

**Vivian Almeida Paschoal**

**Efeito comparativo dos ácidos  
eicosapentaenóico (EPA) e docosa-  
hexaenóico (DHA) sobre a função de  
neutrófilos**

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

São Paulo  
2011

**Vivian Almeida Paschoal**

**Efeito comparativo dos ácidos  
eicosapentaenóico (EPA) e docosa-  
hexaenóico (DHA) sobre a função de  
neutrófilos**

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

Área de concentração: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Rui Curi

Versão original

São Paulo  
2011

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

reprodução não autorizada pelo autor

Paschoal, Vivian.

Efeito comparativo dos ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosa-hexaenóico (DHA) sobre a função de neutrófilos / Vivian Paschoal. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Rui Curi.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Ácidos graxos e leucócitos.

Versão do título para o inglês: Comparative effect of eicosapentaenóic (EPA) and docosa-hexaenoic (DHA) acids on neutrophil function.

Descritores: 1. Ácidos graxos  $\omega$ -3 2. Espécies reativas de oxigênio 3. CINC-2, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  4. Fagocitose 5. Atividade fungicida I. Curi, Rui II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana III. Título.

ICB/SBIB0142/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Vivian Paschoal.

Título da Dissertação: Efeito comparativo dos ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosa-hexaenóico (DHA) sobre a função de neutrófilos.

Orientador(a): Rui Curi.

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 - telefax : (55) (011) 3091.7438  
e-mail: [cep@icb.usp.br](mailto:cep@icb.usp.br)

---

## **CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **103** nas fls. **74** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Rui Curi, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Efeito comparativo dos ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosa-hexaenóico (DHA) sobre a função de neutrófilos** do qual participou(aram) o(s) alunos **Vivian Almeida Paschoal**, 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 EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL* (CEEA) em **04.08.09**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 05 de agosto de 2009.

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

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

## RESUMO

Paschoal A. V. Efeito comparativo dos ácidos eicosapentaenóico (EPA) e docosa-hexaenóico (DHA) sobre a função de neutrófilos. [dissertação (Mestrado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Óleos de peixe ricos em ácidos graxos (AGs)  $\omega$ -3 são utilizados como agentes terapêuticos em doenças inflamatórias crônicas. Os ácidos graxos  $\omega$ -3 encontrados nesses óleos são o eicosapentaenóico (EPA) e o docosa-hexaenóico (DHA). O efeito anti-inflamatório é atribuído aos dois ácidos graxos  $\omega$ -3 indistintamente. Contudo, há evidências de que EPA e DHA não apresentam os mesmos efeitos e algumas vezes atuam de modo oposto. No presente estudo, os efeitos de EPA e DHA sobre a função de neutrófilos foram comparados. Para isso, foram realizados experimentos em neutrófilos isolados de ratos. Inicialmente, foram analisadas células com a membrana plasmática íntegra e fragmentação de DNA (citometria de fluxo) com o intuito de determinar as concentrações não tóxicas de EPA e DHA. Posteriormente, foram realizados ensaios para determinar produção espécies reativas de oxigênio (EROs) (quimiluminescência amplificada por lucigenina e fluorescência utilizando Amplex<sup>®</sup> Ultrared); nitrito (reagente de Griess) e citocinas (ELISA) no sobrenadante de culturas, além de capacidade fagocítica e atividade fungicida de *Candida albicans* (microscopia). Aumento da produção de peróxido de hidrogênio ocorreu a partir de concentrações menores de DHA (50  $\mu$ M comparado com 100  $\mu$ M de EPA). Já para a produção de ânion superóxido, EPA estimulou em doses menores (12,5  $\mu$ M e o DHA em 100  $\mu$ M). Ambos AGs aumentaram a síntese e liberação das citocinas CINC-2 e TNF- $\alpha$  e não modificaram a produção de IL1- $\beta$  e óxido nítrico após incubação das células por 18 horas. Somente DHA elevou a capacidade fagocitária e a atividade fungicida dos neutrófilos. EPA e DHA apresentaram efeitos distintos na produção de citocinas, fagocitose e atividade fungicida dos neutrófilos. Já na produção das EROS, EPA e DHA apresentaram efeitos similares, embora em concentrações diferentes.

Palavras-chave: Ácidos graxos  $\omega$ -3. Espécies reativas de oxigênio. CINC-2. TNF- $\alpha$ .  
IL-1 $\beta$ . Fagocitose. Atividade fungicida.

## ABSTRACT

Paschoal A. V Comparative effect of eicosapentaenoic (EPA) and docosa-hexaenoic (DHA) acids on neutrophil function. [Masters thesis (Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2011.

Fish oils rich in  $\omega$ -3 fatty acids (FAs) are used as therapeutic agents in chronic inflammatory diseases. The  $\omega$ -3 fatty acids found in these oils are eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acids. The anti-inflammatory properties are attributed to both  $\omega$ -3 fatty acids indistinctly. However, there is evidence that EPA and DHA do not have the same effects and sometimes act in the opposite way. In this study, the effects of EPA and DHA on neutrophil function were compared. For this purpose, experiments were performed in isolated rat neutrophils. Initially, cells with intact plasma membrane and DNA fragmentation (flow cytometry) were analyzed in order to determine the non-toxic concentrations of EPA and DHA. Subsequently, tests were conducted to determine the production of reactive oxygen species (ROS) (lucigenin-amplified chemiluminescence and Amplex<sup>®</sup> Ultrared fluorescence assays), nitrite (Griess reagent) and cytokines (ELISA) in the culture supernatants. In addition, phagocytosis capacity and fungicidal activity of *Candida albicans* (microscopy) were also measured. Increased production of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in lower concentrations of DHA (50  $\mu$ M compared to 100  $\mu$ M of EPA). For production of O<sub>2</sub><sup>•-</sup>, EPA stimulated at lower doses (12.5  $\mu$ M compared to 100  $\mu$ M of DHA). Both FAs increased synthesis and release of cytokines, CINC-2 and TNF- $\alpha$ , and did not change the production of IL-1 $\beta$  and nitric oxide after incubation of the cells for 18 hours. Only DHA increased the phagocytic capacity and fungicidal activity of neutrophils. These FAs showed distinct effects on cytokine production, phagocytosis capacity and fungicidal activity by neutrophils. For production of ROS, both EPA and DHA had similar actions, although at different concentrations.

Keywords: Neutrophils. Fatty acids  $\omega$ -3. Reactive oxygen species. CINC-2. TNF- $\alpha$ . IL-1 $\beta$ . Phagocytosis. Fungicidal activity.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Representação esquemática do processo de fagocitose e da produção de EROs pelo sistema NADPH oxidase .....	27
<b>Figura 2</b> - Representação esquemática da produção de EROs pelo sistema NADPH oxidase (NOX2) e ácido peroxinitrito pela iNOS.....	28
<b>Figura 3</b> - Integridade de membrana em neutrófilos tratados com DHA e EPA por 4 horas. ....	42
<b>Figura 4</b> - Fragmentação de DNA em neutrófilos tratados com EPA e DHA por 4 horas .....	43
<b>Figura 5</b> - Integridade de membrana em neutrófilos tratados com DHA e EPA por 18 horas .....	44
<b>Figura 6</b> - Fragmentação de DNA em neutrófilos tratados com EPA e DHA por 18 horas .....	44
<b>Figura 7</b> - Integridade de membrana em neutrófilos tratados com DHA e EPA por 18 horas na presença de LPS.....	46
<b>Figura 8</b> - Fragmentação de DNA em neutrófilos tratados com EPA e DHA por 18 horas na presença de LPS.....	46
<b>Figura 9</b> - Produção de CINC-2 durante 18 h por neutrófilos tratados com DHA e EPA. ....	48
<b>Figura 10</b> - Produção de CINC-2 durante 18 h por neutrófilos tratados com DHA e EPA na presença de LPS.....	48
<b>Figura 11</b> - Produção de TNF- $\alpha$ durante 18 h por neutrófilos tratados com DHA e EPA.....	49
<b>Figura 12</b> - Produção de TNF- $\alpha$ durante 18 h por neutrófilos tratados com DHA e EPA na presença de LPS.....	49
<b>Figura 13</b> - Produção de IL1- $\beta$ durante 18 h por neutrófilos tratados com DHA e EPA. ....	50
<b>Figura 14</b> - Produção de IL1- $\beta$ durante 18 h por neutrófilos tratados com DHA e EPA na presença de LPS.....	50
<b>Figura 15</b> - Produção de óxido nítrico durante 18 h por neutrófilos tratados com DHA e EPA. ....	51

<b>Figura 16</b> - Produção de óxido nítrico durante 18 h por neutrófilos tratados com DHA e EPA na presença de LPS.....	51
<b>Figura 17</b> - Produção de peróxido de hidrogênio durante 1 h por neutrófilos tratados com DHA e EPA.....	53
<b>Figura 18</b> - Produção de peróxido de hidrogênio durante 1 h por neutrófilos tratados com DHA e EPA na presença de PMA. ....	53
<b>Figura 19</b> - Produção de ânion superóxido durante 1 h por neutrófilos tratados com DHA e EPA.....	55
<b>Figura 20</b> - Produção de ânion superóxido durante 1 h por neutrófilos tratados com DHA e EPA na presença de PMA.. ....	55
<b>Figura 21</b> - Produção de ânion superóxido durante 1 h por neutrófilos tratados com DHA e EPA na presença de zimosan.....	56
<b>Figura 22</b> - Produção de ânion superóxido durante 1 h por neutrófilos tratados com DHA na presença do inibidor DPI.....	57
<b>Figura 23</b> - Produção de ânion superóxido durante 1 h por neutrófilos tratados com EPA na presença do inibidor DPI.....	57
<b>Figura 24</b> - Produção de ânion superóxido durante 1 h por neutrófilos tratados com DHA na presença do inibidor etomoxir.....	58
<b>Figura 25</b> - Produção de ânion superóxido durante 1 h por neutrófilos tratados com EPA na presença do inibidor etomoxir, .....	58
<b>Figura 26</b> - Porcentagem de neutrófilos que fagocitaram <i>Candida albicans</i> tratados com DHA e EPA.....	60
<b>Figura 27</b> - Escore da atividade fungicida dos neutrófilos tratados com DHA e EPA. ....	60

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Valores de escore para a atividade fungicida de neutrófilos.....	40
<b>Tabela 2</b> - Concentrações máximas não tóxicas dos ácidos EPA e DHA em neutrófilos.....	45

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Efeitos do EPA e DHA em diferentes tipos celulares. Foram selecionados alguns artigos considerados relevantes. ....	22
<b>Quadro 2</b> - Contagem de células peritoneais no período de 3 horas após administração de glicogênio de ostra (1%). ....	34
<b>Quadro 3</b> - Resumo dos efeitos de EPA e DHA em neutrófilos observados nesse estudo. ....	61

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA: análise de variância

BPI: proteína de aumento de permeabilidade bacteriana

CEEA: Ética em Experimentação Animal

CINC-2: citocina indutora da quimiotaxia de neutrófilos 2

Cl<sup>-</sup>: cloreto

COX: ciclo-oxigenase

CPT-I: carnitina palmitoil transferase-I

CR-1: receptor para componentes do complemento

CTE: cadeia de transporte de elétrons

DHA: ácido docosa-hexaenoico

EPA: ácido eicosapentaenoico

EPM: erro padrão da média

ERN: espécies reativas de nitrogênio

EROs: espécies reativas de oxigênio

fMLP: *N-formyl-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina*

GDP: guanosina difosfato

GEF: fator de troca de guanosina

GTP: guanosina trifosfato

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: peróxido de hidrogênio

HOCl: ácido hipocloroso

HRP: peroxidase de raiz forte

IFN-  $\gamma$ : interferon- $\gamma$

I $\kappa$ B: subunidade inibitória do NF- $\kappa$ B

IL: interleucina

IL-1ra: antagonista do receptor de IL-1

iNOS: óxido nítrico sintase induzível

IP: iodeto de propídio

IP<sub>3</sub>: fosfatidil inositol trifosfato

IUPAC: *International Union of Pure and Applied Chemistry*

LPL: lipase de lipoproteína

LPS: lipopolissacarídeo

MDP: bactérias gram positivas e negativas

MIP2- $\alpha$ : proteína inflamatória de macrófagos

MPO: mieloperoxidase

mtDNA: DNA mitocondrial

NF- $\kappa$ B: fator nuclear *kappa* B

NLRP3: receptor *pyrin domain containing 3*

NO: óxido nítrico

NO<sub>2</sub>: radical dióxido de nitrogênio

NRL: receptor do tipo NOD

O<sub>2</sub><sup>•-</sup>: ânion superóxido

ONOO<sup>-</sup>: peroxinitrito

ONOOH: ácido peroxinitrito:

PKC: proteína quinase C

PMA: acetato miristato de forbol

PMN: célula polimorfonuclear

PPAR: receptor nuclear ativador da proliferação de peroxissomos

PUFA: ácido graxo poli-insaturado

RNS: espécies reativas de nitrogênio

SFB: soro fetal bovino

SHN: soro homólogo normal

TGF- $\beta$ : fator de crescimento tumoral-  $\beta$

TLRs: receptores do tipo *Toll-like*

TNF- $\alpha$ : fator de necrose tumoral  $\alpha$

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
1.1	ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS (PUFAS) ÔMEGA-3	18
1.2	PUFAS ÔMEGA 3 E FUNÇÃO DOS LEUCÓCITOS	19
1.3	PUFAS ÔMEGA 3 E PRODUÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS	20
1.4	DIFERENÇAS ENTRE OS ÁCIDOS EICOSAPENTAENÓICO (EPA) E DOCOSA-HEXAENÓICO (DHA)	21
1.5	NEUTRÓFILOS	24
1.6	PRODUÇÃO DE EROS	26
1.7	ÓXIDO NÍTRICO (NO)	29
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA PARA A REALIZAÇÃO DO ESTUDO</b>	<b>31</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>32</b>
3.1	OBJETIVO GERAL	32
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>33</b>
4.1	PREPARO DAS SOLUÇÕES DE EPA E DHA	33
4.2	ANIMAIS	33
4.3	OBTENÇÃO DE NEUTRÓFILOS	33
4.4	AVALIAÇÃO DA CITOXICIDADE DE EPA E DHA	34
4.4.1	<i>Avaliação da integridade da membrana celular</i>	35
4.4.2	<i>Avaliação da fragmentação de DNA</i>	35
4.5	DETERMINAÇÃO DAS CITOCINAS	35
4.6	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NO	36
4.7	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	36
4.7.1	<i>Avaliação de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pelo método de Amplex® Ultrared</i>	36
4.7.2	<i>Avaliação do ânion superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) pela técnica de quimioluminescência amplificada pela lucigenina</i>	37
4.7.3	<i>Inibidores da NADPH oxidase e da oxidação dos AG</i>	38
4.8	OBTENÇÃO DE SORO HOMÓLOGO NORMAL (SHN)	38
4.9	OPSONIZAÇÃO DO ZIMOSAN	38



4.10	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE FAGOCITÁRIA E DA ATIVIDADE FUNGICIDA, EX VIVO, DE CÉLULAS PERITONEAIS .....	39
4.10.1	<i>Ensaio de fagocitose e de atividade fungicida de neutrófilos</i> .....	39
4.11	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>41</b>
5.1	TOXICIDADE DOS ÁCIDOS GRAXOS EM NEUTRÓFILOS.....	41
5.2	TOXICIDADE DE DHA E EPA EM NEUTRÓFILOS TRATADOS COM LPS ... .....	45
5.3	PRODUÇÃO DE CITOCINAS .....	47
5.4	EFEITOS DOS AGS SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO) ...	51
5.5	EFEITOS DE EPA E DHA SOBRE A PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS) .....	52
5.5.1	<i>Produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></i> .....	52
5.6	PRODUÇÃO DE O <sub>2</sub> <sup>-</sup> .....	54
5.6.1	<i>Efeitos dos inibidores da NADPH oxidase e da oxidação dos AG sobre a produção de superóxido</i> .....	56
5.7	EFEITOS DE EPA E DHA NA FAGOCITOSE E ATIVIDADE FUNGICIDA..	59
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>67</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>68</b>

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 ÁCIDOS GRAXOS POLIINSATURADOS (PUFAS) ÔMEGA-3

Os ácidos graxos são compostos formados por cadeias hidrocarbonadas ligadas a um grupamento carboxila terminal. São classificados de acordo com o tamanho (curta, média, longa) ou tipo de ligação (saturados, monoinsaturados ou poliinsaturados) na cadeia hidrocarbonada. Ácidos graxos saturados não possuem dupla ligação na cadeia; ácidos graxos monoinsaturados contêm uma dupla ligação, enquanto que ácidos graxos poli-insaturados (PUFA – *polyunsaturated fatty acids*) contêm duas ou mais duplas ligações. A numeração dos átomos de carbono nos AGs começa a partir do carbono da carboxila, designado como 1 na nomenclatura da IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*). O próximo átomo de carbono é designado como 2, também chamado de  $\alpha$  na nomenclatura tradicional. O carbono metílico terminal é designado como "n" de acordo com a nomenclatura IUPAC, e como " $\omega$ ", segundo a nomenclatura tradicional. A posição de uma dupla ligação pode ser indicada pela contagem decrescente a partir do final da cadeia. Se, por exemplo, uma dupla ligação está presente entre o terceiro e o quarto átomos de carbono contados a partir do final do terminal metil é descrita como n-3 ou  $\omega$ -3 (omega-3).

A estrutura dos AGs é indicada de acordo com o número de átomos de carbono, seguida do número de duplas ligações e a posição da insaturação mais distal. Por exemplo, o ácido eicosapentaenóico (EPA) é abreviado como C20:5 n-3 (ou C20:5  $\omega$ -3). Esta nomenclatura indica um AG com 20 átomos de carbono e 5 duplas ligações. A última das duplas ligações está localizada no terceiro carbono a partir da extremidade distal da cadeia alifática. As propriedades biológicas e físico-químicas dos AGs dependem do comprimento da cadeia alifática, do número de duplas ligações (grau de insaturação) e de suas posições.

Os óleos vegetais, como os de oliva, milho e soja, são fontes de ácidos graxos monoinsaturados ômega 9 (PUFAs ômega 9) e poliinsaturados ômega 6 (PUFAs ômega 6) e os de linhaça e de peixe constituem fontes de ácidos graxos poliinsaturados ômega-3 (PUFAs ômega-3).

Dentre os ácidos graxos da família ômega 3, os principais são o  $\alpha$ -linolênico (18:3), EPA (20:5) e DHA (docosa-hexaenóico). A conversão do ácido  $\alpha$ -linolênico

em EPA e DHA, em humanos, é muito baixa (1), o que significa que o EPA e DHA em especial devem ser consumidos (2). Os fitoplânctons marinhos de locais frios sintetizam ácidos  $\alpha$ -linolênico, EPA e DHA, com isto, os peixes que se alimentam desses também são ricos nesses AG, como sardinha, cavala, salmão, truta e atum (peixes de águas frias e profundas). Também podemos encontrá-los nos óleos vegetais de linhaça e canola (3).

## 1.2 PUFAS ÔMEGA 3 E FUNÇÃO DOS LEUCÓCITOS

Em 1971, Bang e Dyerberg sugeriram que a baixa incidência de doenças cardiovasculares em esquimós da Groelândia estaria relacionada com a ingestão de ácidos graxos  $\omega$ -3. Em estudos posteriores, também foi observada baixa incidência de doenças auto-imunes e inflamatórias como psoríase, asma e diabetes do tipo I, além de ausência de esclerose múltipla nessa população (4). Na população japonesa foi encontrada menor incidência de doença inflamatória em relação aos americanos e este fato foi associado ao maior consumo de peixes de água fria (5, 6).

