HOCl;
5. O tratamento crônico com extrato de chá verde apresentou ações pró-oxidantes, somente na condição de obesidade, evidenciadas pelo aumento de $O_2^{\cdot-}$, H_2O_2 e HOCl, melhorando a resposta microbicida de neutrófilos;
6. Houve aumento na liberação das interleucinas IL1- β e TNF- α e o tratamento de ratos obesos com extrato de chá verde promoveu uma diminuição na liberação destas interleucinas e da IL-6, o que pode diminuir o estado inflamatório;
7. A mobilização intracelular de Ca^{2+} foi maior tanto nos animais induzidos à obesidade quanto nos animais tratados com extrato de chá verde, independente da condição de obesidade;
8. Algumas das enzimas antioxidantes e metabólicas de neutrófilos foram alteradas pela condição de obesidade, e o tratamento com chá verde foi capaz de modular algumas destas enzimas alteradas pela obesidade.

REFERÊNCIAS¹

- ADAMS, D. O.; HAMILTON, T. A. The cell biology of macrophage activation. **Annu Rev Immunol.**, v. 2, p. 283-318, 1984.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymol.**, v. 105, p. 121-126, 1984.
- AHERNE, S. A.; O'BRIEN, N. M. Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. **Nutrition**, v. 18, n. 1, p. 75-81, 2002.
- AKHTAR, N.; HAQQI, T. M. Epigallocatechin-3-gallate suppresses the global interleukin-1beta-induced inflammatory response in human chondrocytes. **Arthritis Res Ther.**, v. 13, n. 3, p. R93, 2011.
- AL-AMRI, J. S.; HAGRAS, M. M.; MOHAMED, I. M. Effect of epigallocatechin-3-gallate on inflammatory mediators release in LPS-induced Parkinson's disease in rats. **Indian J Exp Biol.**, v. 51, n. 5, p. 357-362, 2013.
- ALVES-FILHO, J. C. et al. The role of neutrophils in severe sepsis. **Shock**, v. 30 Suppl 1, p. 3-9, 2008.
- BABIOR, B. M. NADPH oxidase: an update. **Blood**, v. 93, n. 5, p. 1464-1476, 1999.
- _____. NADPH oxidase. **Curr Opin Immunol.**, v. 16, n. 1, p. 42-47, 2004.
- BABU, P. V.; LIU, D. Green tea catechins and cardiovascular health: an update. **Curr Med Chem.**, v. 15, n. 18, p. 1840-1850, 2008.
- BALUCHNEJADMOJARAD, T.; ROGHANI, M. Chronic epigallocatechin-3-gallate ameliorates learning and memory deficits in diabetic rats via modulation of nitric oxide and oxidative stress. **Behav Brain Res.**, v. 224, n. 2, p. 305-310, 2011.
- BARTHELMAN, M. et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibition of ultraviolet B-induced AP-1 activity. **Carcinogenesis**, v. 19, n. 12, p. 2201-2204, 1998.
- BECKMAN, C. H. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? **Physiol Mol Plant P.**, v. 57, n. 3, p. 101-110, 2000.
- BERRIDGE, M. J. Inositol trisphosphate and calcium signalling. **Nature**, v. 361, n. 6410, p. 315-325, 1993.
- BEZERRA, F. J. L. et al. Avaliação de parâmetros antioxidantes em ratos tratados com sevoflurano. **Rev Bras Anest.**, v. 60, p. 162-165, 2010.
- BODE, A. M.; DONG, Z. Epigallocatechin 3-gallate and green tea catechins: United they work, divided they fail. **Cancer Prev Res.**, v. 2, n. 6, p. 514-517, 2009.
- BORREGAARD, N. Neutrophils, from marrow to microbes. **Immunity**, v. 33, n. 5, p. 657-670, 2010.
- 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. 248-254, 1976.

¹ De acordo com:

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

- BRETON, A.; DESCOTEAUX, A. Protein kinase C- α participates in Fc γ R-mediated phagocytosis in macrophages. **Biochem Bioph Res Co.**, v. 276, n. 2, p. 472-476, 2000.
- BURKERT, N. T. et al. The influence of socioeconomic factors on health parameters in overweight and obese adults. **PLoS One**, v. 8, n. 6, p. e65407, 2013.
- BYUN, E. B. et al. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits TLR4 signaling through the 67-kDa laminin receptor on lipopolysaccharide-stimulated dendritic cells. **Biochem Bioph Res Co.**, v. 426, n. 4, p. 480-485, 2012.
- CAI, Y.; ANAVY, N. D.; CHOW, H. H. Contribution of presystemic hepatic extraction to the low oral bioavailability of green tea catechins in rats. **Drug Metab Dispos.**, v. 30, n. 11, p. 1246-1249, 2002.
- CAMPOIO, T. R.; OLIVEIRA, F. A.; OTTON, R. Oxidative stress in human lymphocytes treated with fatty acid mixture: role of carotenoid astaxanthin. **Toxicol In Vitro.**, v. 25, n. 7, p. 1448-1456, 2011.
- CARON, E.; HALL, A. Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. **Science**, v. 282, n. 5394, p. 1717-1721, 1998.
- CARR, A. C.; MCCALL, M. R.; FREI, B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. **Arterioscl Throm Vasc Biol.**, v. 20, n. 7, p. 1716-1723, 2000.
- CASTELLANI, L. W. et al. Transgenic mice express human MPO -463G/A alleles at atherosclerotic lesions, developing hyperlipidemia and obesity in -463G males. **J Lipid Res.**, v. 47, n. 7, p. 1366-1377, 2006.
- CESARETTI, M. L.; KOHLMANN JUNIOR, O. [Experimental models of insulin resistance and obesity: lessons learned]. **Arq Bras Endocrinol Metabl.**, v. 50, n. 2, p. 190-197, 2006.
- CHACKO, S. M. et al. Beneficial effects of green tea: a literature review. **Chin Med.**, v. 5, p. 13, 2010.
- CHAN, M. M. et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity by epigallocatechin gallate, a natural product from green tea. **Biochem Pharmacol.**, v. 54, n. 12, p. 1281-1286, 1997.
- CHEN, L. et al. Absorption, distribution, elimination of tea polyphenols in rats. **Drug Metab Dispos.**, v. 25, n. 9, p. 1045-1050, 1997.
- CHOW, H.-H. S. et al. Pharmacokinetics and Safety of Green Tea Polyphenols after Multiple-Dose Administration of Epigallocatechin Gallate and Polyphenon E in Healthy Individuals. **Clin Cancer Res.**, v. 9, n. 9, p. 3312-3319, 2003.
- CHRISTOPHE, T. et al. Human complement 5a (C5a) anaphylatoxin receptor (CD88) phosphorylation sites and their specific role in receptor phosphorylation and attenuation of G protein-mediated responses. Desensitization of C5a receptor controls superoxide production but not receptor sequestration in HL-60 cells. **J Biol Chem.**, v. 275, n. 3, p. 1656-1664, 2000.
- CLARKE, J. H. R. R., S. M. K.; BRIDI, R. Um alerta sobre o uso de produtos de origem vegetal na gravidez. **Infarma**, v. 19, n. 1/2, p. 41-48, 2007.
- COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 885-891, 2002.
- COOPER, R. Green tea and theanine: health benefits. **Int J Food Sci Nutr.**, v. 63 Suppl 1, p. 90-97, 2012.

COOPER, R.; MORRE, D. J.; MORRE, D. M. Medicinal benefits of green tea: Part I. Review of noncancer health benefits. **J Altern Complem Med.**, v. 11, n. 3, p. 521-528, 2005.

COTTAM, D. R. et al. The effect of obesity on neutrophil Fc receptors and adhesion molecules (CD16, CD11b, CD62L). **Obes Surg.** v. 12, n. 2, p. 230-235, 2002.

COTTAM, D. R. et al. Dysfunctional immune-privilege in morbid obesity: implications and effect of gastric bypass surgery. **Obes Surg.**, v. 13, n. 1, p. 49-57, 2003.

COX, D. et al. A requirement for phosphatidylinositol 3-kinase in pseudopod extension. **J Biol Chem.**, v. 274, n. 3, p. 1240-1247, 1999.

CRABTREE, B.; NEWSHOLME, E. A. The activities of phosphorylase, hexokinase, phosphofructokinase, lactate dehydrogenase and the glycerol 3-phosphate dehydrogenases in muscles from vertebrates and invertebrates. **Biochem J.**, v. 126, n. 1, p. 49-58, 1972.

CRUZ, W. A. S. **Atividade de mieloperoxidase e produção de oxigênio singlete em neutrófilos e células monocíticas.** 2010. 60 f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

DAERON, M. Fc receptor biology. **Annu Rev Immunol.**, v. 15, p. 203-234, 1997.

DAHLGREN, C.; KARLSSON, A. Respiratory burst in human neutrophils. **J Immunol Methods.**, v. 232, n. 1-2, p. 3-14, 1999.

DANILEWICZ, J. C. Review of Reaction Mechanisms of Oxygen and Proposed Intermediate Reduction Products in Wine: Central Role of Iron and Copper. **Am J Enol Viticult.**, v. 54, n. 2, p. 73-85, 2003.

DOEING, D. C.; BOROWICZ, J. L.; CROCKETT, E. T. Gender dimorphism in differential peripheral blood leukocyte counts in mice using cardiac, tail, foot, and saphenous vein puncture methods. **BMC Clin Pathol.**, v. 3, n. 1, p. 3, 2003.

DOWNEY, G. P. et al. Intracellular signaling in neutrophil priming and activation. **Sem Cell Biol.**, v. 6, n. 6, p. 345-356, 1995.

DYPBUKT, J. M. et al. A sensitive and selective assay for chloramine production by myeloperoxidase. **Free Radical Biol Med.**, v. 39, n. 11, p. 1468-1477, 2005.

EDBERG, J. C. et al. The Ca²⁺ dependence of human Fc gamma receptor-initiated phagocytosis. **J Biol Chem.**, v. 270, n. 38, p. 22301-22307, 1995.

EL-BENNA, J.; DANG, P. M.; GOUGEROT-POCIDALO, M. A. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. **Semin Immunopathol.**, v. 30, n. 3, p. 279-289, 2008.

EL-BENNA, J. et al. Phagocyte NADPH oxidase: a multicomponent enzyme essential for host defenses. **Arch Immunol Ther Exp.**, v. 53, n. 3, p. 199-206, 2005.

EL-BENNA, J. et al. p47phox, the phagocyte NADPH oxidase/NOX2 organizer: structure, phosphorylation and implication in diseases. **Exp Mol Med.**, v. 41, n. 4, p. 217-225, 2009.

ELGAZAR-CARMON, V. et al. Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding. **J Lipid Res.**, v. 49, n. 9, p. 1894-1903, 2008.

ERVIN, R. B. Prevalence of metabolic syndrome among adults 20 years of age and over, by sex, age, race and ethnicity, and body mass index: United States, 2003-2006. **Natl Health Stat Report.**, n. 13, p. 1-7, 2009.

EWING, J. F.; JANERO, D. R. Microplate superoxide dismutase assay employing a nonenzymatic superoxide generator. **Anal Biochem.**, v. 232, n. 2, p. 243-248, 1995.

FAURSCHOU, M.; BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes Infect.**, v. 5, n. 14, p. 1317-1327, 2003.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Ver Assoc Méd Bras.**, v. 43, p. 61-68, 1997.

FERWERDA, B. et al. Functional consequences of toll-like receptor 4 polymorphisms. **Mol Med.**, v. 14, n. 5-6, p. 346-352, 2008.

FLEGAL, K. M. et al. Cause-specific excess deaths associated with underweight, overweight, and obesity. **JAMA**, v. 298, n. 17, p. 2028-2037, 2007.

FONTAINE, K. R. et al. Years of life lost due to obesity. **JAMA**, v. 289, n. 2, p. 187-193, 2003.

FUJIMURA, Y. et al. Green tea polyphenol EGCG sensing motif on the 67-kDa laminin receptor. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. e37942, 2012.