O óleo de peixe, uma fonte rica de PUFAs  $\omega$ -3, modula as respostas imune e inflamatória, a proliferação de linfócitos, a síntese de citocinas, produção de anticorpos e expressão de moléculas de superfície de membrana (7-11). Esse óleo atenua a inflamação em várias condições patológicas tais como: diabetes mellitus tipo II, hipertrigliceridemia (12) e doenças cardiovasculares (13, 14).

A incorporação de ácidos graxos  $\omega$ -3 em membranas celulares influencia a fluidez, estrutura e função de vários receptores, transportadores e enzimas (15). A inclusão dos PUFAs  $\omega$ -3 na membrana plasmática e em membranas intracelulares também modifica a composição de *lipid rafts* desta e a produção de segundos mensageiros (16, 17) tais como: fosfatidil inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (18). Por outro lado, a substituição do ácido linoléico ( $\omega$ -6) pelo ácido  $\alpha$ -linolênico ( $\omega$ -3) leva à produção de prostanóides trienóicos, leucotrienos pentaenoicos e tromboxano-3, havendo redução da síntese de prostaglandina E<sub>2</sub>, que é pró-inflamatória (19). EPA e DHA geram resolvinas e protectinas que atenuam a inflamação (20). Esses mecanismos estão envolvidos nos efeitos dos ácidos graxos em leucócitos.

### 1.3 PUFAS ÔMEGA 3 E PRODUÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS

EPA e DHA inibem a produção de IL-1 $\beta$  e do fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) por monócitos (21) e a produção de IL-6 e IL-8 por células endoteliais (22, 23). Caughey et al. (1996) relataram correlação inversa entre os conteúdos de EPA em células mononucleares e a capacidade dessas células de produzirem TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  em resposta a endotoxina (24). Kelley et al. (1999) mostraram que a administração de 6 g de DHA por dia, durante 12 semanas, resulta em diminuição da produção de TNF- $\alpha$  (20%) e IL-1 $\beta$  (35%) por células mononucleares estimuladas por endotoxina (25). O EPA e o DHA inibem a produção de citocinas inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8 por monócitos, macrófagos e células endoteliais em cultura (23, 26).

A administração de óleo de peixe diminui a produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 por macrófagos em roedores (27, 28). A suplementação da dieta de voluntários saudáveis com óleo de peixe (2 g de EPA e DHA por dia) diminui a produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 por células mononucleares (24, 29-32). Outros autores não conseguiram demonstrar efeitos dos PUFAs da dieta sobre a produção de citocinas inflamatórias em seres humanos recebendo menos (33-37) ou mais (35, 38-42) de 2 g de EPA e DHA por dia. Contudo, a suplementação com óleo de peixe a 0,3, 1 e 2 gramas por dia resulta em reduções significativas na produção de TNF- $\alpha$  e IL-6 por monócitos (32). Calder (2006) propôs que a relação de EPA e DHA no óleo de peixe é determinante para os resultados divergentes reportados (6).

Os PUFAs  $\omega$ -3 modificam a atividade dos fatores de transcrição, tais como o fator nuclear *kappa* B (NF- $\kappa$ B) e o receptor ativador da proliferação de peroxissomas (PPAR) (43). Estímulos inflamatórios levam à fosforilação de serina (I $\kappa$ B $\alpha$  ser-32 e ser-36) na porção N-terminal da subunidade inibitória (subunidade inibitória do NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B)), provocando a degradação da subunidade inibitória pelo proteassoma 26S (44, 45). Este processo ativa o NF- $\kappa$ B e a translocação do dímero deste do citoplasma para o núcleo, onde se liga a regiões específicas do DNA, induzindo a expressão de genes (46, 47). EPA (48) e óleo de peixe (49) diminuem a ativação de NF- $\kappa$ B estimulada por LPS (lipopolissacarídeo) em culturas de monócitos humanos e este fato está associado com a diminuição da fosforilação de I $\kappa$ B (49, 50). Estas observações são sugestivas de que os efeitos diretos de PUFAs  $\omega$ -3 sobre a expressão de moléculas inflamatórias ocorre por inibição da ativação do NF- $\kappa$ B. Os PPARs regulam a glicemia, o metabolismo de lipídeos e lipoproteínas, proliferação,











diferenciação e apoptose celulares, resposta inflamatória (51) e tumorgênese (52). PPARs são classificados em três isotipos  $\alpha$  (alfa),  $\beta$  (beta) ou delta ( $\delta$ ) e  $\gamma$  (gama), que diferem na afinidade do ligante, distribuição nos tecidos e expressão (53-55). PPAR  $\alpha$  é expressa no fígado, coração, músculo e da parede vascular (52), O PPAR  $\beta$  é expresso principalmente no cérebro e tecido adiposo (56, 57). O PPAR  $\gamma$  é encontrado no tecido adiposo marrom, tecido adiposo branco (diferenciação dos adipócitos (58)), células  $\beta$ -pancreáticas, o endotélio vascular e intestino grosso (52), em menor expressão pelo fígado, rim, coração e músculo esquelético (59). O PPAR  $\gamma$  também é expresso em células T em que seus ligantes podem inibir a proliferação e produção de IL-2 (60, 61). Em neutrófilos, a sua ausência leva ao aumento da quimiotaxia e modulação de citocinas pró-inflamatórias (59). O PPAR  $\gamma$  aumenta a diferenciação dos monócitos em macrófagos, preferencialmente para M2 (62) e inibe a expressão de citocinas inflamatórias tais como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 (63, 64).




#### 1.4 DIFERENÇAS ENTRE OS ÁCIDOS EICOSAPENTAENÓICO (EPA) E DOCOSA-HEXAENÓICO (DHA)

Embora os efeitos imunomoduladores do óleo de peixe sejam bem conhecidos, ainda não está claro se estes estão associados ao EPA, DHA ou se decorrem da ação combinada desses dois PUFAs  $\omega$ -3 (65).

Nos trabalhos apresentados no Quadro 1, os efeitos de DHA e EPA foram comparados. Estão indicadas as alterações induzidas por DHA, EPA ou pelos dois ácidos graxos.



**Quadro 1** - Efeitos do EPA e DHA em diferentes tipos celulares. Foram seleccionados alguns artigos considerados relevantes.

Modelo Experimental	Efeitos	AG	Tratamentos
<i>Ex vivo</i> Mulheres	inibem a agregação plaquetária	EPA e DHA	1 $\mu$ M – 12 minutos (66)
<i>Ex vivo</i> Homens		EPA	
Células endoteliais de rato	 colesterol na membrana celular	DHA	5 $\mu$ g - 72 horas (67)
Células Jurkat (linfócitos T)	 IL-2, IL-10 e IFN- $\gamma$	EPA	12,5 $\mu$ M - 24 horas (68)
Células de Kupffer	 IL-1	Óleo de peixe	150 g/Kg – 6 semanas (27)
Macrófagos (células Raw 264)	 NO e iNOS	DHA	60 $\mu$ M NO: 24 h + 24 h LPS iNOS: 24 h + 12 h LPS (69)
Monócitos de cabra	 Fagocitose	EPA e DHA	22 horas: EPA: 25,50,100 e 200 $\mu$ M DHA: 100 $\mu$ M + 2 horas de fagocitose (70)
Neutrófilos de cabra	 Fagocitose	DHA*	25, 50 e 100 $\mu$ M - 180 minutos + 120 minutos com <i>E. Coli</i> (71)
Linfócitos humanos	Inibem a proliferação	EPA e DHA	10 $\mu$ g/mL – 6 dias (72)
Macrófagos humanos (LPS - THP-1)	 IL-1 $\beta$ , IL-6 e NF- $\kappa$ B	DHA	25mM Citocina: 6 horas NF- $\kappa$ B: 2 horas (73)
Macrófagos humanos (LPS - THP-1)	 TNF- $\alpha$ e IL-6	EPA	25 mM – 6 horas (LPS) (73)
Macrófagos humanos (LPS - THP-1)	 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-6	DHA	100 $\mu$ M – 48 horas + 24 LPS (74)
Neutrófilos humanos	 LTB <sub>4</sub>	EPA e DHA	3 ou 10 semanas EPA: 9,4 g/ dia

			DHA: 5 g/dia (75)
<b>Linfócitos humanos</b>	 Proliferação	Óleo de peixe**	Suplementação: 4 g de óleo de peixe/ dia - 12 semanas (76)
<b>Linfócitos humanos</b>	 Ativação	Óleo de peixe rico em DHA***	Suplementação: 4,9 g/dia - 4 semanas (35)
<b>Monócitos humanos</b>	Não tem efeito na fagocitose	Óleo de peixe rico em EPA ou DHA	Suplementação: 4 g/dia EPA: [95%] ou DHA:[90%] (77)
<b>Monócitos humanos</b>	 Quimiotaxia	Óleo de peixe	Suplementação: 4 g – 6 semanas e 9 meses (78)
<b>Neutrófilos humanos</b>			Suplementação: 4 g – 9 meses (78)
<b>Neutrófilos e monócitos humanos</b>	Não tem efeito na fagocitose e expressão de moléculas de adesão	Óleo de peixe rico em EPA ou DHA	Suplementação: 4 semanas DHA: 4,9 g/dia EPA: 4,7 g/dia (35)

As referências estão indicadas pelos números entre parênteses.

**Abreviaturas:** ácido graxo (AG), eicosapentaenóico (EPA) docosa-hexaenóico (DHA), leucotrieno B4 (LTB4), óxido nítrico (NO), interleucina-1 $\beta$  (IL1- $\beta$ ), interleucina-2 (IL-2), interleucina-6 (IL-6), interleucina-10(IL-10), fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), fator nuclear *kappa* B (NF-KB), linhagem de macrófagos humanos (THP – 1), lipopolissacarídeo (LPS).

 diminuição,  aumento.

\* Houve aumento da fagocitose no tratamento com EPA e DHA, porém com DHA o aumento foi mais pronunciado.

\*\* O óleo de peixe contendo EPA (18,8 g/100 g totais de AG) e DHA (7,4 g/100 g totais de AG) foi comparado com outro rico em DHA (19,1 g/100 g totais de AG).

\*\*\* A suplementação foi composta por: placebo (azeite), EPA (4,7 g/dia) e DHA (4,9 g/dia).

Os achados apresentados são indicativos de que EPA e DHA apresentam efeitos distintos sobre a função de leucócitos. No entanto, não há estudo sistemático sobre os efeitos de DHA e EPA na função de neutrófilos.

## 1.5 NEUTRÓFILOS

Os neutrófilos são células polimorfonucleadas (PMNs) produzidas na medula óssea de humanos adultos a partir de células precursoras denominadas mieloblastos (com grânulos promielócitos neutrofilicos). Morfologicamente, os neutrófilos são caracterizados como células esféricas que apresentam de 12 a 15 µm de diâmetro, com núcleo segmentado em 3 a 5 lóbulos. Neutrófilos possuem receptores para a detecção de padrões moleculares presentes em micro-organismos e para a indução de respostas pró-inflamatórias (79) tais como os receptores do tipo Toll (*toll-like receptors* ou TLRs) e do tipo NOD (*nucleotide-binding protein oligomerization domain* ou NLRs), que estão localizados na membrana celular e no citoplasma, respectivamente (79, 80). Neutrófilos humanos expressam a maioria dos TLRs até agora descritos e identificam os seguintes micro-organismos e/ou padrões moleculares: TLRs 1 (bactéria), 2 (bactéria e fungo [zimosan]), 4 (bactéria gram negativa [LPS], fibrinogênio), 5 (flagelina), 6 (micoplasma), 7 (pequenos componentes sintéticos), 8 (pequenos componentes sintéticos), 9 (bactéria) e 10 (desconhecido) (81). Os receptores do tipo NOD 2 e NLRP3 (*NOD-like* família de receptores, *pyrin domain containing 3*) reconhecem fragmento de peptidoglicano MDP (bactérias gram positivas e negativas) e DNA bacteriano e ATP, respectivamente (82).

Os neutrófilos apresentam em seu citoplasma quatro tipos de grânulos:

(1) grânulos azurófilos (ou primários) são liberados na vesícula fagocítica. São ricos em  $\alpha$ - defensinas, catepsina G, elastases, proteinase 3, lisozimas, proteína de aumento de permeabilidade bacteriana (BPI), azurocidina (possui atividade antibacteriana e atividade antifúngica contra *candida albicans*) e mieloperoxidase (MPO), que desempenham função importante na patogênese da infecção aguda e inflamação, destinadas à destruição e digestão de micro-organismos ou partículas fagocitadas;

(2) grânulos específicos (ou secundários) contêm lisozima, fosfatase alcalina, proteínas ligantes a B12, ativador de plasminogênio, colagenase, além de possuírem enzimas que destroem as partículas fagocitadas, como, por exemplo, a lisozima. Possuem também quelantes de ferro e cobre (lactoferrina e transcobalamina);

(3) grânulo gelatinase (também conhecido como terciário) contém gelatinase acetiltransferase e lisozima. Grânulo gelatinase juntamente com grânulos



específicos são excitados quando estimulados. Gelatinase é usada para facilitar a circulação de neutrófilos através dos tecidos;

(4) grânulos secretores que contêm albumina, receptor para componentes do complemento (CR-1), tirosinas quinases e fosfolipases. São liberados rapidamente ao estímulo.

Após ativação dos neutrófilos por estímulos inflamatórios ou fagocitose de micro-organismos, os grânulos situados nas proximidades fundem suas membranas com a dos fagossomos, sendo liberadas enzimas como a MPO para o interior do fagossomo. A MPO catalisa a conversão de peróxido de hidrogênio formando o ácido hipocloroso (83).

A fagocitose é um processo ativo, no qual o patógeno é primeiramente envolvido pela membrana fagocítica e internalizado em uma vesícula membranosa chamada fagossoma, que se acidifica. O fagossoma funde-se com um ou mais lisossomas para gerar o fagolisossoma. O conteúdo lisossomal é liberado para a destruição do patógeno (84), com a geração de peptídeos a serem apresentados às células T, de modo a induzir a resposta imune adquirida (85). Após a passagem dos neutrófilos pelo endotélio, essas células migram de acordo com o gradiente de agentes quimioatraentes em direção ao local inflamado, onde são ativados, seja por contato direto com patógenos ou por meio das ações de citocinas secretadas por células residentes do tecido. Os neutrófilos, na tentativa de eliminar os agentes invasores, liberam o conteúdo de seus grânulos, que incluem enzimas proteolíticas como proteinase 3, catepsina G e elastase, EROs (espécies reativas de oxigênio) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) (86). Os produtos tóxicos mais importantes são o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), ácido hipocloroso (HOCl) e o produto da reação entre o óxido nítrico (NO) e o  $O_2^{\bullet-}$ , o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ).

Os neutrófilos produzem citocinas cuja função é recrutar outros leucócitos para o foco inflamatório (quimiocinas) como IL-8 (interleucina-8), MIP2- $\alpha$  (proteína inflamatória de macrófagos) e CINC (citocina indutora de quimiotaxia de neutrófilos) (87). Essas células constituem fonte importante de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  e anti-inflamatórias como IL-1ra, fator de crescimento tumoral-  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) e interleucina 10 (IL-10) (88).

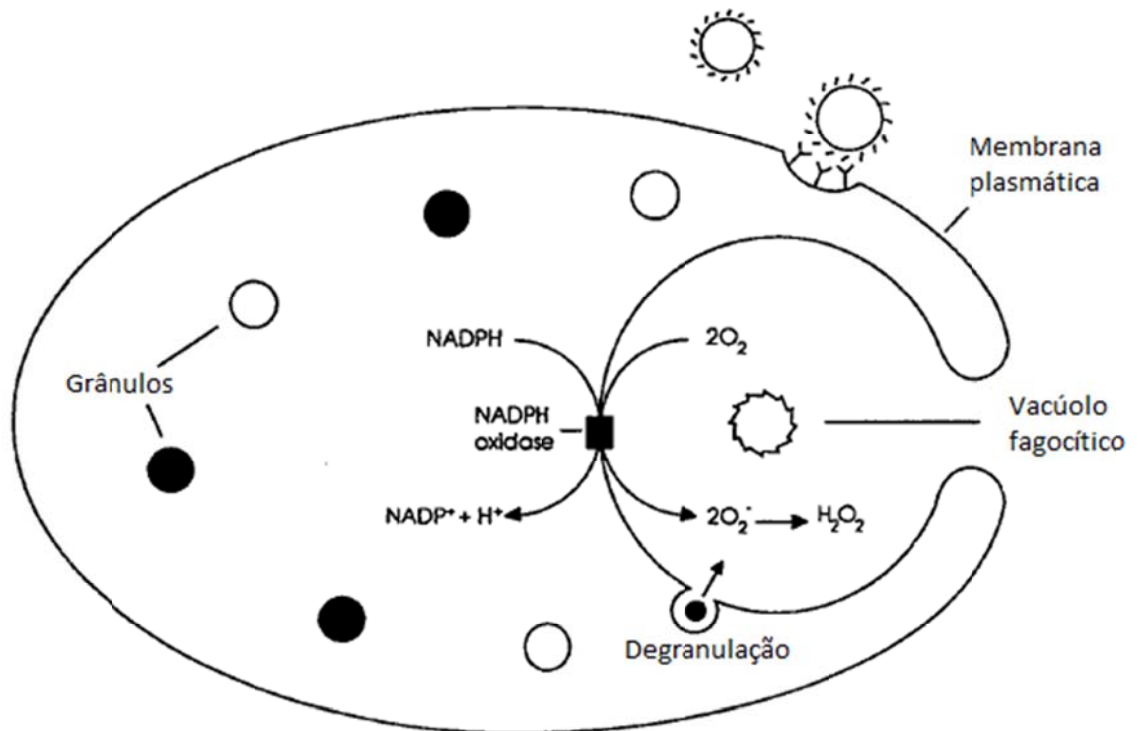
## 1.6 PRODUÇÃO DE EROS

A produção de EROs em neutrófilos ativados se dá, predominantemente, via sistema NADPH oxidase (89, 90).

A NADPH oxidase é um complexo enzimático composto por seis proteínas: p22<sup>phox</sup> (phox: oxidase fagocítica), gp91<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup> e duas proteínas G de baixo peso molecular chamadas Rac1A e Rac2 (91). A Rac1A está localizada na membrana plasmática, enquanto que a Rac2, molécula ativadora na cascata de sinalização, encontra-se no citossol na sua forma inativa ligada ao GDP (guanosina difosfato) (92).

Uma vez no interior do neutrófilo, os micro-organismos são seqüestrados para o fagolisossomo e há ativação do sistema de NADPH oxidase. Este complexo, por sua vez, gera grandes quantidades de EROs que são liberadas no interior do fagolisossomo e contribuem para a ação microbicida de neutrófilos (83) (esquematizado na Figura 1).

A NADPH oxidase permanece inativa enquanto os seus componentes citoplasmáticos (p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, p40<sup>phox</sup> e Rac 2) e de membrana (p22<sup>phox</sup> e gp91<sup>phox</sup>) não estão agregados. A separação dos componentes em compartimentos celulares distintos garante que a oxidase permaneça inativa. Quando a célula é exposta a um estímulo, Rac2 se liga ao GTP (guanosina trifosfato), ação essa catalisada pela proteína P-Rex-1, que atua como GEF (fator de troca de guanosina) (92), e se desloca para a membrana associando-se às outras proteínas oxidases. A proteína p47<sup>phox</sup> é fosforilada pela proteína quinase C (PKC) e então se associa aos outros componentes citossólicos (p40<sup>phox</sup> e p67<sup>phox</sup>). O complexo formado pela interação dessas proteínas, por sua vez, migra para a membrana citoplasmática, onde se associa ao flavocitocromo b<sub>558</sub> para formar a oxidase ativa (93, 94). A oxidase organizada é capaz agora de transferir elétrons do substrato (NADPH) para o oxigênio (94) (esquematizado na Figura 1).