FUJIMURA, Y.; TACHIBANA, H.; YAMADA, K. A tea catechin suppresses the expression of the high-affinity IgE receptor Fc epsilon RI in human basophilic KU812 cells. **J Agr Food Chem.**, v. 49, n. 5, p. 2527-2531, 2001.

_____. Lipid raft-associated catechin suppresses the FcepsilonRI expression by inhibiting phosphorylation of the extracellular signal-regulated kinase1/2. **FEBS Lett.**, v. 556, n. 1-3, p. 204-210, 2004.

FUJIMURA, Y.; YAMADA, K.; TACHIBANA, H. A lipid raft-associated 67kDa laminin receptor mediates suppressive effect of epigallocatechin-3-O-gallate on FcepsilonRI expression. **Biochem Bioph Res Co.**, v. 336, n. 2, p. 674-681, 2005.

FUZISSAKI, C. N. **Estudo da modulação de funções efetoras de neutrófilos humanos por derivados cumarínicos: avaliação do efeito biológico sobre a produção de espécies reativas de oxigênio e a desgranulação.** 2009. 33 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2009.

GARCIA-GARCIA, E.; ROSALES, R.; ROSALES, C. Phosphatidylinositol 3-kinase and extracellular signal-regulated kinase are recruited for Fc receptor-mediated phagocytosis during monocyte-to-macrophage differentiation. **J Leukocyte Biol.**, v. 72, n. 1, p. 107-114, 2002.

GARCIA-GARCIA, E.; SANCHEZ-MEJORADA, G.; ROSALES, C. Phosphatidylinositol 3-kinase and ERK are required for NF-kappaB activation but not for phagocytosis. **J Leukocyte Biol.** v. 70, n. 4, p. 649-658, 2001.

GILBERT, H. F. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. **Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol.**, v. 63, p. 69-172, 1990.

GOUNI-BERTHOLD, I.; SACHINIDIS, A. Molecular mechanisms explaining the preventive effects of catechins on the development of proliferative diseases. **Curr Pharm Des.**, v. 10, n. 11, p. 1261-1271, 2004.

GRAHAM, H. N. Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. **Prev Med.**, v. 21, n. 3, p. 334-350, 1992.

GRYNKIEWICZ, G.; POENIE, M.; TSIEN, R. Y. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. **J Biol Chem.**, v. 260, n. 6, p. 3440-3450, 1985.

GUIMARÃES, B. R. **Efeitos de um programa de exercícios do método pilates em indicadores metabólicos, inflamatórios e funcionais em obesas: Uma proposta à promoção de saúde**. 2012. 94 f. Dissertação (Mestre em Promoção de Saúde) - Universidade de Franca, Franca, 2012.

GUO, S. et al. Protective effects of green tea polyphenols in the 6-OHDA rat model of Parkinson's disease through inhibition of ROS-NO pathway. **Biol Psychiat.**, v. 62, n. 12, p. 1353-1362, 2007.

GUZIK, T. J.; HARRISON, D. G. Vascular NADPH oxidases as drug targets for novel antioxidant strategies. **Drug Discov Today.**, v. 11, n. 11-12, p. 524-533, 2006.

HALLETT, M. B.; LLOYDS, D. Neutrophil priming: the cellular signals that say 'amber' but not 'green'. **Immunol Today.**, v. 16, n. 6, p. 264-268, 1995.

HALLIWELL, B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? **Arch Biochem Biophys.**, v. 476, n. 2, p. 107-112, 2008.

HAMPTON, M. B.; KETTLE, A. J.; WINTERBOURN, C. C. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. **Blood**, v. 92, n. 9, p. 3007-3017, 1998.

HARTL, D. et al. Dysregulation of innate immune receptors on neutrophils in chronic granulomatous disease. **J Allergy Clin Immunol.**, v. 121, n. 2, p. 375-382 e379, 2008.

HARVEY, A. E.; LASHINGER, L. M.; HURSTING, S. D. The growing challenge of obesity and cancer: an inflammatory issue. **Ann NY Acad Sci.**, v. 1229, n. 1, p. 45-52, 2011.

HASLAM, D. W.; JAMES, W. P. Obesity. **Lancet**, v. 366, n. 9492, p. 1197-1209, 2005.

HATANAKA, E. et al. Systematic study on ROS production induced by oleic, linoleic, and gamma-linolenic acids in human and rat neutrophils. **Free Radical Biol Med.**, v. 41, n. 7, p. 1124-1132, 2006.

HATANAKA, E. et al. Interaction between serum amyloid A and leukocytes - a possible role in the progression of vascular complications in diabetes. **Immunol Lett.**, v. 108, n. 2, p. 160-166, 2007.

HED, J. et al. The expression of CR1 and CR3 on non-modulated and modulated granulocytes of healthy blood donors as measured by flow cytofluorometry. **Scand J Immunol.**, v. 28, n. 3, p. 339-344, 1988.

HEIT, B. et al. An intracellular signaling hierarchy determines direction of migration in opposing chemotactic gradients. **J Cell Biol.**, v. 159, n. 1, p. 91-102, 2002.

HENSON, P. M. Dampening inflammation. **Nat Immunol.**, v. 6, n. 12, p. 1179-1181, 2005.

HERISHANU, Y. et al. Leukocytosis in obese individuals: possible link in patients with unexplained persistent neutrophilia. **Eur J Haematol.**, v. 76, n. 6, p. 516-520, 2006.

HIRAHASHI, J. et al. Mac-1 signaling via Src-family and Syk kinases results in elastase-dependent thrombohemorrhagic vasculopathy. **Immunity**, v. 25, n. 2, p. 271-283, 2006.

HO, H. Y.; CHENG, M. L.; CHIU, D. T. Glucose-6-phosphate dehydrogenase--from oxidative stress to cellular functions and degenerative diseases. **Redox Rep.**, v. 12, n. 3, p. 109-118, 2007.