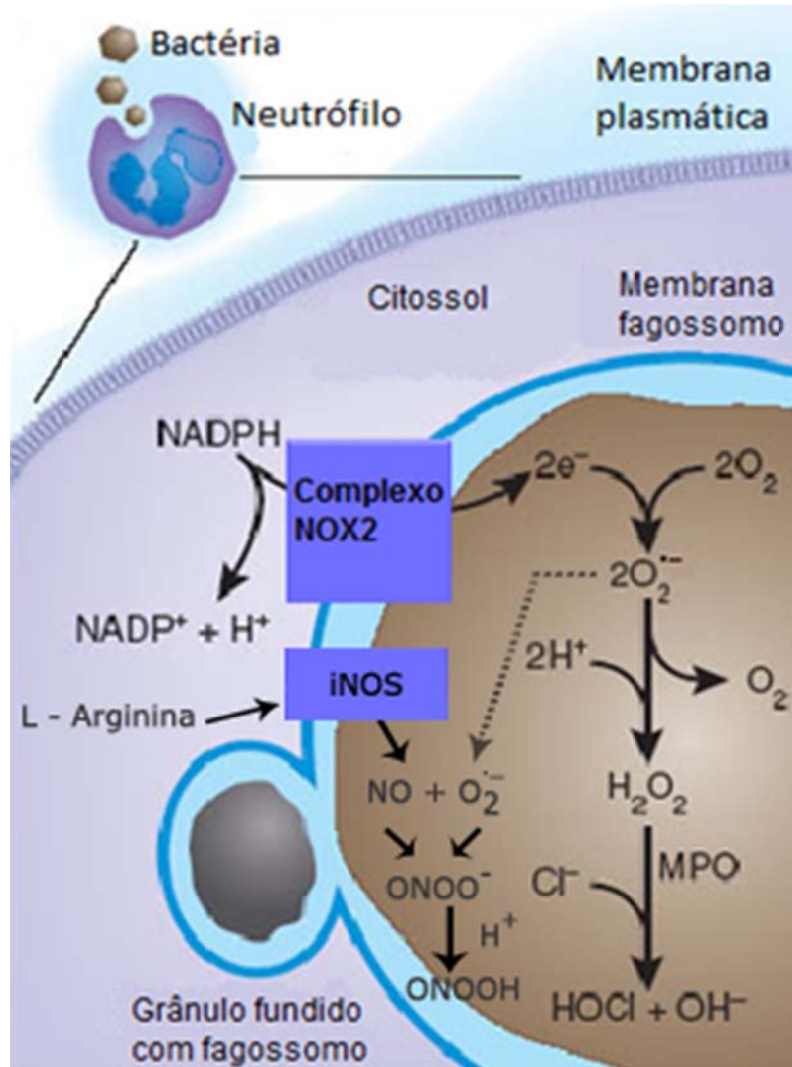


**Figura 1** - Representação esquemática do processo de fagocitose e da produção de EROs pelo sistema NADPH oxidase em neutrófilos (95). A enzima ativada está apta a transferir elétrons do substrato (NADPH) para o oxigênio e reduzi-lo para formação de ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\cdot -}$ ) via NOX2.

A ativação da NADPH oxidase em fagócitos pode ser induzida por um grande número de partículas e agentes solúveis, tais como: bactérias, zymosan opsonizado, peptídeos formilados como o *N-formyl-L-metionil-L-leucil-L-fenilalanina* (fMLP), e por agentes farmacológicos, como ionóforos de cálcio e ativadores da PKC, e como os ésteres de forbol (PMA). Outros agentes, como as citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , GM-CSF e IL-8) não ativam a NADPH oxidase em neutrófilos, mas induzem um estado de hiper-responsividade à estimulação subsequente e produção de EROs, processo conhecido como efeito "*priming*" (96).

Os agentes oxidantes gerados pela NADPH oxidase incluem o  $\text{O}_2^{\cdot -}$ , peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), radical hidroxila ( $\text{OH}^{\cdot}$ ) e, na presença da mieloperoxidase, ácido hipocloroso ( $\text{HOCl}$ ) (97). O  $\text{H}_2\text{O}_2$  é formado a partir do  $\text{O}_2^{\cdot -}$  que é convertido pela mieloperoxidase dos neutrófilos ou peroxidase de eosinófilos para oxidantes mais reativos tais como ácidos hipocloroso e hipobromoso. O ácido hipocloroso é o

principal agente oxidante produzido pelos neutrófilos (98) (esquematizado na Figura 2).



**Figura 2** - Produção de EROs pelo sistema NADPH oxidase (NOX2) e ácido peroxinitrito pela iNOS. Geração de agentes oxidantes após a fagocitose de bactéria pelos neutrófilos. A NADPH oxidase é ativada na membrana do fagossoma e os elétrons são transferidos da NADPH para o oxigênio gerando o radical superóxido, que se dismuta a peróxido de hidrogênio. Os grânulos azurófilos contêm a enzima MPO, que, na presença de um haleto como o cloreto (Cl<sup>-</sup>), converte o peróxido de hidrogênio em ácido hipocloroso, um potente agente antimicrobiano. As espécies reativas de nitrogênio (ERN) agem em conjunto com as EROs causando estresse nitrosativo, sendo que essas duas espécies reativas são produzidas no combate aos agentes invasores. O O<sub>2</sub><sup>•-</sup> reage rapidamente com o NO, e esta reação produz ONOO<sup>-</sup> (peroxinitrito), que é altamente reativo, podendo reagir com outras moléculas para formar outros tipos de ERN incluindo o ONOOH (ácido peroxinitrito). Figura adaptada de Winterbourn (99).

Acreditava-se que os neutrófilos não possuíam ou tinham apenas algumas mitocôndrias, e que essas não exerciam função importante na função celular. Além disso, estudos utilizando microscopia eletrônica quase não identificavam mitocôndria em neutrófilos (100). No entanto, a mitocôndria é recentemente descrita no neutrófilo como uma organela peculiar, em comparação com mitocôndrias de outros tipos celulares. Com a técnica de PCR quantitativo, identificaram que os neutrófilos possuíam mtDNA (DNA mitocondrial). Além disso, verificou-se que o número de mitocôndrias seria maior do que 5 ou 6 por neutrófilo, o que já havia sido estimado pela técnica de microscopia eletrônica (101).

Os neutrófilos também podem produzir EROs pela cadeia de transporte de elétrons (CTE) que está localizada na membrana interna da mitocôndria, e que produz ATP em organismos aeróbios. Esta é formada por cinco complexos protéicos: NADH desidrogenase (complexo I), succinato desidrogenase (complexo II), complexo citocromo bc1 (complexo III), ciclo-oxigenase (COX) (complexo IV) e ATP sintase (complexo V) (102). As mitocôndrias geram  $O_2^{\bullet-}$  principalmente pela redução univalente do oxigênio nos complexos I e III da cadeia de transporte de elétrons (103), sendo que o complexo I contribui com o escape de elétrons na matriz mitocondrial e o complexo III na matriz e no citoplasma. O  $O_2^{\bullet-}$ , também pode ser gerado através, do sistema xantina-xantina oxidase e do citocromo  $P_{450}$ . O radical  $O_2^{\bullet-}$  então formado, caso não seja eficientemente eliminado pelo sistema antioxidante, pode ainda ser convertido em  $H_2O_2$  e radical hidroxil (104, 105).

### 1.7 ÓXIDO NÍTRICO (NO)

O óxido nítrico (NO) é sintetizado a partir da L-arginina pela enzima NO sintase induzível (iNOS). Existem duas formas de NO sintase: I) a constitutiva, com baixa atividade, está presente no endotélio vascular e sistema nervoso central e produz baixas quantidades de óxido nítrico; II) a indutiva, que possui alta atividade e é produzida por fagócitos quando estes são estimulados (94). Além das células endoteliais, o óxido nítrico é sintetizado pelos macrófagos (106), neutrófilos (107) e cerebelo (108). Em macrófagos e neutrófilos, o NO participa das respostas imunológica e inflamatória (109, 110).

O NO é citotóxico e causa danos por sua capacidade de difusão e também

por se combinar com o  $O_2^{\bullet-}$ , formando o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), um radical muito mais potente que o NO e o  $O_2^{\bullet-}$ . O peróxinitrito, produto formado pela reação do  $O_2^{\bullet-}$  com o NO, é um potente oxidante, com propriedades similares ao radical hidroxil, e reage com íon  $H^+$  formando  $ONOOH$  (ácido peroxinitrito) que se decompõe em  $HO^{\bullet}$  e radical dióxido de nitrogênio ( $NO_2$ ) (111) (Figura 2).

O NO pode também exercer efeito tóxico, combinando-se a grupos heme, de várias enzimas, inativando-as, bloqueando a respiração e levando à morte da célula (112).

## 2 JUSTIFICATIVA PARA A REALIZAÇÃO DO ESTUDO

O óleo de peixe apresenta propriedades anti-inflamatórias, contudo, ainda não se sabe se este efeito é devido ao EPA, DHA ou a uma ação conjunta dos dois ácidos graxos ômega-3. Neste estudo, comparamos os efeitos de EPA e DHA na função de neutrófilos de ratos *ex vivo*.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a influência de EPA e DHA sobre a função de neutrófilos de ratos *ex vivo*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Comparar os efeitos do EPA e DHA sobre:

- 1) a morte de neutrófilos;
- 2) produção de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CINC-2, IL-10 e IL-6);
- 3) produção de NO e EROs;
- 4) atividade fagocitária;
- 5) atividade fungicida.



## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE EPA E DHA

Os ácidos graxos (EPA e DHA), adquiridos da *Sigma Chemical Company* (St. Louis, MO, USA), foram diluídos em etanol conforme descrito em trabalho anterior do grupo em macrófagos (113).

### 4.2 ANIMAIS

Ratos *Wistar* machos (*Rattus norvegicus*) pesando  $200 \pm 20$  g foram obtidos do biotério do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Os animais foram mantidos no biotério de experimentação do Departamento de Fisiologia e Biofísica, à temperatura de 23 °C, sob ciclo claro: escuro de 12 horas e tiveram livre acesso à ração e água.

Os procedimentos realizados neste estudo foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (protocolo nº 103 nas fls 74 do livro 02).

### 4.3 OBTENÇÃO DE NEUTRÓFILOS

As células foram obtidas 3 horas após a administração intraperitoneal de solução estéril de glicogênio de ostra (SIGMA, Tipo II) a 1% em PBS (cloreto de sódio 136,8 mM, cloreto de potássio 2,7 mM, fosfato de potássio 0,9 mM, fosfato de sódio dibásico 6,4 mM; pH: 7,4). A coleta das células foi realizada por lavagem da cavidade peritoneal com cerca de 50 mL de PBS estéril). Em seguida, as células foram centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos a 4 °C. Descartou-se o sobrenadante e as células foram ressuspensas em solução hipotônica de cloreto de amônia (cloreto de amônia 150 mM, bicarbonato de sódio 10 mM, EDTA 0,1 mM; pH: 7,4) para a lise das hemácias. Após essa etapa, as células foram centrifugadas a 1200 rpm por 10 minutos a 4 °C e lavadas com PBS. Posteriormente, foram ressuspensas em meio RPMI-1640 tamponado com bicarbonato de sódio 24 mM, HEPES 20 mM, enriquecido com 10% de soro fetal bovino (SFB) e glutamina 2 mM,

e adicionado de antibióticos (10 U/mL de penicilina e 10 µg/mL de estreptomicina) ou PBS suplementado [cloreto de cálcio (1 mM), cloreto de magnésio (1,5 mM), glicose (10 mM) e SFB (10%)]. A contagem celular foi realizada em câmara de *Neubauer* utilizando líquido de *Turk* como diluente. A população celular utilizada neste estudo continha principalmente neutrófilos como pode ser observado no quadro abaixo:

**Quadro 2** - Contagem de células peritoneais no período de 3 horas após administração de glicogênio de ostra (1%). Resultados estão expressos como média ± E.P.M de dois animais.

Células peritoneais	Porcentagem (3 horas)
Neutrófilos	94 ± 2
Macrófagos	06 ± 2

#### 4.4 AVALIAÇÃO DA CITOXICIDADE DE EPA E DHA

Para avaliar a toxicidade dos ácidos graxos foram feitos os ensaios de integridade de membrana e fragmentação de DNA em células incubadas com várias concentrações de EPA e DHA (12,5 µM – 150 µM). Células obtidas do lavado peritoneal foram colocadas ( $2,5 \times 10^6$  células/mL) em placas de 24 poços e tratadas com várias concentrações de EPA e DHA por 4 ou 18 horas em meio RPMI como mostrado por Vinolo et al.(2010) (114). Após o tratamento, avaliou-se a integridade da membrana plasmática e a fragmentação de DNA em citômetro de fluxo (FACSCalibur, Becton Dickinson, EUA) utilizando o fluoróforo iodeto de propídio (IP), conforme descrito em trabalho anterior do grupo em macrófagos (113).

Esses ensaios foram realizados com o objetivo de estabelecer as concentrações não tóxicas desses ácidos graxos a serem utilizadas nos experimentos seguintes. Em todos os experimentos utilizou-se controle contendo células incubadas com a concentração máxima de etanol ( $\leq 0,5\%$ ) usada na diluição dos ácidos graxos.

#### 4.4.1 Avaliação da integridade da membrana celular

Para a análise de integridade de membrana, as células foram centrifugadas e o precipitado foi ressuspenso em 500 µL de PBS, ao qual se adicionou 50 µL de solução de IP (20 µg/mL). As células foram imediatamente analisadas no citômetro de fluxo (Becton Dickinson) a 488 nm do laser de argônio para excitação e canal de fluorescência laranja-vermelho (585/42 nm) para leitura. Foram adquiridos 10.000 eventos por amostra e a análise foi, posteriormente, realizada utilizando o programa *Cell Quest* (Becton Dickinson, EUA).

A avaliação da integridade de membrana foi realizada utilizando IP, que é um composto fluorescente altamente solúvel em água e que não atravessa membranas intactas. O IP entra apenas nas células com perda da integridade de membrana, e se intercala entre as bases do DNA.

#### 4.4.2 Avaliação da fragmentação de DNA

As células foram centrifugadas e o precipitado foi ressuspenso em 300 µL de solução hipotônica contendo 50 µg/mL de IP, 0,1% de citrato de sódio e 0,1% de Triton X-100, que permeabiliza as células, e permite a incorporação do PI no DNA.

Os tubos foram incubados por 30 minutos a temperatura ambiente no escuro. Após esse período, as amostras foram analisadas no citômetro de fluxo em que a presença de fragmentos com baixa fluorescência é indicativa de clivagem do DNA (115). As análises foram realizadas como descrito acima.

### 4.5 DETERMINAÇÃO DAS CITOCINAS

Neutrófilos de rato foram plaqueados na concentração de  $2,5 \times 10^6$  células/mL, a 37 °C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>, em placas de cultura de 24 poços. As células foram mantidas em meio RPMI 1640 contendo SFB (10%). A concentração de LPS (*Escherichia coli* 0111:B4 SIGMA) utilizada nos experimentos foi de 5 µg/mL e a coleta do sobrenadante foi realizada após 18 horas de incubação. O sobrenadante das culturas foi obtido por centrifugação (1200 rpm, 10 minutos) e

congelado (-80 °C) para posterior determinação das citocinas.

A quantificação das citocinas TNF-  $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e CINC-2 produzidas *ex vivo* pelos neutrófilos (sobrenadante das culturas) foi realizada pelo método de ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando *kits* DuoSet da R&D System (Minneapolis, MN, USA) de acordo com procedimento fornecido pelo fabricante.

#### 4.6 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE NO

A determinação de nitrito presente no sobrenadante é uma forma indireta de avaliar a produção de NO pelas células. O método utilizado foi o de Ding et al. (116). O nitrito presente no sobrenadante das culturas reage com a sulfanilamida e o  $\alpha$ -naftil etilenodiamina formando um azo composto, o qual absorve luz no comprimento de 550 nm. Esse procedimento tem sido utilizado em diversos trabalhos do grupo (117-119).

As células ( $2,5 \times 10^6$  por poço) foram mantidas em estufa de CO<sub>2</sub> a 37°C por 18 horas com concentrações não tóxicas de EPA e DHA na presença ou não de LPS (5 ug/mL). Após o período de incubação, 100  $\mu$ L dos sobrenadantes das culturas foram transferidos para placa de 96 poços e, posteriormente, adicionou-se igual volume do reagente de Griess (solução de sulfanilamida a 1% e solução de  $\alpha$ -naftiletilenodiamino a 0,1%). A concentração do nitrito foi determinada por densidade ótica em espectrofotômetro a 550 nm (*Spectra MAX plus, Molecular Devices*). A quantificação foi realizada utilizando curva padrão de nitrito de sódio (5 – 80  $\mu$ M).

#### 4.7 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

A análise do efeito dos ácidos EPA e DHA sobre a produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos foi realizada pelas técnicas: AMPLEX ultrared® que permite determinar principalmente peróxido de hidrogênio nos meios intra- e extracelular e a técnica de quimioluminescência amplificada pela lucigenina (*N,N Dimethyl – 9,9 – biacridinium dinitrate*) utilizada na quantificação extracelular principalmente de O<sub>2</sub><sup>•-</sup>.

##### 4.7.1 Avaliação de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pelo método de Amplex® Ultrared

O ensaio de fluorescência utilizando o reagente Amplex<sup>®</sup> Ultrared (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) é outra forma de quantificar ROS, porém permite detectar principalmente peróxido de hidrogênio. Placas de 96 poços foram preparadas contendo  $5 \times 10^5$  células em 250  $\mu\text{L}$  ( $2 \times 10^6$  cél/mL) PBS suplementado (1 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 10 mM glicose e 10% SFB), Amplex<sup>®</sup> Ultrared (50  $\mu\text{M}$ ) e HRP tipo II (0,1 U/mL), na ausência ou presença de EPA ou DHA (12,5  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 150  $\mu\text{M}$ ) e PMA (10 nM), totalizando volume final de 200  $\mu\text{L}$ . Os ensaios foram realizados em duplicata. A placa foi incubada no escuro a 37 °C, em atmosfera úmida, por 1 h, seguido da leitura em fluorímetro (*Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader*) (excitação 530 nM/ emissão 590 nM) (120). Os resultados foram expressos como fluorescência ao longo de 1 h, subtraindo-se a leitura do branco (mesmos reagentes, porém sem células). O Amplex<sup>®</sup> (N-acetil-3,7-diidroxifenoxazina) atua como doador de elétrons para a reação de redução do  $\text{H}_2\text{O}_2$  catalisada pela HRP, na proporção de 1:1. O produto da oxidação do Amplex<sup>®</sup> pela HRP é denominado resorufina, um composto vermelho, estável e fluorescente, que pode ser quantificado por fluorimetria, sendo uma evidência indireta da quantidade de peróxido de hidrogênio na amostra (121). Amplex ultrared tem sido relatada como uma técnica altamente sensível para avaliar a produção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (122).

#### 4.7.2 Avaliação do ânion superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ) pela técnica de quimioluminescência amplificada pela lucigenina

A sonda lucigenina permite avaliar principalmente a produção extracelular de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (123, 124). Essa técnica se baseia na redução da sonda, que ocorre na presença de  $\text{O}_2^{\bullet-}$ , e formação de um composto excitado (acridona), o qual, ao retornar ao estado fundamental, emite luminescência.

Resumidamente, placas opacas (brancas) de 96 poços foram preparadas contendo  $5 \times 10^5$  células em 250  $\mu\text{L}$  de PBS suplementado com  $\text{CaCl}_2$  (1 mM),  $\text{MgCl}_2$  (1,5 mM), glicose (10 mM) e SFB (10%) . A produção de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  foi monitorada, após a adição de lucigenina (1 mM), em luminômetro (*EG&G Berthold Microplate Luminometer, Berthold Technologies, Germany*) por 60 minutos. Foram utilizados controles negativos contendo todos os componentes exceto as células, para avaliar

se havia alguma interferência nas determinações. Nestes experimentos, utilizou-se como controles positivos PMA e zimosan (*Zymosan A from Saccharomyces cerevisiae*, SIGMA). A análise dos resultados foi realizada utilizando a integral das curvas obtidas ao longo do período de análise para cada uma das amostras.

#### 4.7.3 Inibidores da NADPH oxidase e da oxidação dos AG

Etomoxir (inibidor da oxidação de AG, pois inibe a carnitina palmitoil transferase-I, CPT-I) 10  $\mu\text{M}$  (32) e difenil-eneiodônio (DPI) (inibidor da NADPH oxidase) 2  $\mu\text{M}$  (125) foram utilizados em alguns experimentos com o intuito de investigar os mecanismos envolvidos na produção de EROs induzida por EPA e DHA. Os inibidores foram incubados por 30 minutos antes da adição dos AGs em temperatura ambiente no escuro (125) com os neutrófilos em placa branca de 96 poços. Após este período, foi feita a análise como descrito acima.

As concentrações dos inibidores utilizadas neste ensaio foram determinadas através da análise integridade de membrana e fragmentação de DNA dos neutrófilos. O etomoxir foi avaliado nas concentrações de 10 e 25  $\mu\text{M}$  e o DPI em 2, 5 e 10  $\mu\text{M}$ . Estas concentrações não foram tóxicas para as células (dados não mostrados).

#### 4.8 OBTENÇÃO DE SORO HOMÓLOGO NORMAL (SHN)

A coleta de sangue de ratos, machos, adultos foi realizada por decapitação, sem uso de anticoagulante. Após retração do coágulo, o sangue foi centrifugado (2000 rpm, durante 20 minutos, a 4 °C) para obtenção do soro. O soro foi posteriormente fracionado em volumes de 1 mL e armazenado a -20 °C até o uso.

O soro foi utilizado para opsonização do zimosan, que foi usado como controle positivo na produção de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  e opsonização de *Candida albicans* na avaliação da fagocitose e atividade fungicida.

#### 4.9 OPSONIZAÇÃO DO ZIMOSAN

O zimosan foi diluído em PBS e, após determinação do número de partículas,

alíquotas foram preparadas e congeladas. No momento do experimento, o zimosan foi incubado com o mesmo volume de soro de rato, como descrito no item 4.8, por 30 minutos a 37 °C sob agitação lenta. O zimosan já opsonizado foi então centrifugado e ressuspendido em PBS. O zimosan opsonizado foi adicionado nas células do lavado peritoneal imediatamente antes da leitura cinética de 60 minutos da produção de  $O_2^{\bullet -}$ , de modo que, ao final, foram adicionadas cinco partículas de zimosan por célula.

#### 4.10 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE FAGOCITÁRIA E DA ATIVIDADE FUNGICIDA, EX VIVO, DE CÉLULAS PERITONEAIS

As leveduras foram obtidas após cultura de 24 horas em meio ágar-Sabouraud (Difco® BD, Le Pont de Claix, França, Europa). Foi feita uma suspensão de *Candida albicans* em PBS estéril (pH 7,4) e SHN, perfazendo um total de  $3,75 \times 10^6/1,5$  mL. Esta suspensão foi incubada a 37 °C, sob agitação lenta, durante 30 minutos. Esse procedimento foi realizado em condições assépticas empregando-se materiais estéreis.

##### 4.10.1 Ensaios de fagocitose e de atividade fungicida de neutrófilos

*Candidas albicans* opsonizadas foram adicionadas em microtubos estéreis, como relatado no item 4.10, nas células peritoneais na proporção de 1:5 (126) contendo PBS suplementado com  $CaCl_2$  (1 mM),  $MgCl_2$  (1,5 mM), glicose (10 mM) e SFB (10%). Os tubos foram incubados a 37 °C em agitação lenta, durante 40 minutos, com EPA e DHA. Após o período acima mencionado, alíquotas desta solução foram retiradas e utilizadas para a citocentrifugação, corados posteriormente pela técnica de May-Grunwald-Giemsa modificada (127). Para avaliação da fagocitose, foram contadas, no mínimo, 100 células por lâmina, sendo consideradas como tendo realizado fagocitose as células que apresentaram, pelo menos, uma *Candida albicans* internalizada (128-130). A atividade fungicida foi avaliada pela técnica de coloração proposta por Herscowitz (1981) (131). Nesta técnica, leveduras vivas coram-se de azul com May-Grunwald-Giemsa, enquanto leveduras mortas não se coram. A atividade fungicida foi avaliada contando-se, no mínimo, 100 células

que fagocitaram *Candida albicans*. Como o número de leveduras fagocitadas e mortas varia, a atividade fungicida foi expressa por meio de escore conforme critério estabelecido por Corazzini (1993) (132) e descrito abaixo (Tabela 1):

**Tabela 1** - Valores de escore para a atividade fungicida de neutrófilos.

<b>Resultado</b>	<b>Escore</b>
n° de neutrófilos com zero <i>Candida albicans</i> morta	X0
n° de neutrófilos com 1 a 2 <i>Candida albicans</i> mortas	X1
n° de neutrófilos com 3 a 4 <i>Candida albicans</i> mortas	X2
n° de neutrófilos com + 4 <i>Candida albicans</i> mortas	X3

#### 4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média. O programa Prisma 5.02 (Graph Pad Software, Inc., San Diego, CA, USA) foi utilizado para realização das análises estatísticas. Comparações entre os grupos experimentais foram realizadas por análise de variância *one-way* ANOVA e pós-teste de Dunnet. Para comparações com dois fatores (os dois AGs e várias concentrações dos mesmos) foi usado *two-way* ANOVA com pós-teste de Bonferroni. As diferenças foram consideradas significativas para  $p < 0,05$ .



## 5 RESULTADOS

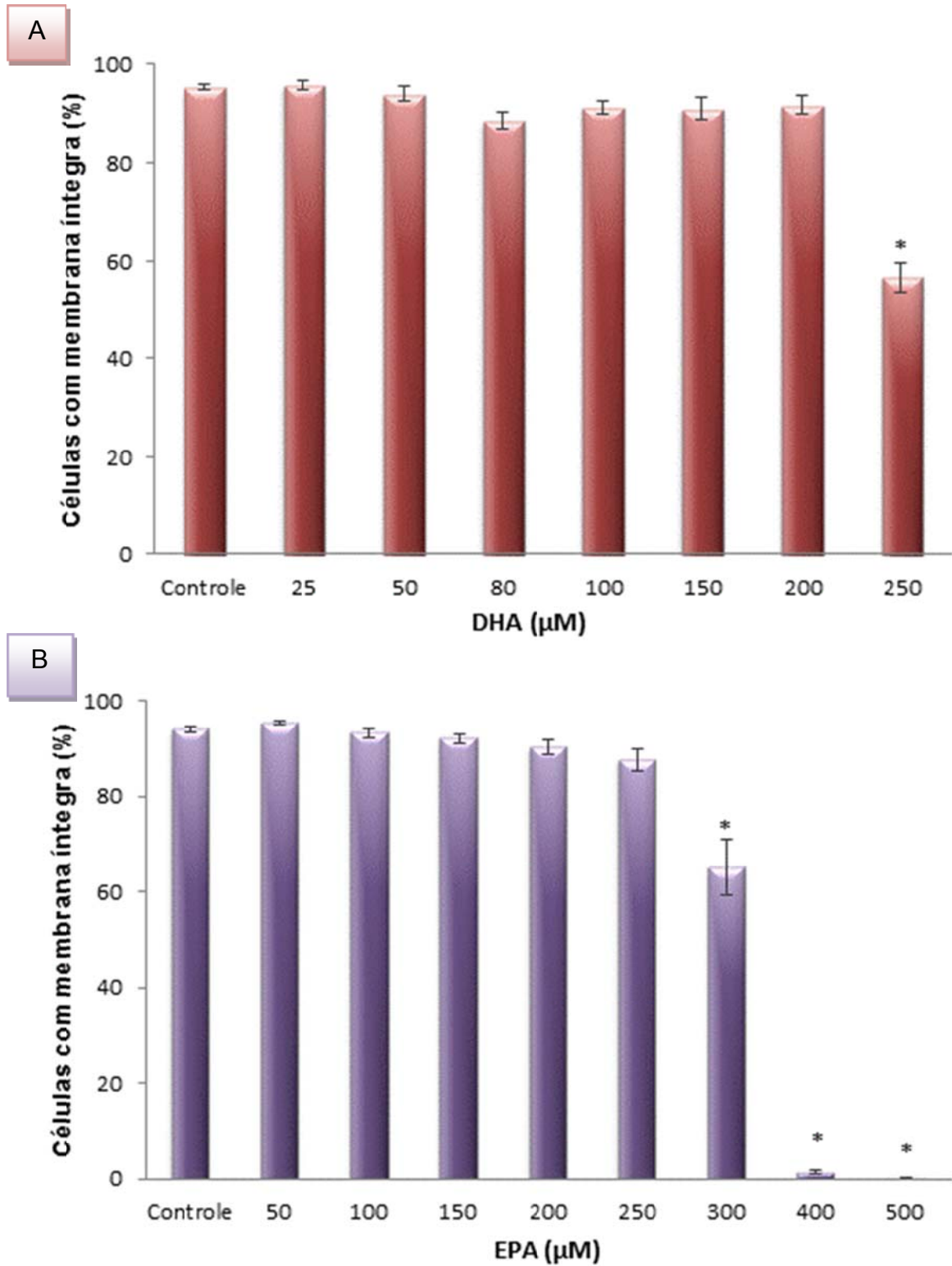
### 5.1 TOXICIDADE DOS ÁCIDOS GRAXOS EM NEUTRÓFILOS

Os neutrófilos foram incubados com várias concentrações dos AGs (DHA e EPA) e, após 4 e 18 horas, avaliou-se por citometria de fluxo, utilizando o fluoróforo iodeto de propídio, a integridade de membrana e o estado de fragmentação do DNA.

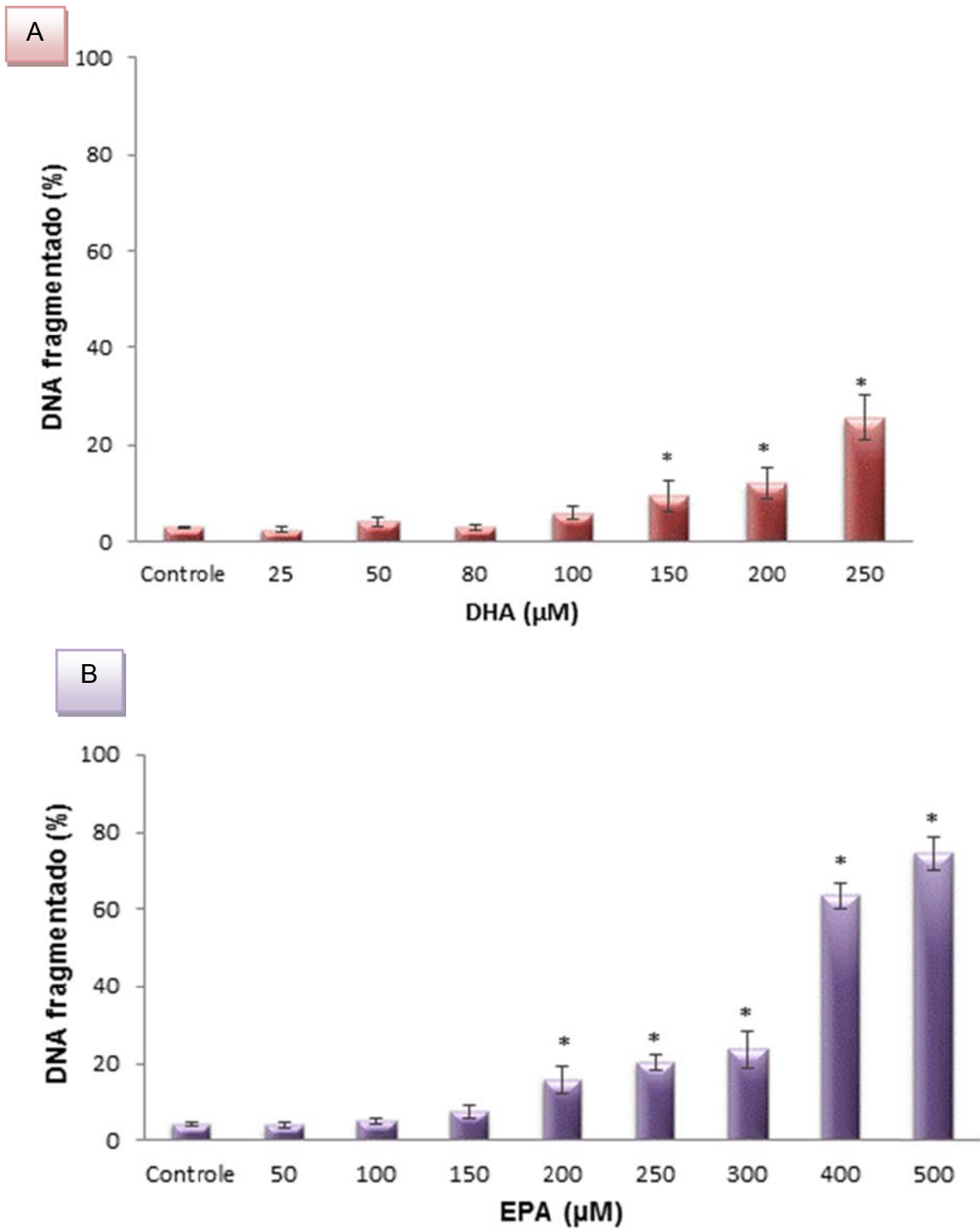
No período de 4 horas, o DHA (Figura 3 A) induziu perda de integridade de membrana na concentração de 250  $\mu\text{M}$ , já o EPA alterou esse parâmetro a partir da concentração de 300  $\mu\text{M}$  (Figura 3 B). Com relação à fragmentação de DNA, o EPA teve efeito a partir de 200  $\mu\text{M}$  (Figura 4 B) enquanto que o DHA a partir de 150  $\mu\text{M}$  (Figura 4 A). No período de 18 horas, o EPA na concentração de 150  $\mu\text{M}$  e o DHA a 75  $\mu\text{M}$  induziram perda de integridade da membrana. Aumento da fragmentação de DNA após 18 horas de incubação ocorreu na concentração de 100  $\mu\text{M}$  para o EPA e 75  $\mu\text{M}$  para o DHA (Figura 6).

O controle tratado com etanol, o veículo utilizado para a preparação dos AGs, não causou perda da integridade de membrana ou fragmentação do DNA. Assim, a concentração de etanol utilizado (0,5%) não é citotóxica. Resultado semelhante foi obtido por Lima et al. em macrófagos (117).

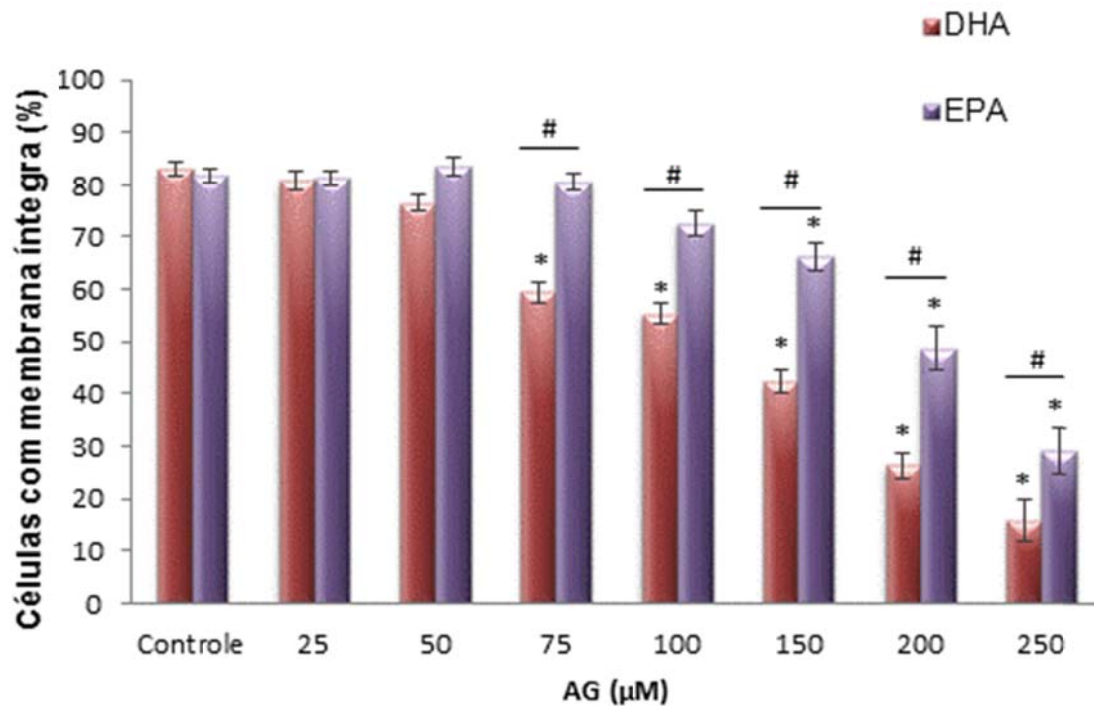
Com base nestes resultados, estabeleceu-se as concentrações máximas não tóxicas dos AGs para os neutrófilos em cultura por 4 e 18 horas (Tabela 2).



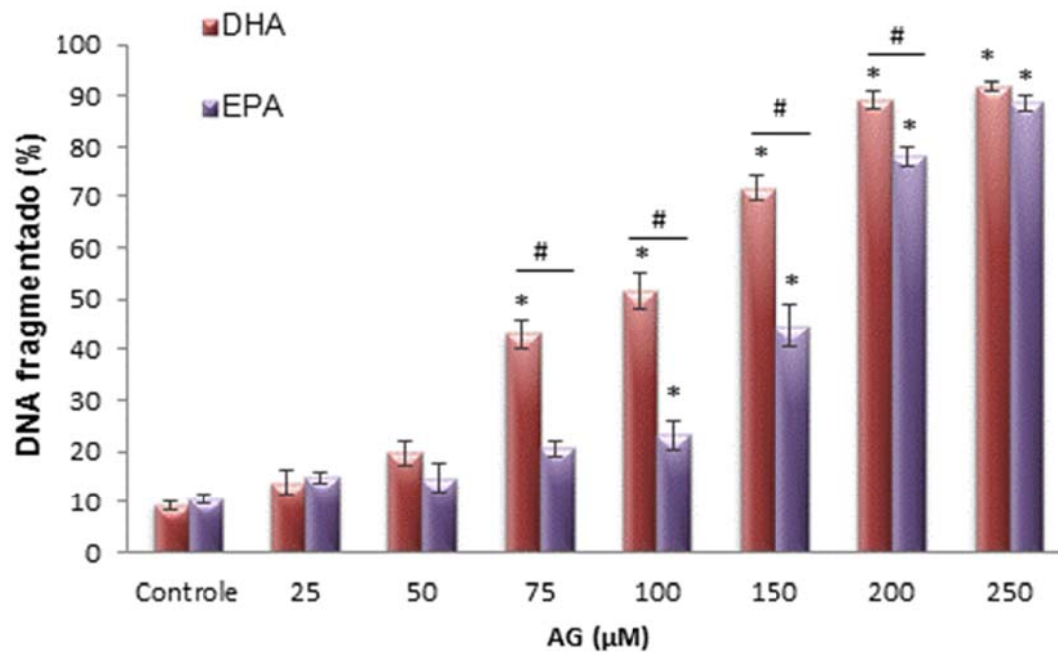
**Figura 3** - Avaliação por citometria de fluxo do efeito de DHA e EPA sobre a integridade de membrana em neutrófilos obtidos de ratos e incubados por quatro horas. O controle foi tratado com o mesmo volume de etanol. Resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M de pelo menos quatro animais em triplicata. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao controle.