- HOGAN, P. G. et al. Transcriptional regulation by calcium, calcineurin, and NFAT. **Genes Dev.**, v. 17, n. 18, p. 2205-2232, 2003.
- HOGAN, P. G.; RAO, A. Dissecting ICRAC, a store-operated calcium current. **Trends Biochem Sci.**, v. 32, n. 5, p. 235-245, 2007.
- HONG BYUN, E. et al. TLR4 signaling inhibitory pathway induced by green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate through 67-kDa laminin receptor. **J Immunol.**, v. 185, n. 1, p. 33-45, 2010.
- HONG, C. et al. Coordinate regulation of neutrophil homeostasis by liver X receptors in mice. **J Clin Invest.**, v. 122, n. 1, p. 337-347, 2012.
- HONG, C. et al. Constitutive activation of LXR in macrophages regulates metabolic and inflammatory gene expression: identification of ARL7 as a direct target. **J Lipid Res.**, v. 52, n. 3, p. 531-539, 2011.
- HOOGERWERF, M. et al. Complement fragments C3b and iC3b coupled to latex induce a respiratory burst in human neutrophils. **Mol Immunol.**, v. 27, n. 2, p. 159-167, 1990.
- HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, v. 259, n. 5091, p. 87-91, 1993.
- HOU, Z. et al. Mechanism of action of (-)-epigallocatechin-3-gallate: auto-oxidation-dependent inactivation of epidermal growth factor receptor and direct effects on growth inhibition in human esophageal cancer KYSE 150 cells. **Cancer Res.**, v. 65, n. 17, p. 8049-8056, 2005.
- HOWARD, J. K.; FLIER, J. S. Attenuation of leptin and insulin signaling by SOCS proteins. **Trends Endocrin Metab.**, v. 17, n. 9, p. 365-371, 2006.
- HURST, J. K. What really happens in the neutrophil phagosome? **Free Radical Biol Med.**, v. 53, n. 3, p. 508-520, 2012.
- IHM, S. H. et al. Decaffeinated green tea extract improves hypertension and insulin resistance in a rat model of metabolic syndrome. **Atherosclerosis**, v. 224, n. 2, p. 377-383, 2012.
- IOTF. **The Global Epidemic**. IASO/IOTF. 2010
- JAKUS, Z. et al. Critical role of phospholipase C γ 2 in integrin and Fc receptor-mediated neutrophil functions and the effector phase of autoimmune arthritis. **J Exp Med.**, v. 206, n. 3, p. 577-593, 2009.
- JEQUIER, E. Leptin signaling, adiposity, and energy balance. **Ann NY Acad Sci.**, v. 967, p. 379-388, 2002.
- JEROME-MORAIS, A. et al. The effects of selenium and the GPx-1 selenoprotein on the phosphorylation of H2AX. **Biochim Biophys Acta.**, v. 1830, n. 6, p. 3399-3406, 2013.
- JOHNSON, A. R.; MILNER, J. J.; MAKOWSKI, L. The inflammation highway: metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity. **Immunol Rev.**, v. 249, n. 1, p. 218-238, 2012.
- JOO, S. Y. et al. Epigallocatechin-3-gallate Inhibits LPS-Induced NF- κ B and MAPK Signaling Pathways in Bone Marrow-Derived Macrophages. **Gut Liver**, v. 6, n. 2, p. 188-196, 2012.
- KAHN, S. E.; HULL, R. L.; UTZSCHNEIDER, K. M. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. **Nature**, v. 444, n. 7121, p. 840-846, 2006.

- KAMEI, N. et al. Overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in adipose tissues causes macrophage recruitment and insulin resistance. **J Biol Chem.**, v. 281, n. 36, p. 26602-26614, 2006.
- KAMP, V. M. et al. Physiological concentrations of leptin do not affect human neutrophils. **PLoS One**, v. 8, n. 9, p. e73170, 2013.
- KARIMI, K.; GEMMILL, T. R.; LENNARTZ, M. R. Protein kinase C and a calcium-independent phospholipase are required for IgG-mediated phagocytosis by Mono-Mac-6 cells. **J Leukocyte Biol.**, v. 65, n. 6, p. 854-862, 1999.
- KESTON, A. S.; BRANDT, R. THE FLUOROMETRIC ANALYSIS OF ULTRAMICRO QUANTITIES OF HYDROGEN PEROXIDE. **Anal Biochem.**, v. 11, p. 1-5, 1965.
- KETTLE, A. J.; VAN DALEN, C. J.; WINTERBOURN, C. C. Peroxynitrite and myeloperoxidase leave the same footprint in protein nitration. **Redox Rep.**, v. 3, n. 5-6, p. 257-258, 1997.
- KIM, J. A.; PARK, H. S. White blood cell count and abdominal fat distribution in female obese adolescents. **Metabolism**, v. 57, n. 10, p. 1375-1379, 2008.
- KIM, Y. J. et al. Nanoemulsified green tea extract shows improved hypocholesterolemic effects in C57BL/6 mice. **J Nutr Biochem.**, v. 23, n. 2, p. 186-191, 2012.
- KLEBANOFF, S. J. Myeloperoxidase: friend and foe. **J Leukocyte Biol.**, v. 77, n. 5, p. 598-625, 2005.
- KLEBANOFF, S. J. et al. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytosed microorganisms. **J Leukocyte Biol.**, v. 93, n. 2, p. 185-198, 2013.
- KLEMPER, M. S. An adenosine triphosphate-dependent calcium uptake pump in human neutrophil lysosomes. **J Clin Invest.**, v. 76, n. 1, p. 303-310, 1985.
- KLETZIEN, R. F.; HARRIS, P. K.; FOELLM, L. A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase: a "housekeeping" enzyme subject to tissue-specific regulation by hormones, nutrients, and oxidant stress. **FASEB J.**, v. 8, n. 2, p. 174-181, 1994.
- KOBAYASHI, S. D. et al. Neutrophils in the innate immune response. **Arch Immunol Ther Exp.**, v. 53, n. 6, p. 505-517, 2005.
- KOBAYASHI, S. D.; VOYICH, J. M.; DELEO, F. R. Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. **Microbes Infect.**, v. 5, n. 14, p. 1337-1344, 2003.
- KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nat Rev Immunol.**, v. 13, n. 3, p. 159-175, 2013.
- KOPELMAN, P.; JEBB, S. A.; BUTLAND, B. Executive summary: Foresight 'Tackling Obesity: Future Choices' project. **Obes Rev.**, v. 8 Suppl 1, p. vi-ix, 2007.
- KOPELMAN, P. G. Obesity as a medical problem. **Nature**, v. 404, n. 6778, p. 635-643, 2000.
- KOSTELI, A. et al. Weight loss and lipolysis promote a dynamic immune response in murine adipose tissue. **J Clin Invest**, v. 120, n. 10, p. 3466-3479, 2010.
- KU, H.-C. et al. Green tea (-)-epigallocatechin gallate inhibits insulin stimulation of 3T3-L1 preadipocyte mitogenesis via the 67-kDa laminin receptor pathway. **Am J Physiol-Cell Ph.**, v. 297, n. 1, p. C121-C132, 2009.
- KURUKULASURIYA, L. R. et al. Hypertension in obesity. **Med Clin N Am.**, v. 95, n. 5, p. 903-917, 2011.