**Figura 4** - Avaliação por citometria de fluxo do efeito de DHA e EPA sobre a fragmentação de DNA de neutrófilos obtidos de ratos e incubados por quatro horas. O controle foi tratado com o mesmo volume de etanol. Resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M de pelo menos cinco animais em triplicata. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao controle.



**Figura 5** - Avaliação por citometria de fluxo do efeito de DHA e EPA sobre a integridade de membrana em neutrófilos obtidos de ratos e incubados por dezoito horas. O controle foi tratado com o mesmo volume de etanol. Resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M de pelo menos quatro animais em triplicata. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao controle e #  $p < 0,05$  na comparação entre DHA e EPA.



**Figura 6** - Avaliação por citometria de fluxo do efeito de DHA e EPA sobre a fragmentação de DNA de neutrófilos obtidos de ratos e incubados por dezoito horas. O controle foi tratado com o mesmo volume de etanol. Resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M de pelo menos quatro animais em triplicata. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao controle. #  $p < 0,05$  na comparação entre DHA e EPA.

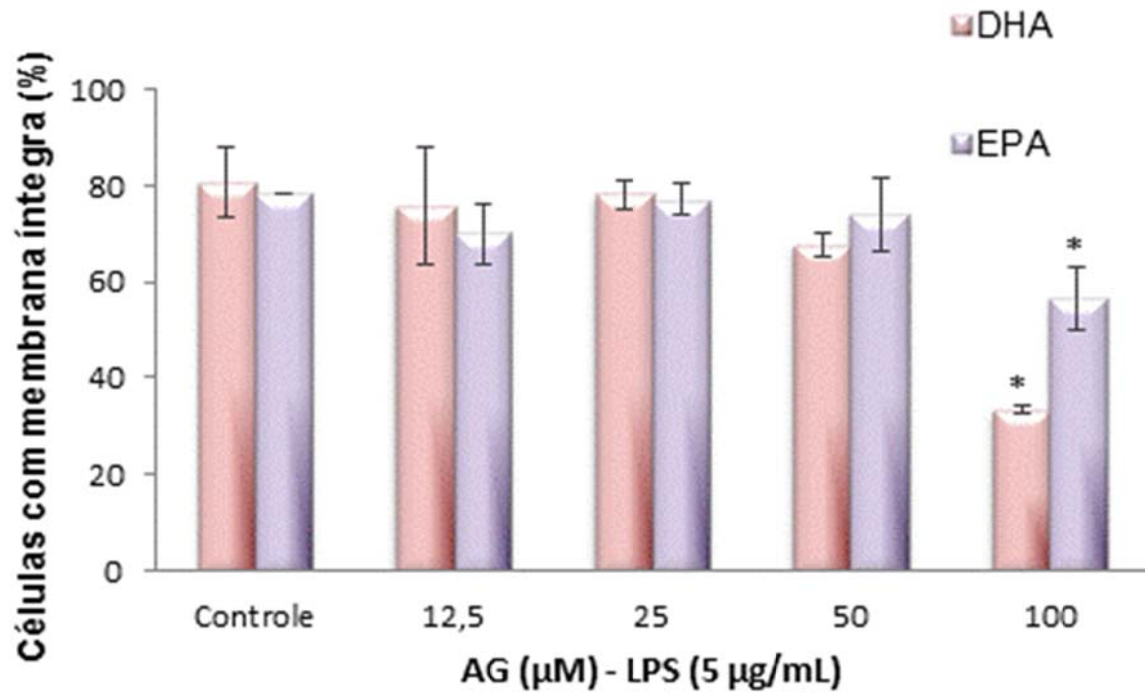
**Tabela 2** - Concentrações máximas não tóxicas dos ácidos EPA e DHA em neutrófilos.

Ácidos graxos	Período de tratamento	
	4 horas	18 horas
EPA	150 $\mu$ M	75 $\mu$ M
DHA	100 $\mu$ M	50 $\mu$ M

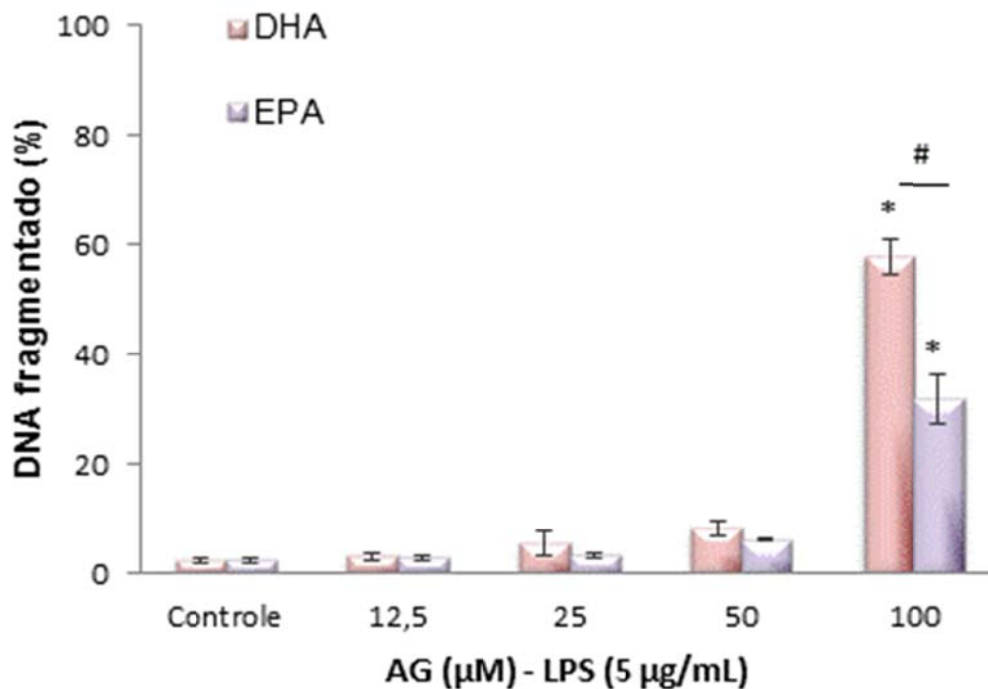
## 5.2 TOXICIDADE DE DHA E EPA EM NEUTRÓFILOS TRATADOS COM LPS

Os neutrófilos foram incubados com as mesmas concentrações de AGs (DHA e EPA) anteriormente citadas e LPS (5  $\mu$ g/mL) por 18 horas. Após esse período, avaliou-se a integridade de membrana e a fragmentação de DNA.

Em relação à fragmentação de DNA, na presença de LPS, houve maior toxicidade do DHA em relação ao EPA somente na concentração de 100  $\mu$ M (Figura 8). EPA e o DHA causaram perda de integridade de membrana com 100  $\mu$ M na presença do LPS (Figura 7).



**Figura 7** - Avaliação por citometria de fluxo do efeito de DHA e EPA, na presença do LPS, sobre a integridade de membrana em neutrófilos obtidos de ratos e incubados por dezoito horas. O controle foi tratado com o mesmo volume de etanol. Resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M de pelo menos quatro animais em triplicata. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao controle.



**Figura 8** - Avaliação por citometria de fluxo do efeito de DHA e EPA, na presença do LPS, sobre a fragmentação de DNA de neutrófilos obtidos de ratos e incubados por dezoito horas. O controle foi tratado com o mesmo volume de etanol. Resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M de pelo menos quatro animais em triplicata. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao controle. #  $p < 0,05$  na comparação entre DHA e EPA.

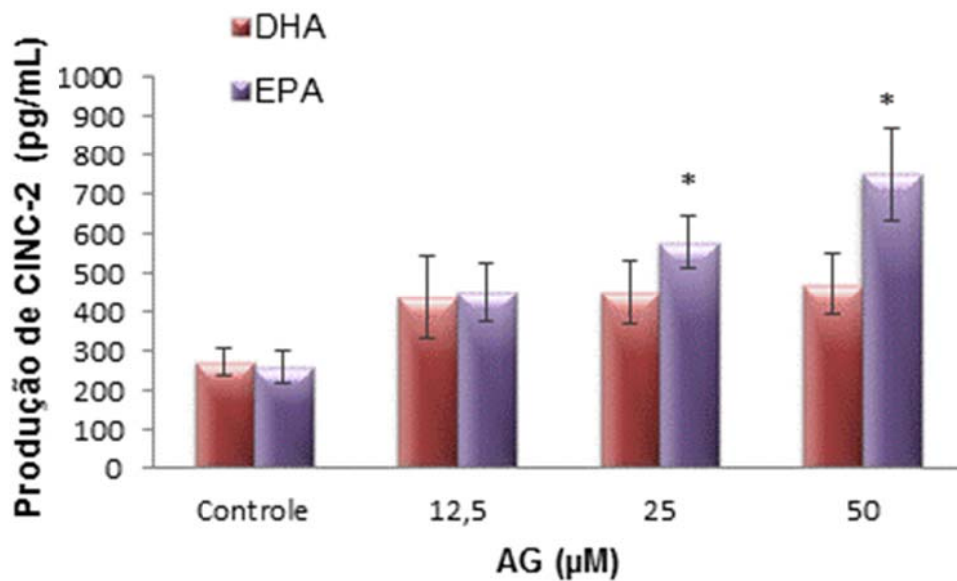
### 5.3 PRODUÇÃO DE CITOCINAS

Os neutrófilos foram avaliados quanto à capacidade de produzir CINC-2, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  na presença de concentrações não tóxicas dos ácidos graxos e LPS. A quantificação das citocinas no sobrenadante foi realizada após 18 horas de cultura.

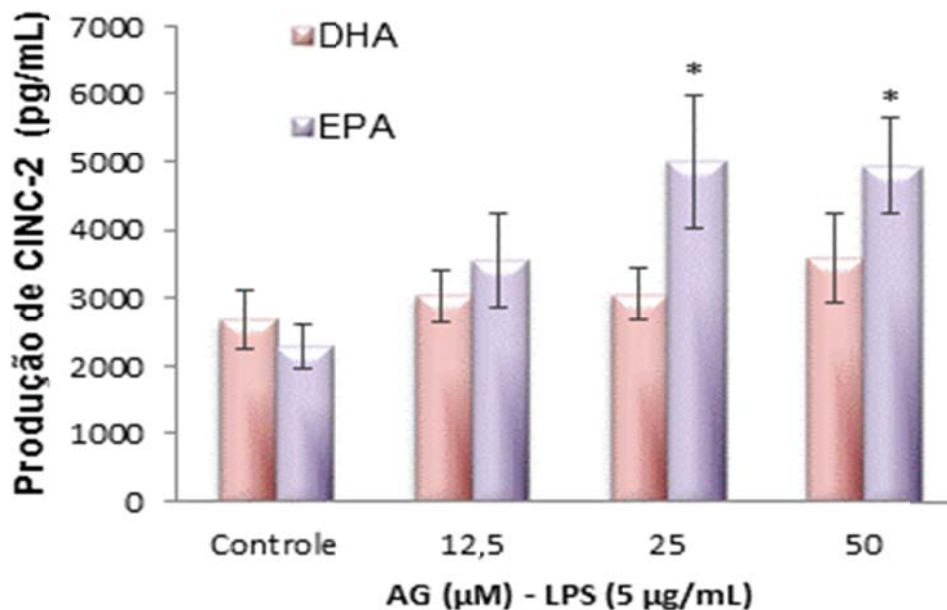
O EPA aumentou a produção de CINC-2 no período de 18 horas de incubação dos neutrófilos a partir da concentração de 25  $\mu$ M (25  $\mu$ M aumentou 2,2 e 50  $\mu$ M 2,9 vezes). Com DHA não foi observada qualquer alteração (Figura 9). O LPS aumentou em 9,8 vezes a produção de CINC-2. EPA a partir de 25  $\mu$ M apresentou efeito aditivo ao LPS na produção de CINC-2 pelos neutrófilos (25  $\mu$ M de 2,19 e 50  $\mu$ M 2,16 vezes). O DHA não provocou qualquer alteração (Figura 10).

A produção de TNF- $\alpha$  foi aumentada nas células incubadas com 25  $\mu$ M de EPA e DHA. Com 50  $\mu$ M, o DHA causou diminuição na produção de TNF- $\alpha$ , porém, na presença de EPA, a produção nos neutrófilos manteve-se elevada (Figura 11). O tratamento com LPS elevou a produção de TNF- $\alpha$  em 17,7 vezes. Contudo, na presença do LPS, os AGs não alteraram a produção de TNF- $\alpha$  (Figura 12).

A produção de IL-1 $\beta$  não foi alterada quando os neutrófilos foram tratados com EPA ou DHA (Figura 13). Porém, na presença de LPS, o DHA (50  $\mu$ M) aumentou a produção desta citocina (1,5 vezes) (Figura 14). No controle, o LPS aumentou a produção de IL-1 $\beta$  em 1,4 vezes.

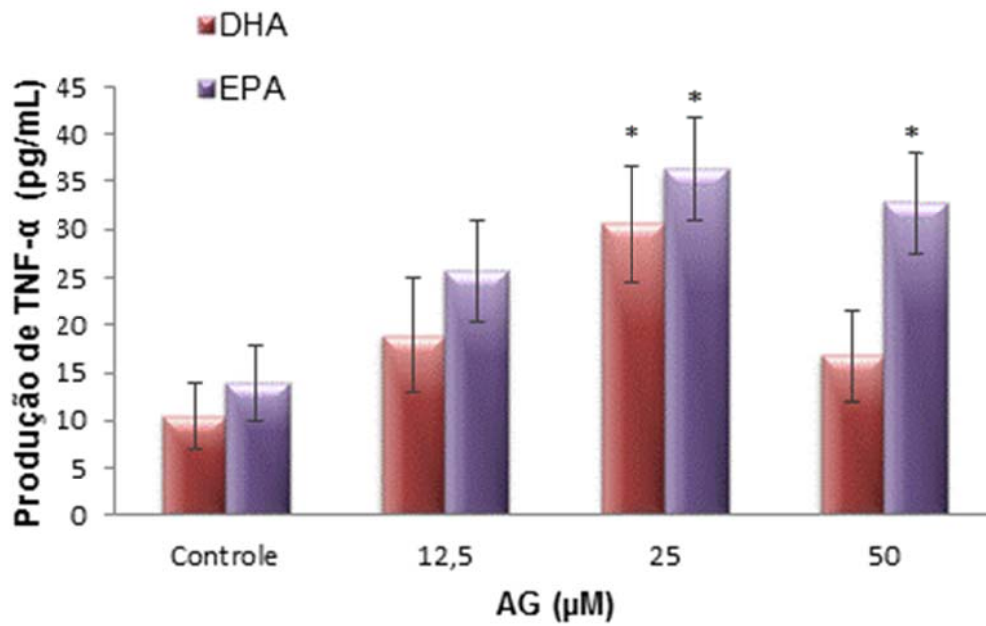


**Figura 9** - Produção de CINC-2 por neutrófilos obtidos de ratos ( $2 \times 10^6$  células/mL). A produção de CINC-2 foi avaliada no sobrenadante das células incubadas por dezoito horas com várias concentrações de AGs. O controle foi tratado com o mesmo volume de etanol. Resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. de pelo menos dez animais. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao controle.

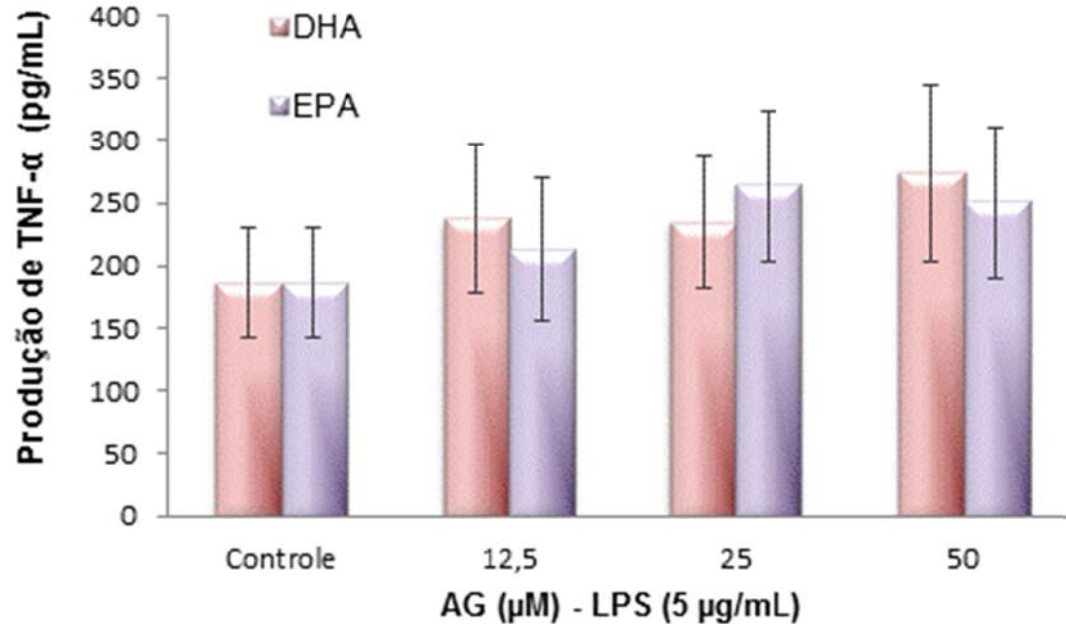


**Figura 10** - Produção de CINC-2 por neutrófilos obtidos de ratos ( $2 \times 10^6$  células/mL). A produção de CINC-2 foi avaliada no sobrenadante das células incubadas por dezoito horas com várias concentrações de AGs com LPS. O controle foi tratado com o mesmo volume de etanol. Resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. de pelo menos dez animais. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao controle.

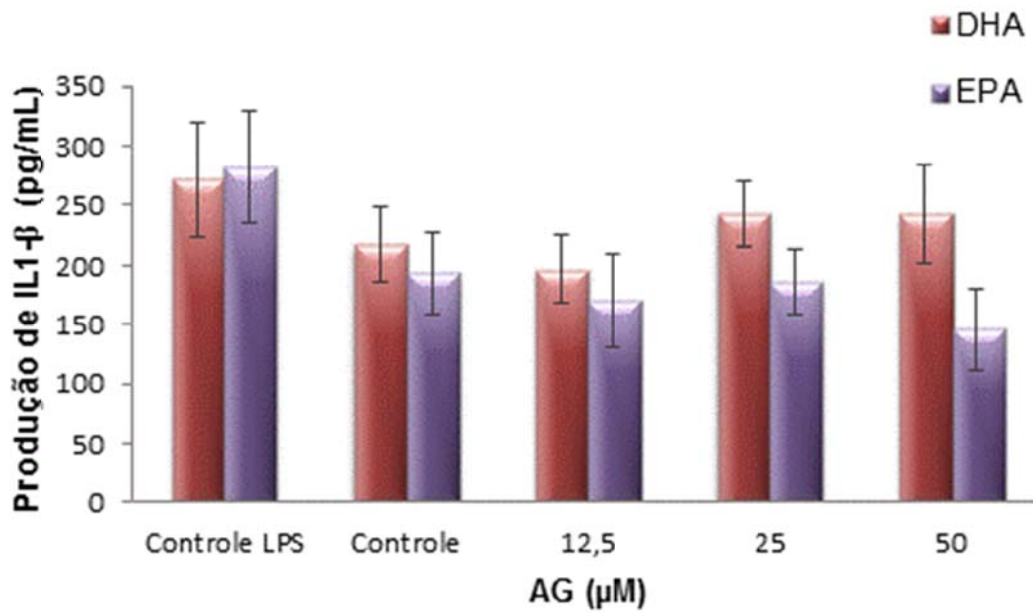




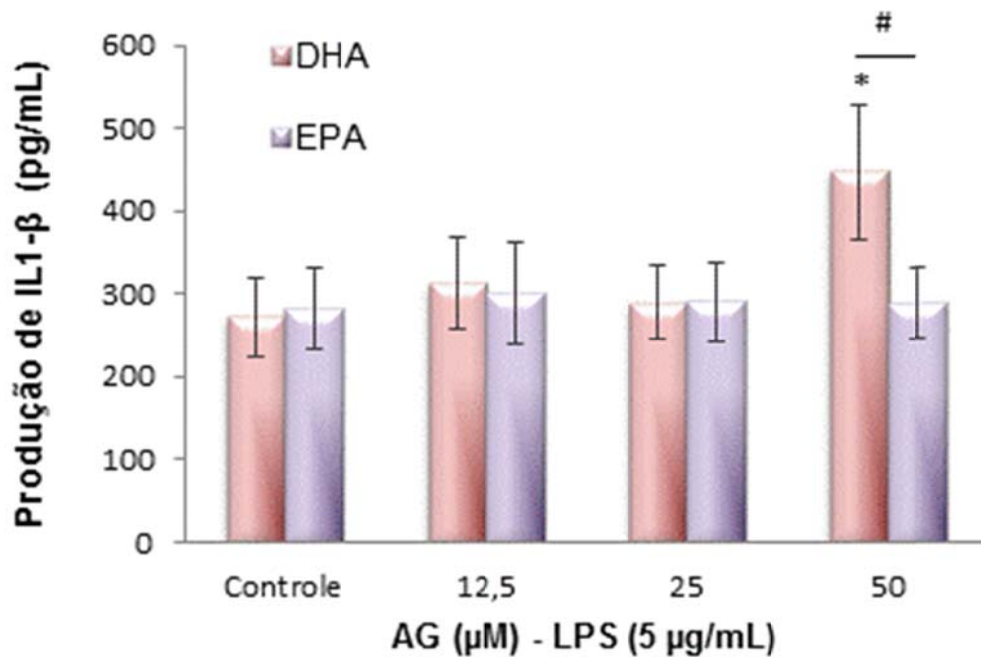
**Figura 11** - Produção de TNF- $\alpha$  por neutrófilos obtidos de ratos ( $2 \times 10^6$  células/mL). A produção de TNF- $\alpha$  foi avaliada no sobrenadante das células incubadas por dezoito horas com várias concentrações de AGs. O controle foi tratado com o mesmo volume de etanol. Resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. de pelo menos nove animais. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao controle.



**Figura 12** - Produção de TNF- $\alpha$  por neutrófilos obtidos de ratos ( $2 \times 10^6$  células/mL). A produção de TNF- $\alpha$  foi avaliada em sobrenadante das células incubadas por dezoito horas com várias concentrações de AGs com estímulo do LPS. O controle foi tratado com o mesmo volume de etanol. Resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. de pelo menos nove animais.



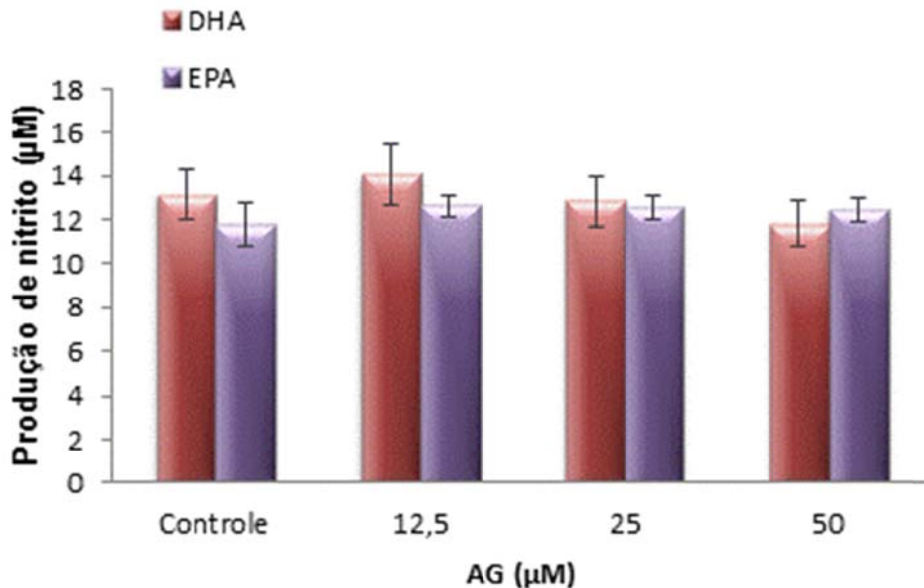
**Figura 13** - Produção de IL1- $\beta$  por neutrófilos obtidos de ratos ( $2 \times 10^6$  células/mL). A produção de IL1- $\beta$  foi avaliada no sobrenadante das células incubadas por dezoito horas com várias concentrações de AGs. O controle foi tratado com o mesmo volume de etanol. Resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M de pelo menos quatorze animais.



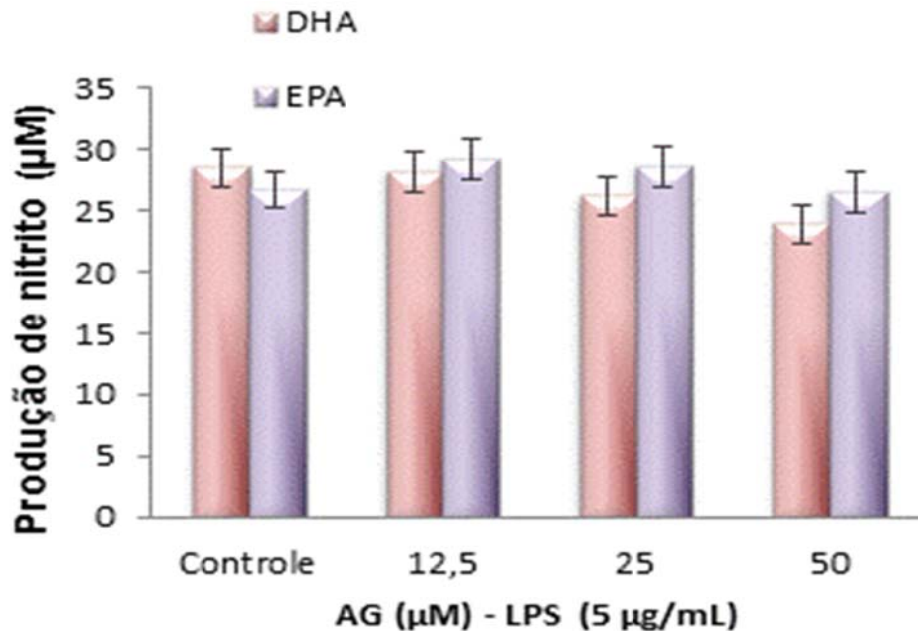
**Figura 14** - Produção de IL1- $\beta$  por neutrófilos obtidos de ratos ( $2 \times 10^6$  células/mL). A produção de IL1- $\beta$  foi avaliada no sobrenadante das células incubadas por dezoito horas com várias concentrações de AGs com estímulo do LPS. O controle foi tratado com o mesmo volume de etanol. Resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. de pelo menos doze animais. \* p < 0,05 quando comparado ao controle. # p < 0,05 na comparação entre DHA e EPA.

#### 5.4 EFEITOS DOS AGS SOBRE A PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO (NO)

A produção de NO por neutrófilos não foi modificada por EPA e DHA (Figura 15). Células estimuladas com LPS tiveram a produção de NO aumentada em 2,2 vezes. Esse efeito não foi modificado pelos AGs (Figura 16).



**Figura 15** - Produção de óxido nítrico por neutrófilos obtidos de ratos ( $2 \times 10^6$  células/mL) após tratamento com várias concentrações de AGs. O controle foi tratado com o mesmo volume de etanol. Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M de pelo menos nove animais.

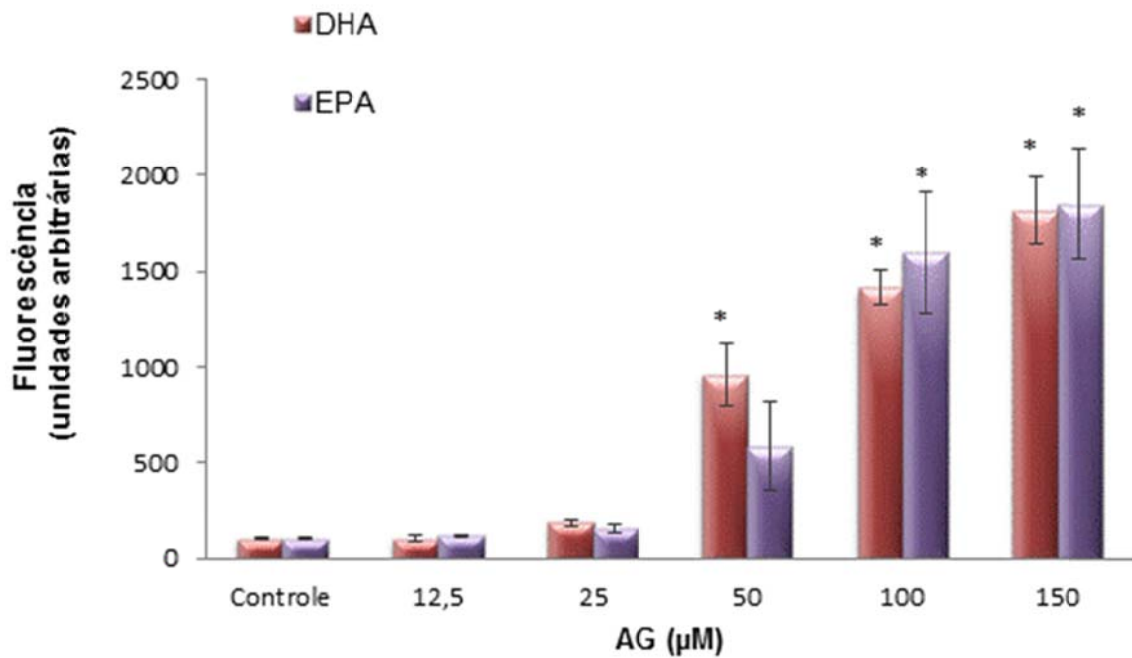


**Figura 16** - Determinação da produção de óxido nítrico por neutrófilos obtidos de ratos ( $2 \times 10^6$  células/mL). A produção de NO foi avaliada em sobrenadante das células incubadas por dezoito horas com várias concentrações de AGs com LPS. O controle foi tratado com o mesmo volume de etanol. Resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M de pelo menos nove animais.

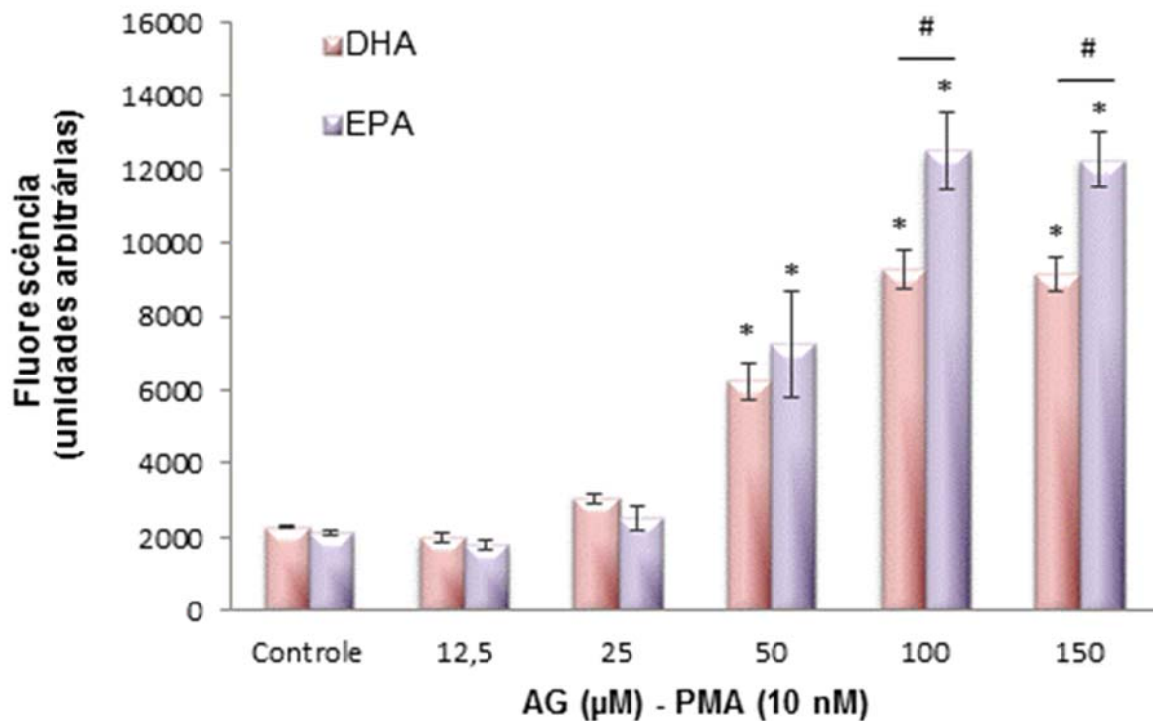
## 5.5 EFEITOS DE EPA E DHA SOBRE A PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS)

### 5.5.1 *Produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*

A produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por neutrófilos foi avaliada durante 60 minutos a 37 °C. Na presença de 50 µM de DHA, houve aumento da produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, enquanto que, para o EPA, isto ocorreu somente a partir de 100 µM (Figura 17). EPA e DHA, a partir de 50 µM, aumentaram a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por neutrófilos estimulados com PMA. Porém, com 100 e 150 µM, o EPA causou maior produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> comparado ao DHA (1,34 vezes em 100 e 150 µM) (Figura 18). No controle, o tratamento com PMA aumentou em 22,9 vezes a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



**Figura 17** -Efeito dos AGs (EPA e DHA) na produção de peróxido de hidrogênio por neutrófilos obtidos de ratos. A produção de  $H_2O_2$  foi avaliada em células incubadas por 60 minutos com várias concentrações de AGs. O controle foi tratado com o mesmo volume de etanol. Resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M de pelo menos quatro animais. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao controle.

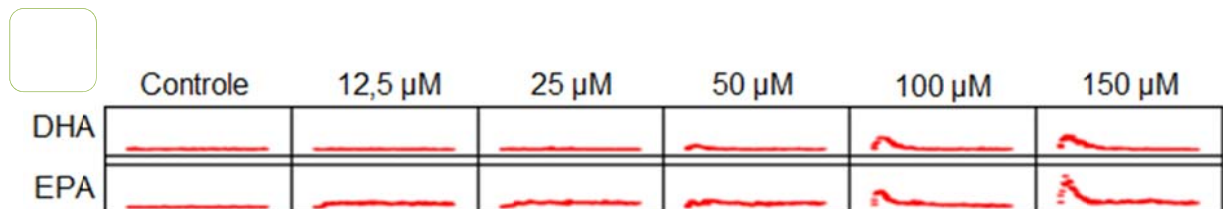


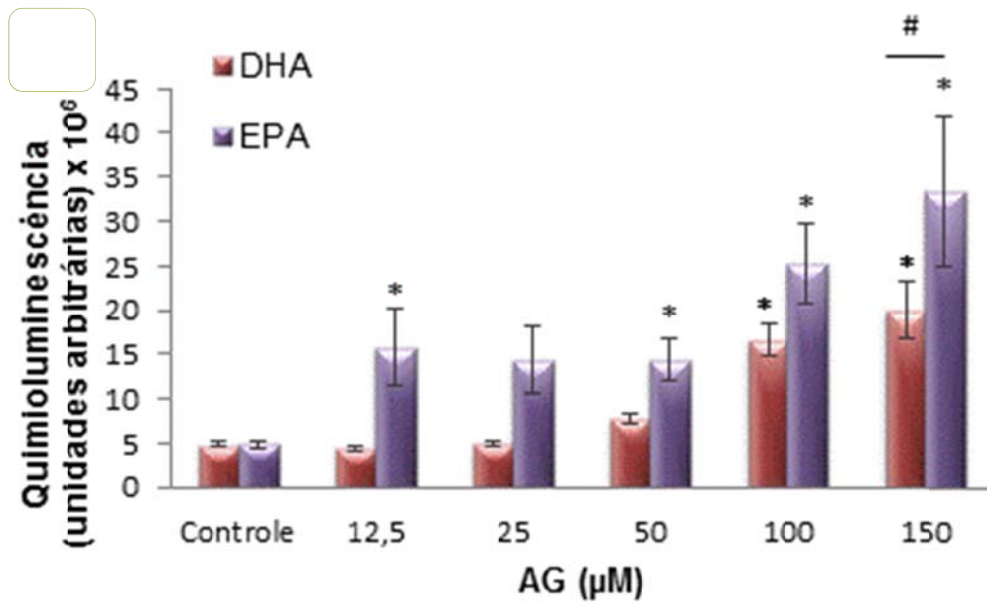
**Figura 18** - Determinação da produção de peróxido de hidrogênio por neutrófilos obtidos de ratos. A produção de  $H_2O_2$  foi avaliada em células incubadas por 60 minutos com várias concentrações de EPA e DHA com PMA. O controle foi tratado com o mesmo volume de etanol. Resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. de pelo menos quatro animais. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao controle e #  $p < 0,05$  na comparação entre grupos na mesma concentração de AG.

## 5.6 PRODUÇÃO DE $O_2^{\bullet-}$

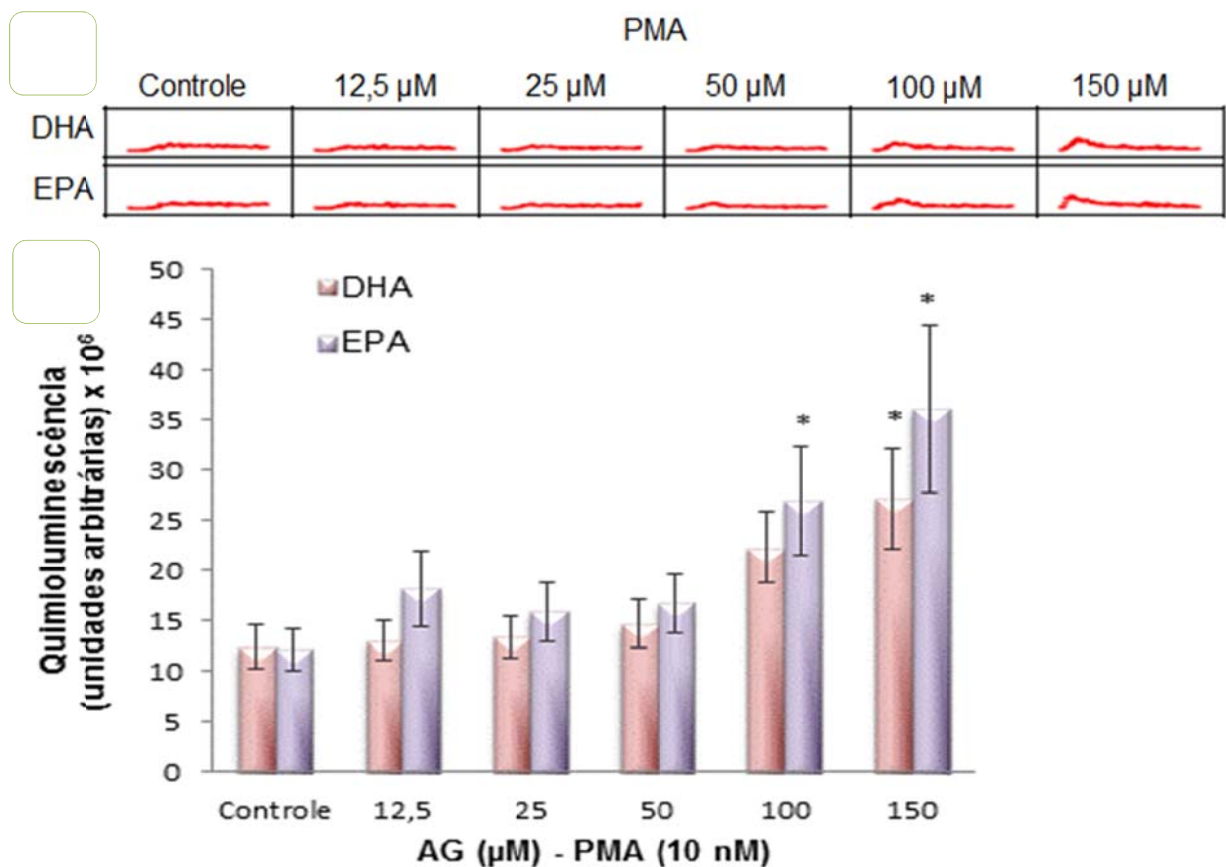
A produção de ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) foi avaliada no período de 60 minutos a 37 °C. PMA e zimosan opsonizado foram usados como controles positivos nesses ensaios. O PMA elevou a produção de  $O_2^{\bullet-}$  em 2,5 vezes e o zimosan em 5,4 vezes em relação aos controles.