- LAMARÃO, R. D. C.; FIALHO, E. Aspectos funcionais das catequinas do chá verde no metabolismo celular e sua relação com a redução da gordura corporal. **Rev Nutr.**, v. 22, p. 257-269, 2009.
- LAMBERT, J. D.; ELIAS, R. J. The antioxidant and pro-oxidant activities of green tea polyphenols: A role in cancer prevention. **Arch Biochem Biophys.**, v. 501, n. 1, p. 65-72, 2010.
- LAMBERT, J. D. et al. Epigallocatechin-3-gallate is absorbed but extensively glucuronidated following oral administration to mice. **J Nutr.**, v. 133, n. 12, p. 4172-4177, 2003.
- LAU, D. et al. Myeloperoxidase mediates neutrophil activation by association with CD11b/CD18 integrins. **P Natl Acad Sci USA.**, v. 102, n. 2, p. 431-436, 2005.
- LECUMBERRI, E. et al. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCG) as adjuvant in cancer therapy. **Clin Nutr.**, 2013.
- LEWIS, R. S. The molecular choreography of a store-operated calcium channel. **Nature**, v. 446, n. 7133, p. 284-287, 2007.
- LEY, K.; SMITH, E.; STARK, M. A. IL-17A-producing neutrophil-regulatory Tn lymphocytes. **Immunol Res.**, v. 34, n. 3, p. 229-242, 2006.
- LI, G. X. et al. Pro-oxidative activities and dose-response relationship of (-)-epigallocatechin-3-gallate in the inhibition of lung cancer cell growth: a comparative study in vivo and in vitro. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 5, p. 902-910, 2010.
- LI, W. et al. A major ingredient of green tea rescues mice from lethal sepsis partly by inhibiting HMGB1. **PLoS One**, v. 2, n. 11, p. e1153, 2007.
- LIESCHKE, G. J. et al. Mice lacking granulocyte colony-stimulating factor have chronic neutropenia, granulocyte and macrophage progenitor cell deficiency, and impaired neutrophil mobilization. **Blood**, v. 84, n. 6, p. 1737-1746, 1994.
- LIN, J.; DELLA-FERA, M. A.; BAILE, C. A. Green tea polyphenol epigallocatechin gallate inhibits adipogenesis and induces apoptosis in 3T3-L1 adipocytes. **Obes Res.**, v. 13, n. 6, p. 982-990, 2005.
- LIN, J. K.; LIN-SHIAU, S. Y. Mechanisms of hypolipidemic and anti-obesity effects of tea and tea polyphenols. **Mol Nutr Food Res.**, v. 50, n. 2, p. 211-217, 2006.
- LIN, Y. L.; LIN, J. K. (-)-Epigallocatechin-3-gallate blocks the induction of nitric oxide synthase by down-regulating lipopolysaccharide-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappaB. **Mol Pharmacol.**, v. 52, n. 3, p. 465-472, 1997.
- LIU, X. et al. Bidirectional regulation of neutrophil migration by mitogen-activated protein kinases. **Nat Immunol.**, v. 13, n. 5, p. 457-464, 2012.
- LOGUE, J. et al. Obesity is associated with fatal coronary heart disease independently of traditional risk factors and deprivation. **Heart**, v. 97, n. 7, p. 564-568, 2011.
- LOKUTA, M. A.; HUTTENLOCHER, A. TNF-alpha promotes a stop signal that inhibits neutrophil polarization and migration via a p38 MAPK pathway. **J Leukocyte Biol.**, v. 78, n. 1, p. 210-219, 2005.
- LOPEZ DEL AMO, J. M. et al. Structural properties of EGCG-induced, nontoxic Alzheimer's disease Abeta oligomers. **J Mol Biol.**, v. 421, n. 4-5, p. 517-524, 2012.
- LUO, H. R.; LOISON, F. Constitutive neutrophil apoptosis: mechanisms and regulation. **Am J Hematol.**, v. 83, n. 4, p. 288-295, 2008.