O aumento na produção de  $O_2^{\bullet-}$  foi dependente da concentração de DHA, ocorrendo estimulação somente a partir de 100  $\mu$ M, enquanto que com EPA, houve aumento a partir da concentração de 12,5  $\mu$ M. Na concentração de 150  $\mu$ M, a produção de  $O_2^{\bullet-}$  pelos neutrófilos foi menor com DHA do que no tratamento com EPA (Figura 19 B). Na presença do PMA, DHA e EPA em 150 e 100  $\mu$ M aumentaram significativamente a produção de  $O_2^{\bullet-}$  pelos neutrófilos, respectivamente (Figura 20 B). Nas células tratadas com EPA, na presença do zimosan, houve aumento significativo nas concentrações de 50 e 150  $\mu$ M. Contudo, com DHA, não houve alteração em todas as concentrações avaliadas (Figura 21 B).





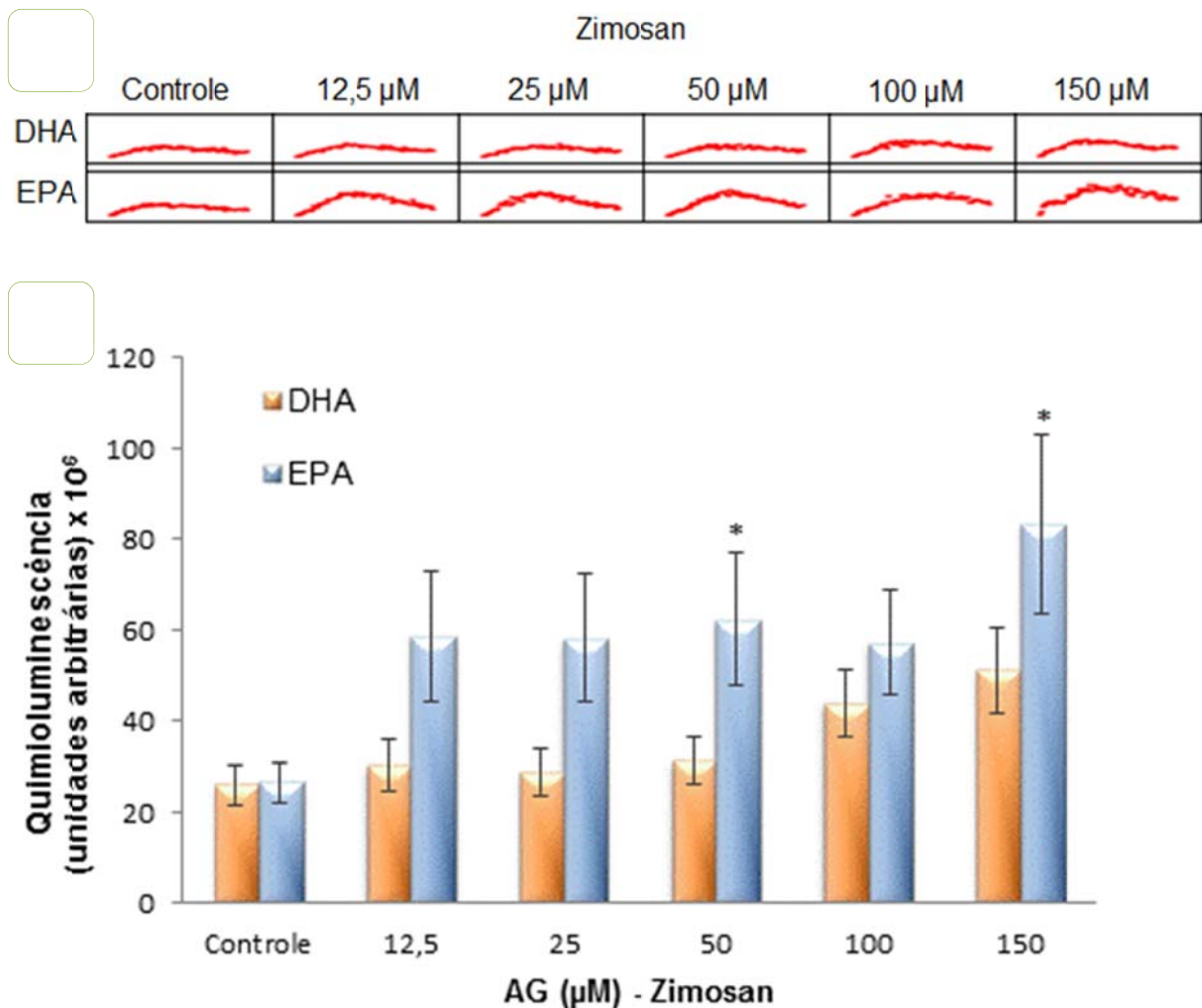
**Figura 19** - Produção de ânion superóxido por neutrófilos obtidos de ratos no período de 60 minutos. A produção de  $O_2^-$  foi avaliada em várias concentrações de DHA e EPA. No controle, foi adicionado o volume máximo de etanol usado para diluir o AG. Figura representativa da produção de superóxido ao longo do tempo (A). Resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. de pelo menos treze animais (B). \*  $p < 0,05$  quando comparado ao controle e #  $p < 0,05$  na comparação entre grupos na mesma concentração de AG.



**Figura 20** - Produção de ânion superóxido por neutrófilos obtidos de ratos no período de 60 minutos. A produção de  $O_2^-$  foi avaliada em várias concentrações de DHA e EPA com estímulo (PMA). No controle, foi adicionado o volume máximo de etanol usado para diluir o AG. Figura representativa da produção de superóxido ao longo do tempo (A). Resultados



estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. de pelo menos treze animais (B). \*  $p < 0,05$  quando comparado ao controle.



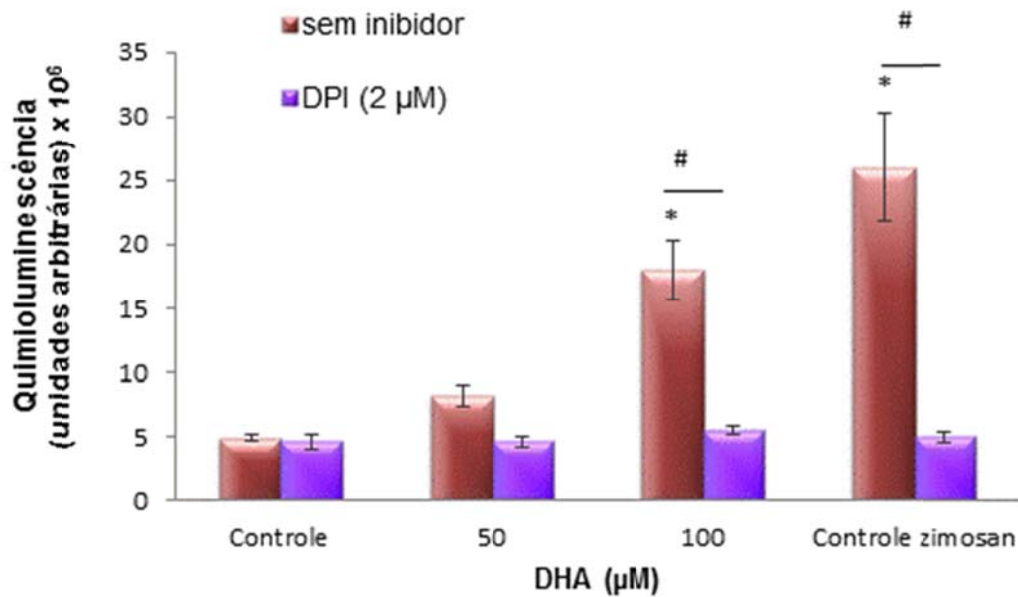
**Figura 21** - Produção de ânion superóxido por neutrófilos obtidos de ratos no período de 60 minutos. A produção de  $O_2^{\bullet-}$  foi avaliada em várias concentrações de DHA e EPA com estímulo (zimosan). No controle, foi adicionado o volume máximo de etanol usado para diluir o AG. Figura representativa da produção de superóxido ao longo do tempo (A). Resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. de pelo menos nove animais (B). \*  $p < 0,05$  quando comparado ao controle.

### 5.6.1 Efeitos dos inibidores da NADPH oxidase e da oxidação dos AG sobre a produção de superóxido

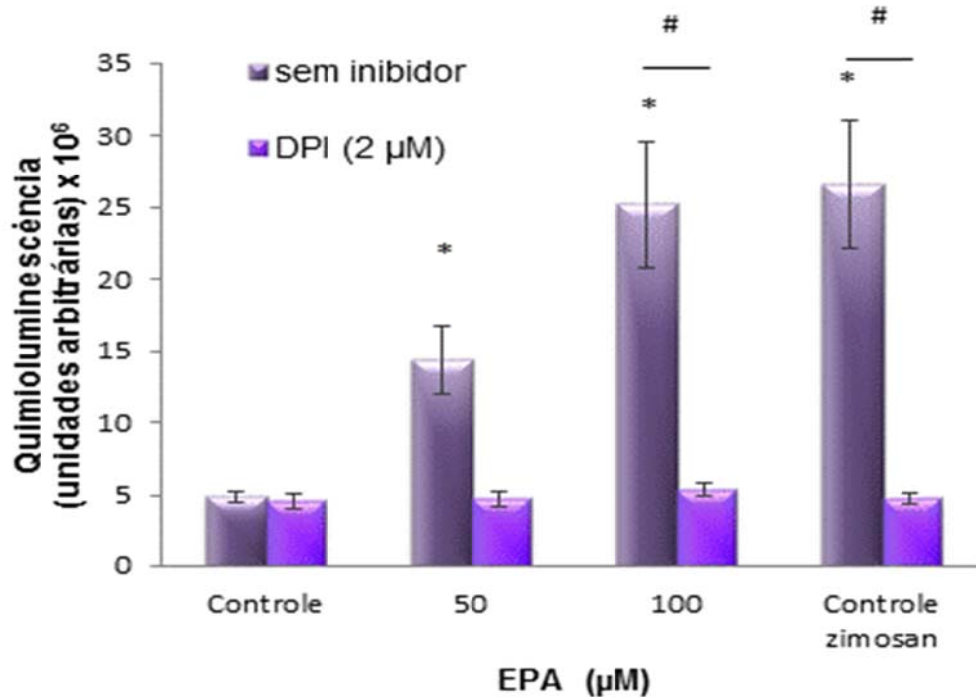
A produção de  $O_2^{\bullet-}$  avaliada na presença do DPI, inibidor da NADPH oxidase, não foi aumentada pelos AGs e zimosan (Figuras 22 e 23). Os neutrófilos incubados com etomoxir não apresentaram diminuição na produção de  $O_2^{\bullet-}$  quando tratados com DHA (Figura 24). O EPA, na presença do etomoxir, causou redução de 49,2% e



55,9%, em 50 e 100  $\mu\text{M}$ , respectivamente, quando comparado ao EPA na ausência do inibidor (Figura 25).

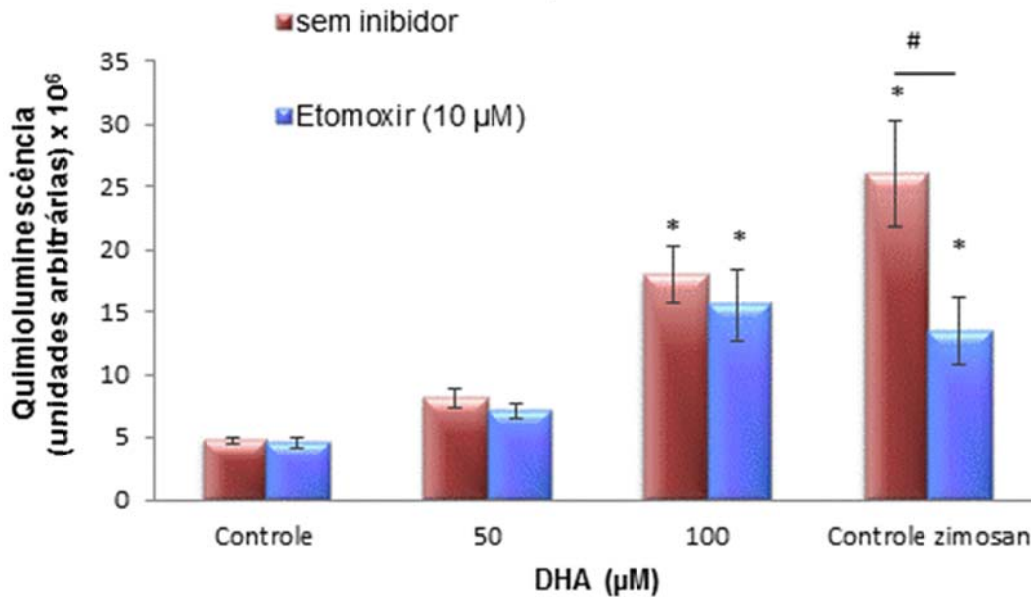


**Figura 22** - Produção de ânion superóxido por neutrófilos obtidos de ratos no período de 60 minutos. A produção de  $\text{O}_2^-$  foi avaliada em várias concentrações de DHA com e sem inibidor (DPI), tendo como controle positivo o zimosan opsonizado. No controle foi adicionado o volume máximo de etanol usado para diluir o AG. Resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. de pelo menos quatro animais. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao controle e #  $p < 0,05$  na comparação entre grupos na mesma concentração de AG.

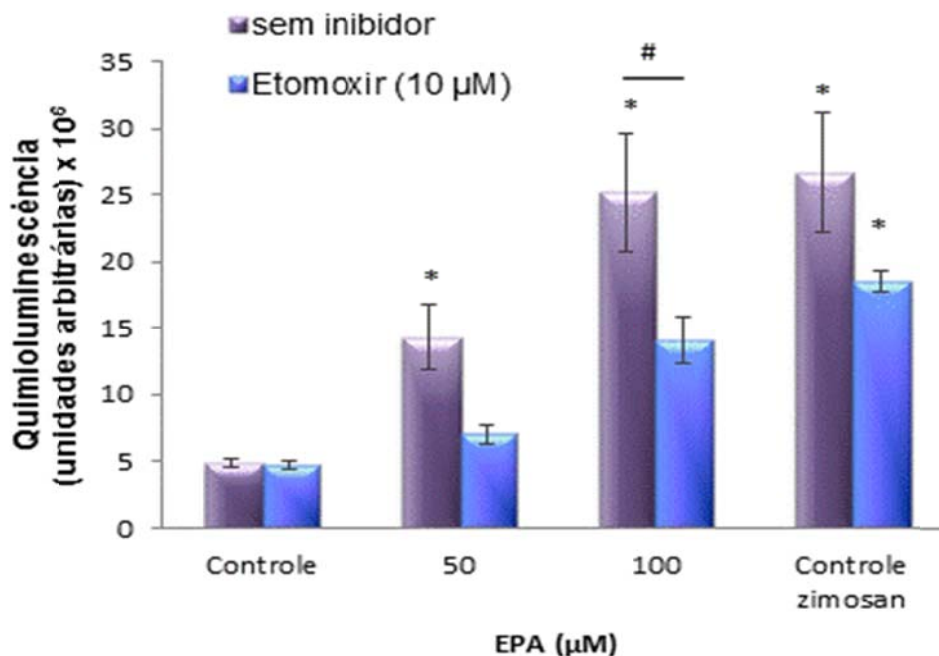


**Figura 23** - Produção de ânion superóxido por neutrófilos obtidos de ratos no período de 60 minutos. A produção de  $\text{O}_2^-$  foi avaliada em várias concentrações de EPA com e sem inibidor (DPI), tendo como controle positivo o zimosan opsonizado. No controle foi adicionado o volume máximo de etanol usado para diluir o AG. Resultados estão expressos como

média  $\pm$  E.P.M. EPA de pelo menos quatro animais. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao controle e #  $p < 0,05$  na comparação entre grupos na mesma concentração de AG.



**Figura 24** - Produção de ânion superóxido por neutrófilos obtidos de ratos no período de 60 minutos. A produção de  $O_2^-$  foi avaliada em várias concentrações de DHA com e sem inibidor (etomoxir), tendo como controle positivo o zimosan. No controle foi adicionado o volume máximo de etanol usado para diluir o AG. Resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. de pelo menos onze animais. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao controle e #  $p < 0,05$  na comparação entre grupos na mesma concentração de AG.

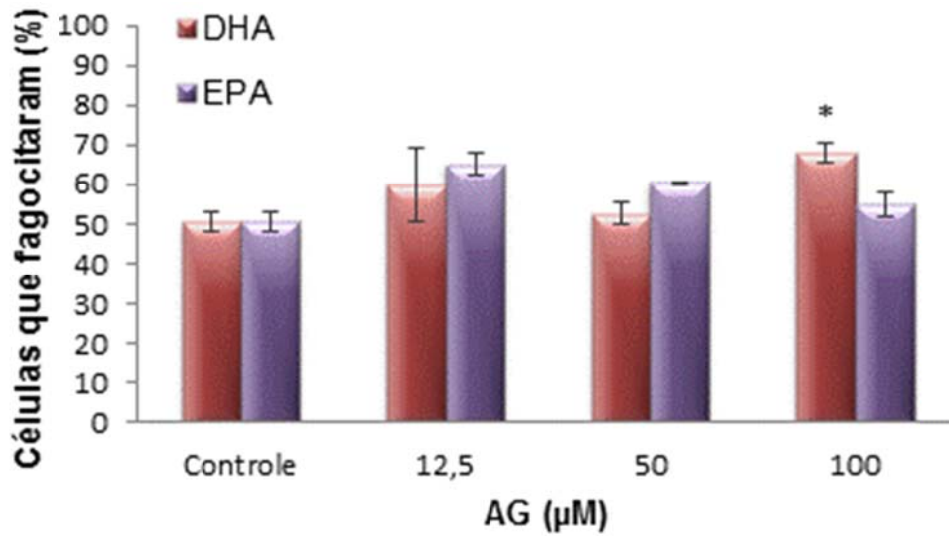


**Figura 25** - Produção de ânion superóxido por neutrófilos obtidos de ratos no período de 60 minutos. A produção de  $O_2^-$  foi avaliada em várias concentrações de EPA com e sem inibidor (etomoxir), tendo como controle positivo o zimosan. No controle foi adicionado o volume máximo de etanol usado para diluir o AG. Resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. de pelo menos onze animais. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao controle e #  $p < 0,05$  na comparação entre grupos na mesma concentração de AG.