- MANSFIELD, P. J.; SHAYMAN, J. A.; BOXER, L. A. Regulation of polymorphonuclear leukocyte phagocytosis by myosin light chain kinase after activation of mitogen-activated protein kinase. **Blood**, v. 95, n. 7, p. 2407-2412, 2000.
- MARIN, D. P. et al. ROS production in neutrophils from alloxan-induced diabetic rats treated in vivo with astaxanthin. **Int Immunopharmacol.**, v. 11, n. 1, p. 103-109, 2011.
- MARTINDALE, J. L.; HOLBROOK, N. J. Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. **J Cell Physiol.**, v. 192, n. 1, p. 1-15, 2002.
- MATSUI, T. et al. alpha-Glucosidase inhibitory profile of catechins and theaflavins. **J Agr Food Chem.**, v. 55, n. 1, p. 99-105, 2007.
- MATSUZAWA, Y.; FUNAHASHI, T.; NAKAMURA, T. The concept of metabolic syndrome: contribution of visceral fat accumulation and its molecular mechanism. **J Atheroscler Throm.**, v. 18, n. 8, p. 629-639, 2011.
- MCPHAIL, L. C.; CLAYTON, C. C.; SNYDERMAN, R. The NADPH oxidase of human polymorphonuclear leukocytes. Evidence for regulation by multiple signals. **J Biol Chem.**, v. 259, n. 9, p. 5768-5775, 1984.
- MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C., JR. Innate immunity. **New Engl J Med.**, v. 343, n. 5, p. 338-344, 2000.
- MENARD, S. et al. New insights into the metastasis-associated 67 kD laminin receptor. **J Cell Biochem.**, v. 67, n. 2, p. 155-165, 1997.
- MESTAS, J.; HUGHES, C. C. Of mice and not men: differences between mouse and human immunology. **J Immunol.**, v. 172, n. 5, p. 2731-2738, 2004.
- MILLER, D. M.; BUETTNER, G. R.; AUST, S. D. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. **Free Radical Biol Med.**, v. 8, n. 1, p. 95-108, 1990.
- MOORE, S. I. et al. Leptin modulates neutrophil phagocytosis of *Klebsiella pneumoniae*. **Infect Immun.**, v. 71, n. 7, p. 4182-4185, 2003.
- MUKHTAR, H.; AHMAD, N. Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. **Am J Clin Nutr.**, v. 71, n. 6 Suppl, p. 1698S-1702S; discussion 1703S-1694S, 2000.
- MUNOZ, M.; MAZURE, R. A.; CULEBRAS, J. M. [Obesity and the immune system]. **Nutr Hosp.**, v. 19, n. 6, p. 319-324, 2004.
- MYERS, J. T.; SWANSON, J. A. Calcium spikes in activated macrophages during Fc gamma receptor-mediated phagocytosis. **J Leukocyte Biol.**, v. 72, n. 4, p. 677-684, 2002.
- NAKAGAWA, T.; YOKOZAWA, T. Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. **Food Chem Toxicol.**, v. 40, n. 12, p. 1745-1750, 2002.
- NAMMI, S. et al. Obesity: an overview on its current perspectives and treatment options. **Nutr J.**, v. 3, p. 3, 2004.
- NANCHAHAL, K. et al. Coronary heart disease risk in men and the epidemic of overweight and obesity. **Int J Obesity.**, v. 29, n. 3, p. 317-323, 2005.
- NGUYEN, M. T. et al. A subpopulation of macrophages infiltrates hypertrophic adipose tissue and is activated by free fatty acids via Toll-like receptors 2 and 4 and JNK-dependent pathways. **J Biol Chem.**, v. 282, n. 48, p. 35279-35292, 2007.

- NIJHUIS, J. et al. Neutrophil activation in morbid obesity, chronic activation of acute inflammation. **Obesity**, v. 17, n. 11, p. 2014-2018, 2009.
- NOELS, H.; WEBER, C. Catching up with important players in atherosclerosis: type I interferons and neutrophils. **Curr Opin Lipidol.**, v. 22, n. 2, p. 144-145, 2011.
- NUNES, P.; DEMAUREX, N. The role of calcium signaling in phagocytosis. **J Leukocyte Biol.**, v. 88, n. 1, p. 57-68, 2010.
- O'SHEA, J. J. et al. Activation of the C3b receptor: effect of diacylglycerols and calcium mobilization. **J Immunol.**, v. 135, n. 5, p. 3381-3387, 1985.
- OLEFSKY, J. M.; GLASS, C. K. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. **Annu Rev Physiol.**, v. 72, p. 219-246, 2010.
- OTERO, M. et al. Leptin, from fat to inflammation: old questions and new insights. **FEBS Lett.**, v. 579, n. 2, p. 295-301, 2005.
- PALMBLAD, J.; HALLBERG, D.; ENGSTEDT, L. Polymorphonuclear (PMN) function after small intestinal shunt operation for morbid obesity. **Brit J Haematol.**, v. 44, n. 1, p. 101-108, 1980.
- PAULI, J. R. et al. Novos mecanismos pelos quais o exercício físico melhora a resistência à insulina no músculo esquelético. **Arq Bras EndocrinolMetab.**, v. 53, p. 399-408, 2009.
- PHILLIPSON, M.; KUBES, P. The neutrophil in vascular inflammation. **Nat Med.**, v. 17, n. 11, p. 1381-1390, 2011.
- PHILLIPSON, M.; KUBES, P. The neutrophil in vascular inflammation. **Nat Med.**, v. 17, n. 11, p. 1381-1390, 2011.
- PILLAY, J. et al. In vivo labeling with $^2\text{H}_2\text{O}$ reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days. **Blood**, v. 116, n. 4, p. 625-627, 2010.
- PINHEIRO, A. R. D. O.; FREITAS, S. F. T. D.; CORSO, A. C. T. Uma abordagem epidemiológica da obesidade. **Rev Nutr.**, v. 17, p. 523-533, 2004.
- PITHON-CURI, T. C.; DE MELO, M. P.; CURI, R. Glucose and glutamine utilization by rat lymphocytes, monocytes and neutrophils in culture: a comparative study. **Cell Biochem Funct.**, v. 22, n. 5, p. 321-326, 2004.
- PRICOP, L. et al. Reactive oxygen intermediates enhance Fc gamma receptor signaling and amplify phagocytic capacity. **J Immunol.**, v. 162, n. 12, p. 7041-7048, 1999.
- RAEDER, E. M. et al. Syk activation initiates downstream signaling events during human polymorphonuclear leukocyte phagocytosis. **J Immunol.**, v. 163, n. 12, p. 6785-6793, 1999.
- RAHMAN, I.; BISWAS, S. K.; KIRKHAM, P. A. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. **Biochem Pharmacol.**, v. 72, n. 11, p. 1439-1452, 2006.
- RATES, S. M. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001.
- REVESZ, K. et al. Tea flavan-3-ols as modulating factors in endoplasmic reticulum function. **Nutr Res.**, v. 31, n. 10, p. 731-740, 2011.

- REZAI-ZADEH, K. et al. Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) reduces beta-amyloid mediated cognitive impairment and modulates tau pathology in Alzheimer transgenic mice. **Brain Res.**, v. 1214, p. 177-187, 2008.
- RICHARDSON, V. R.; SMITH, K. A.; CARTER, A. M. Adipose tissue inflammation: Feeding the development of type 2 diabetes mellitus. **Immunobiology**, v. 218, p. 1497-1504, 2013.
- RIETVELD, A.; WISEMAN, S. Antioxidant effects of tea: evidence from human clinical trials. **J Nutr.**, v. 133, n. 10, p. 3285S-3292S, 2003.
- RIOS-SANTOS, F. et al. Down-regulation of CXCR2 on neutrophils in severe sepsis is mediated by inducible nitric oxide synthase-derived nitric oxide. **Am J Respi Crit Care Med.**, v. 175, n. 5, p. 490-497, 2007.
- RIVAS-FUENTES, S. et al. Fcγ receptors exhibit different phagocytosis potential in human neutrophils. **Cell Immunol.**, v. 263, n. 1, p. 114-121, 2010.
- ROBARDS, K. et al. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chem.**, v. 66, n. 4, p. 401-436, 1999.
- ROBERTS, C. K. et al. Oxidative stress and dysregulation of NAD(P)H oxidase and antioxidant enzymes in diet-induced metabolic syndrome. **Metabolism**, v. 55, n. 7, p. 928-934, 2006.
- ROOS, D.; VAN BRUGGEN, R.; MEISCHL, C. Oxidative killing of microbes by neutrophils. **Microbes Infect.**, v. 5, n. 14, p. 1307-1315, 2003.
- ROSS, G. Role of the lectin domain of Mac-1/CR3 (CD11b/CD18) in regulating intercellular adhesion. **Immunol Res.**, v. 25, n. 3, p. 219-227, 2002.
- RUMMEL, C. et al. Leptin regulates leukocyte recruitment into the brain following systemic LPS-induced inflammation. **Mol Psychiatr.**, v. 15, n. 5, p. 523-534, 2010.
- SAHU, A. Leptin signaling in the hypothalamus: emphasis on energy homeostasis and leptin resistance. **Front Neuroendocrin.**, v. 24, n. 4, p. 225-253, 2003.
- SANCHEZ-MARGALET, V. et al. Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells: mechanisms of action. **Clin Exp Immunol.**, v. 133, n. 1, p. 11-19, 2003.
- SANG, S. et al. Stability of tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate and formation of dimers and epimers under common experimental conditions. **J Agr Food Chem.**, v. 53, n. 24, p. 9478-9484, 2005.
- SANO, M. et al. Simultaneous determination of twelve tea catechins by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Analyst**, v. 126, n. 6, p. 816-820, 2001.
- SAZUKA, M.; ISEMURA, M.; ISEMURA, S. Interaction between the carboxyl-terminal heparin-binding domain of fibronectin and (-)-epigallocatechin gallate. **Biosci Biotech Bioch.**, v. 62, n. 5, p. 1031-1032, 1998.
- SCHMIDT, M. et al. Toxicity of green tea extracts and their constituents in rat hepatocytes in primary culture. **Food Chem Toxicol.**, v. 43, n. 2, p. 307-314, 2005.
- SCHMIDT, R. E.; GESSNER, J. E. Fc receptors and their interaction with complement in autoimmunity. **Immunol Lett.**, v. 100, n. 1, p. 56-67, 2005.
- SCHUSTER, D. P. et al. Regulation of lipopolysaccharide-induced increases in neutrophil glucose uptake. **Am J Physiol-Lung C.**, v. 292, n. 4, p. L845-851, 2007.

- SEITZ, O. et al. Wound healing in mice with high-fat diet- or ob gene-induced diabetes-obesity syndromes: a comparative study. **Exp Diabetes Res.**, v. 2010, p. 476969, 2010.
- SHAN, X. Q.; AW, T. Y.; JONES, D. P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Pharmacol Therapeut.**, v. 47, n. 1, p. 61-71, 1990.
- SHEPPARD, F. R. et al. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. **J Leukocyte Biol.**, v. 78, n. 5, p. 1025-1042, 2005.
- SHI, Y. et al. Protein-tyrosine kinase Syk is required for pathogen engulfment in complement-mediated phagocytosis. **Blood**, v. 107, n. 11, p. 4554-4562, 2006.
- SHIN, H. Y. et al. Epigallocatechin-3-gallate inhibits secretion of TNF-alpha, IL-6 and IL-8 through the attenuation of ERK and NF-kappaB in HMC-1 cells. **Int Arch Allergy Immunol.**, v. 142, n. 4, p. 335-344, 2007.
- SHOELSON, S. E.; HERRERO, L.; NAAZ, A. Obesity, inflammation, and insulin resistance. **Gastroenterology**, v. 132, n. 6, p. 2169-2180, 2007.
- SINGH, B. N.; SHANKAR, S.; SRIVASTAVA, R. K. Green tea catechin, epigallocatechin-3-gallate (EGCG): mechanisms, perspectives and clinical applications. **Biochem Pharmacol.**, v. 82, n. 12, p. 1807-1821, 2011.
- SINGH, T.; KATIYAR, S. K. Green tea catechins reduce invasive potential of human melanoma cells by targeting COX-2, PGE2 receptors and epithelial-to-mesenchymal transition. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. e25224, 2011.
- SKINNER, A. C. et al. Multiple markers of inflammation and weight status: cross-sectional analyses throughout childhood. **Pediatrics**, v. 125, n. 4, p. e801-809, 2010.
- SMITH, C. L. et al. Role of complement receptors in opsonophagocytosis of group B streptococci by adult and neonatal neutrophils. **J Infect Dis.**, v. 162, n. 2, p. 489-495, 1990.
- STANTON, R. C. Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival. **IUBMB Life**, v. 64, n. 5, p. 362-369, 2012.
- STOCKER, R.; KEANEY, J. F., JR. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiol Rev.**, v. 84, n. 4, p. 1381-1478, 2004.
- STOSSEL, T. P. Quantitative studies of phagocytosis. Kinetic effects of cations and heat-labile opsonin. **J Cell Biol.**, v. 58, n. 2, p. 346-356, 1973.
- SUGANAMI, T.; NISHIDA, J.; OGAWA, Y. A paracrine loop between adipocytes and macrophages aggravates inflammatory changes: role of free fatty acids and tumor necrosis factor alpha. **Arterioscl Thromb Vasc Biol.**, v. 25, n. 10, p. 2062-2068, 2005.
- TACHIBANA, H. et al. A receptor for green tea polyphenol EGCG. **Nat Struct Mol Biol.**, v. 11, n. 4, p. 380-381, 2004.
- TAKEDA, K.; AKIRA, S. Toll-like receptors in innate immunity. **Int Immunol.**, v. 17, n. 1, p. 1-14, 2005.
- TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. **Int Immunopharmacol.**, v. 1, n. 4, p. 625-635, 2001.
- TALUKDAR, S. et al. Neutrophils mediate insulin resistance in mice fed a high-fat diet through secreted elastase. **Nat Med.**, v. 18, n. 9, p. 1407-1412, 2012.

- TANAKA, M. et al. Expression of the 37-kDa laminin binding protein in murine lung tumor cell correlates with tumor angiogenesis. **Cancer Lett.**, v. 153, n. 1-2, p. 161-168, 2000.
- TANG, S. Y. et al. Characterization of antioxidant and antiglycation properties and isolation of active ingredients from traditional chinese medicines. **Free Radical Biol Med.**, v. 36, n. 12, p. 1575-1587, 2004.
- TERRANOVA, V. P. et al. Laminin promotes rabbit neutrophil motility and attachment. **J Clin Invest.**, v. 77, n. 4, p. 1180-1186, 1986.
- TINTINGER, G.; STEEL, H. C.; ANDERSON, R. Taming the neutrophil: calcium clearance and influx mechanisms as novel targets for pharmacological control. **Clin Exp Immunol.**, v. 141, n. 2, p. 191-200, 2005.
- TORNATORE, L. et al. The nuclear factor kappa B signaling pathway: integrating metabolism with inflammation. **Trends Cell Biol.**, v. 22, n. 11, p. 557-566, 2012.
- TROTTIER, M. D. et al. Functional capacity of neutrophils from class III obese patients. **Obesity**, v. 20, n. 5, p. 1057-1065, 2012.
- TSUCHIYA, M.; SUEMATSU, M.; SUZUKI, H. In vivo visualization of oxygen radical-dependent photoemission. **Methods Enzymol.**, v. 233, p. 128-140, 1994.
- UNDERHILL, D. M.; OZINSKY, A. Phagocytosis of microbes: complexity in action. **Annu Rev Immunol.**, v. 20, p. 825-852, 2002.
- VÁZQUEZ-VELA, M. E. F.; TORRES, N.; TOVAR, A. R. White Adipose Tissue as Endocrine Organ and Its Role in Obesity. **Arch Med Res.**, v. 39, n. 8, p. 715-728, 2008.
- VIGITEL. **Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico**. Brasília: Ministério da Saúde - Secretaria de Vigilância em Saúde, 2012.
- VINCENT, H. K.; TAYLOR, A. G. Biomarkers and potential mechanisms of obesity-induced oxidant stress in humans. **Int J Obesity**, v. 30, n. 3, p. 400-418, 2006.
- VUCENIK, I.; STAINS, J. P. Obesity and cancer risk: evidence, mechanisms, and recommendations. **Ann NY Acad Sci.**, v. 1271, p. 37-43, 2012.
- WHO. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO consultation. **World Health Organ Tech Rep Ser.**, v. 894, p. i-xii, 1-253, 2000.
- WILASRUSMEE, C. et al. In vitro immunomodulatory effects of ten commonly used herbs on murine lymphocytes. **J Altern Complem Med.**, v. 8, n. 4, p. 467-475, 2002.
- WILKINSON, J. R. et al. Surveillance and monitoring. **Obes Rev.**, v. 8 Suppl 1, p. 23-29, 2007.
- WINTERBOURN, C. C. et al. Modeling the reactions of superoxide and myeloperoxidase in the neutrophil phagosome: implications for microbial killing. **J Biol Chem.**, v. 281, n. 52, p. 39860-39869, 2006.
- WINTERBOURN, C. C.; KETTLE, A. J. Reactions of superoxide with myeloperoxidase and its products. **Jpn J Infect Dis.**, v. 57, n. 5, p. S31-33, 2004.
- YANG, T. T.; KOO, M. W. Inhibitory effect of Chinese green tea on endothelial cell-induced LDL oxidation. **Atherosclerosis**, v. 148, n. 1, p. 67-73, 2000.

YOON, P. S. et al. Human neutrophil laminin receptors: activation-dependent receptor expression. **J Immunol.**, v. 138, n. 1, p. 259-265, 1987.

YOUN, H. S. et al. Suppression of MyD88- and TRIF-dependent signaling pathways of Toll-like receptor by (-)-epigallocatechin-3-gallate, a polyphenol component of green tea. **Biochem Pharmacol.**, v. 72, n. 7, p. 850-859, 2006.

ZALDIVAR, F. et al. Body fat and circulating leukocytes in children. **Int J Obesity.**, v. 30, n. 6, p. 906-911, 2006.

ZARKESH-ESFAHANI, H. et al. Leptin indirectly activates human neutrophils via induction of TNF- α . **J Immunol.**, v. 172, n. 3, p. 1809-1814, 2004.

ZHAO, H. et al. Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. **Free Radical Biol Med.**, v. 34, n. 11, p. 1359-1368, 2003.

ZHONG, B. et al. Human neutrophils utilize a Rac/Cdc42-dependent MAPK pathway to direct intracellular granule mobilization toward ingested microbial pathogens. **Blood**, v. 101, n. 8, p. 3240-3248, 2003.

ZHOU, M. J.; BROWN, E. J. CR3 (Mac-1, α M β 2, CD11b/CD18) and Fc gamma RIII cooperate in generation of a neutrophil respiratory burst: requirement for Fc gamma RIII and tyrosine phosphorylation. **J Cell Biol.**, v. 125, n. 6, p. 1407-1416, 1994.