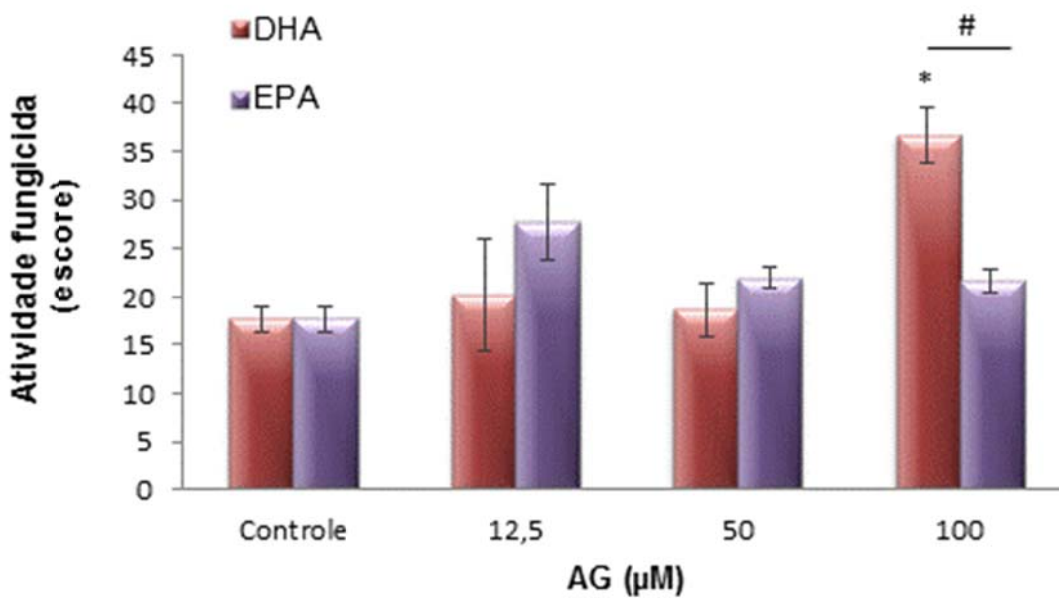
## 5.7 EFEITOS DE EPA E DHA NA FAGOCITOSE E ATIVIDADE FUNGICIDA

A fagocitose e a atividade fungicida dos neutrófilos foram avaliadas no período de 40 minutos, em que as células foram expostas à *Candida albicans* e etanol ou AG. O tratamento com o DHA aumentou a capacidade fagocítica em 35% para a concentração de 100  $\mu\text{M}$ . O EPA não alterou a fagocitose dos neutrófilos (Figura 26).

Com relação à atividade fungicida dos neutrófilos em 40 minutos, o DHA aumentou esta atividade na concentração de 100  $\mu\text{M}$ , enquanto que o EPA não a alterou (Figura 27).



**Figura 26** - Porcentagem de neutrófilos obtidos de ratos que fagocitaram *Candida albicans* no período de 40 minutos incubados com DHA e EPA. No controle, foi adicionado o volume máximo de etanol usado para diluir o AG. Resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. de três animais. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao controle.



**Figura 27** - Escore da atividade fungicida dos neutrófilos obtidos de ratos e incubados com DHA e EPA no período de 40 minutos. No controle, foi adicionado o volume máximo de etanol usado para diluir o AG. Resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. de três animais. \*  $p < 0,05$  quando comparado ao controle e #  $p < 0,05$  na comparação entre grupos na mesma concentração de AG.

**Quadro 3** - Resumo dos efeitos de EPA e DHA em neutrófilos observados nesse estudo.

Efeitos		DHA ( $\mu\text{M}$ )	EPA ( $\mu\text{M}$ )
Toxicidade (18h)	Viabilidade celular sem estímulo	↓ 75	↓ 150
	Fragmentação de DNA sem estímulo	↓ 50	↓ 100
	Viabilidade celular com LPS	↓ 100	↓ 100
	Fragmentação de DNA com LPS	↓ 100	↓ 100
CINC-2	Sem estímulo	Não alterou	↑ 25
	Com LPS	Não alterou	↑ 25
TNF- $\alpha$	Sem estímulo	↑ 25 e ↓ 50	↑ 25
	Com LPS	Não alterou	Não alterou
IL-1 $\beta$	Sem estímulo	Não alterou	Não alterou
	Com LPS	Não alterou	↑ 50
Nitrito (18h)	Sem estímulo	Não alterou	Não alterou
	Com LPS	Não alterou	Não alterou
Peróxido de hidrogênio (AMPLEX)	Sem estímulo	↑ 50	↑ 100
	Com PMA	↑ 50	↑ 50
Ânion superóxido (lucigenina)	Sem estímulo	↑ 100	↑ 12,5
	Com PMA	↑ 150	↑ 100
	Com Zimosan	Não alterou	↑ 50
Fagocitose	40 minutos	↑ 100	Não alterou
Atividade fungicida	40 minutos	↑ 100	Não alterou

## 6 DISCUSSÃO

Neste trabalho comparamos os efeitos de EPA e DHA sobre a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), óxido nítrico (NO), TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e CINC-2, fagocitose e atividade fungicida por neutrófilos de rato.

Inicialmente foram determinadas as concentrações não tóxicas de AGs para essas células. DHA mostrou-se mais tóxico (18 horas) que o EPA tanto na análise de integridade de membrana quanto fragmentação do DNA (75  $\mu$ M e 150  $\mu$ M; 50  $\mu$ M e 100  $\mu$ M, respectivamente). Na presença de LPS, o DHA foi também mais tóxico que o EPA (células com a membrana íntegra e o DNA fragmentado). O LPS não foi tóxico para as células (Figuras 7 e 8).

Neutrófilos estimulados com LPS e citocinas pró-inflamatórias, tais como interferon- $\gamma$  (IFN-  $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (133, 134), produzem grandes quantidades de NO através da isoforma induzível da óxido nítrico sintase (iNOS) (135, 136). Atuando nas integrinas, o NO modifica a adesão de leucócitos e a diapedese dos neutrófilos (137). O óxido nítrico, assim como as espécies reativas de oxigênio, desempenha função importante na modulação da inflamação e na regulação da resposta imune (138).

Em células J774 incubadas com EPA e DHA por 48 horas nas concentrações de 10 e 25  $\mu$ M, foi descrito aumento na produção de NO, mas com 50 e 100  $\mu$ M ocorreu inibição (117). Komatsu et al. (2003) demonstraram que o DHA inibe a produção de NO e a expressão de iNOS em células RAW264 e macrófagos peritoneais tratados com 15, 30 e 60  $\mu$ M por 24 horas (69). No presente estudo, não houve alteração na produção de óxido nítrico em neutrófilos incubados com EPA e DHA por 18 horas, estimulados ou não com LPS (Figuras 15 e 16). Possivelmente, os resultados conflitantes são devido às células estudadas ou aos diferentes períodos de tratamento com os ácidos graxos.

Com relação à produção de citocinas, EPA e DHA inibem a produção de IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  por monócitos *ex vivo* (26, 48-50) e a produção de IL-6 e IL-8 por células endoteliais vasculares (22, 23). A ingestão de óleo de peixe diminui a produção *in vivo* de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 por macrófagos de roedores (27, 28, 139). Neste estudo, não houve diferença quanto à produção de IL-1 $\beta$  nas concentrações de EPA e DHA estudadas (Figura 13). Contudo, na presença do LPS, o DHA elevou a produção de IL-1 $\beta$  pelos neutrófilos diferentemente do EPA que não causou alteração (Figura 14).

Com relação ao TNF- $\alpha$ , observou-se aumento na concentração de 25  $\mu$ M de ambos os AGs, porém, com 50  $\mu$ M, o DHA reduziu sua produção enquanto o EPA a manteve elevada (Figura 11). Nos neutrófilos tratados com EPA, com e sem LPS, houve aumento de CINC-2 (quimiocina importante em ratos), já com DHA, não houve alteração (Figura 9 e 10). Esses resultados são indicativos de efeito ativador dessas células por ambos EPA e DHA. O EPA elevou a produção de CINC-2 (na presença ou ausência de LPS) e ambos AGs aumentaram a produção de TNF- $\alpha$  pelos neutrófilos.

No presente trabalho, EPA e o DHA aumentaram a produção de EROs por neutrófilos. O que diferiu entre eles foi à concentração necessária para elevar esta produção. Verificamos que, na presença de 50  $\mu$ M de DHA, houve aumento na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelos neutrófilos, enquanto que no caso do EPA isto ocorreu somente a partir de 100  $\mu$ M (Figura 17). Sob estímulo do PMA, o aumento na produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi observado para EPA e DHA a partir de 50  $\mu$ M. Entretanto, na presença do PMA, o EPA a 100 e 150  $\mu$ M estimulou ainda mais a produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quando comparado ao DHA (Figura 18).

Com relação à produção de O<sub>2</sub><sup>-</sup> pelos neutrófilos, o DHA apresentou efeito estimulatório a partir de 100  $\mu$ M, enquanto que com EPA houve aumento a partir da concentração de 12,5  $\mu$ M. A produção de O<sub>2</sub><sup>-</sup> foi menor (40%) com DHA na concentração de 150  $\mu$ M do que no tratamento com EPA (Figura 19). Na presença do PMA, DHA e EPA aumentaram a produção de O<sub>2</sub><sup>-</sup> pelos neutrófilos, DHA em 150  $\mu$ M e EPA a partir de 100  $\mu$ M (Figura 20). Nas células tratadas com EPA, na presença de partículas de zimosan, houve aumento significativo da produção de EROs. Contudo, na presença de DHA, não houve alteração na produção de EROs estimulada por zimosan nas concentrações estudadas. Outros autores quantificaram a produção de EROs pelo método de citocromo c e quimiluminescência dependente de lucigenina e verificaram aumento dose dependente após tratamento dos neutrófilos humanos com EPA e DHA (140).

Em discordância com esses resultados, Pisani et al. (2009) avaliaram, em neutrófilos de cabra, a produção de EROs pelo método de citocromo c. As células foram tratadas com EPA e DHA nas concentrações de 25, 50, 100 e 200  $\mu$ M e analisadas durante 30, 60, 90 e 120 minutos. O EPA não alterou a produção de EROs nas condições estudadas. Por outro lado, o DHA, em 30 minutos, diminuiu a

produção de EROs em todas as concentrações. Na presença de PMA, os neutrófilos tratados com EPA apresentaram, em 90 minutos de incubação, diminuição da produção de EROs apenas na concentração de 200  $\mu\text{M}$ . Já com DHA, esta diminuição ocorreu nas concentrações de 25, 50 100 e 200  $\mu\text{M}$  (71). A discrepância entre os resultados por nós relatados e os descritos por Pisani et al. (2009) pode ser decorrente da utilização de métodos diferentes de quantificação de EROs ou ao estado de ativação das células. Vale ressaltar que no trabalho de Pisani et al. (2009), utilizou-se a técnica do citocromo c para análise de EROs. Essa técnica, conforme previamente descrito pelo nosso grupo, não é adequada para analisar o efeito de AGs sobre a produção de EROs por neutrófilos. Os AGs agem diretamente no citocromo c e sem a presença de neutrófilos, foi encontrado aumento na absorvância. Além disso, o  $\text{H}_2\text{O}_2$  produzido pode resultar em uma redução do  $\text{Fe}^{2+}$  citocromo c que volta para a forma  $\text{Fe}^{3+}$  gerando resultados subestimados (123).

Quando os neutrófilos são ativados por estímulos como partículas de zimosan opsonizadas, peptídeos formilados (fMLP, por exemplo) ou PMA, há translocação dos componentes citossólicos ( $\text{p47}^{\text{phox}}$ ,  $\text{p67}^{\text{phox}}$ ,  $\text{p40}^{\text{phox}}$ ) da NADPH oxidase para a membrana celular. Este complexo enzimático agora ativado leva à produção de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  (141). Um inibidor da produção de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  é o DPI (*diphenyliodonium*) que, apesar de ser amplamente utilizado como inibidor da NAPH oxidase, não é seletivo para esta enzima, atuando como um oxidante flavina inespecífico (142). O tratamento com DPI inibiu completamente a produção de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  induzida por AGs e zimosan opsonizado (Figuras 22 e 23). Esses dados são indicativos de que os AGs ora estudados aumentam a produção de EROs por esta via.

O etomoxir inibe irreversivelmente a CPT-1 (carnitina palmitoil transferase - 1) impedindo assim a entrada de AGs na matriz mitocondrial (32). A produção de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  por células musculares esqueléticas de ratos é reduzida na presença de etomoxir após estímulo do ácido palmítico (125). Em neutrófilos incubados com etomoxir, houve inibição na produção de  $\text{O}_2^{\bullet-}$  nas concentrações estudadas de EPA (Figura 26). Diferentemente, o etomoxir não inibiu a produção de EROs induzida pelo DHA (Figura 25). De acordo com os resultados obtidos, a produção de EROs induzida pelos AGs nos neutrófilos ocorre via NADPH oxidase e pode, ao menos para o EPA, envolver a oxidação do AG.

Em experimentos realizados *in vivo* e *ex vivo* foi evidenciado que EPA e DHA



influenciam as funções de neutrófilos humanos, incluindo a fagocitose (143). A fagocitose é um processo rápido que envolve a fixação e internalização da partícula fagocítica. É promovida através de receptores do complemento e imunoglobulinas. (144, 145).

Verificamos que o tratamento com o DHA por 40 minutos aumenta a fagocitose de *Candida albicans* em 35% (100  $\mu$ M) e, apesar do tratamento com EPA ter aumentado 29% (12,5  $\mu$ M), não foi significativo (Figura 26). Resultado semelhante foi encontrado por Calder et al. (1990) em que DHA (33  $\mu$ M) e EPA (33  $\mu$ M) aumentaram a fagocitose em macrófagos por 35% e 26%, respectivamente, no período de tratamento por 2 horas com zimosan opsonizado (12 partículas por célula) (146). Quando monócitos e neutrófilos caprinos foram expostos ao DHA, a atividade de fagocitose foi maior em 25% apenas na concentração de 100  $\mu$ M (70, 71).

A fluidez da membrana celular é importante para a atividade fagocítica (70). Por sua vez, a fluidez da membrana é fortemente influenciada pela composição de ácidos graxos dos fosfolipídeos de membrana (81). A alteração da composição de ácidos graxos em macrófagos murinos por diferentes ácidos graxos altera a atividade fagocítica. As células com maior conteúdo de ácidos graxos insaturados em sua membrana possuem maior atividade fagocítica do que aqueles com maior conteúdo de ácidos graxos saturados (82, 146-148). Dessa forma, o DHA apresentou efeito mais pronunciado na atividade fagocítica que o EPA possivelmente por ser mais insaturado. Com relação à atividade fungicida dos neutrófilos, o DHA aumentou esta atividade, enquanto que o EPA não a alterou significativamente (Figura 28).

Os PUFAs  $\omega$ -3 modificam a atividade de PPAR  $\gamma$  (43). Os neutrófilos expressam receptores PPAR do isotipo  $\gamma$  (149-151), um fator de transcrição nuclear envolvido na regulação das respostas imune e inflamatória (152).

PPAR  $\gamma$  (153), interage fisicamente com as subunidades p65 e p50 do NF- $\kappa$ B inibindo sua ativação (154). O PPAR  $\gamma$  inibe a atividade transcricional do NF- $\kappa$ B, reduzindo sua ligação ao DNA (155). Os PUFAs ômega-3 e seus metabólitos são ligantes naturais de PPAR  $\gamma$  (156).

EPA e DHA modifica a produção de citocinas diferentemente, EPA aumentou as citocinas estudadas (CINC-2, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ), contudo, DHA aumentou somente TNF- $\alpha$ . Estes AGs podem ter atuado sobre o PPAR  $\gamma$  por mecanismos diferentes e,

dependendo da concentração administrada, EPA pode diretamente, ou após ser metabolizado, inativar a sinalização de PPAR  $\gamma$  (156, 157). Com a inativação de PPAR $\gamma$  pelo EPA, ocorre a ativação do NF- $\kappa$ B que induz ação pró-inflamatória. DHA ativa PPAR  $\gamma$  (54) que, por sua vez, inativa NF- $\kappa$ B desempenhando ação anti-inflamatória. Esse tema deve ser agora estudado sistematicamente para esclarecer os mecanismos moleculares envolvidos nos efeitos diferentes de EPA e DHA.

## 7 CONCLUSÃO

EPA e DHA modularam diversos aspectos da função de neutrófilos de rato. Estes AGs apresentaram ações distintas na produção de citocinas, fagocitose e atividade fungicida pelos neutrófilos. Já na produção das EROS, o EPA e o DHA apresentaram ações semelhantes, embora em concentrações diferentes. Essas diferenças observadas podem ser explicadas pelo fato de que o EPA e o DHA alteram a composição de ácidos graxos de fosfolípidios da célula diferentemente e podem mudar a afinidade de receptores ao ligante que geram as moléculas de sinalização. Esses resultados contribuem para a elucidação de como EPA e DHA agem na função de neutrófilos e resposta inflamatória.

## REFERÊNCIAS<sup>1</sup>

1. Burdge GC, Finnegan YE, Minihane AM, Williams CM, Wootton SA. Effect of altered dietary n-3 fatty acid intake upon plasma lipid fatty acid composition, conversion of [<sup>13</sup>C]alpha-linolenic acid to longer-chain fatty acids and partitioning towards beta-oxidation in older men. *Br J Nutr.* 2003 Aug;90(2):311-21.
2. Calder PC. Dietary modification of inflammation with lipids. *Proc Nutr Soc.* 2002 Aug;61(3):345-58.
3. Devlin TM. *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations.* 4th ed: John Wiley & Sons; New York, 1997. p. 450.
4. Kromann N, Green A. Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. Incidence of some chronic diseases 1950-1974. *Acta Med Scand.* 1980;208(5):401-6.
5. Calder PC. omega 3 polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *World Rev Nutr Diet.* 2001;88:109-16.
6. Calder PC. n-3 polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. *Am J Clin Nutr.* 2006 Jun;83(6 Suppl):1505S-19S.
7. Kremer JM. Clinical studies of omega-3 fatty acid supplementation in patients who have rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* 1991 May;17(2):391-402.
8. Chandrasekar B, Fernandes G. Decreased pro-inflammatory cytokines and increased antioxidant enzyme gene expression by omega-3 lipids in murine lupus nephritis. *Biochem Biophys Res Commun.* 1994 Apr 29;200(2):893-8.
9. Calder PC. Dietary fatty acids and lymphocyte functions. *Proc Nutr Soc.* 1998 Nov;57(4):487-502.
10. Calder PC. Immunoregulatory and anti-inflammatory effects of n-3 polyunsaturated fatty acids. *Braz J Med Biol Res.* 1998 Apr;31(4):467-90.

---

<sup>1</sup> De acordo com: International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. Available from: <http://www.icmje.org> [2007 May 22].

11. Mori TA, Beilin LJ. Omega-3 fatty acids and inflammation. *Curr Atheroscler Rep.* 2004 Nov;6(6):461-7.
12. Rudkowska I. Fish oils for cardiovascular disease: Impact on diabetes. *Maturitas.* 2010 May 19 In Press.
13. Wang C, Harris WS, Chung M, Lichtenstein AH, Balk EM, Kupelnick B, et al. n-3 Fatty acids from fish or fish-oil supplements, but not alpha-linolenic acid, benefit cardiovascular disease outcomes in primary- and secondary-prevention studies: a systematic review. *Am J Clin Nutr.* 2006 Jul;84(1):5-17.
14. Kris-Etherton PM, Harris WS, Appel LJ. Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease. *Circulation.* 2002 Nov 19;106(21):2747-57.
15. Calder PC, Grimble RF. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *Eur J Clin Nutr.* 2002 Aug;(56 Suppl 3):S14-9.
16. Fan YY, McMurray DN, Ly LH, Chapkin RS. Dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids remodel mouse T-cell lipid rafts. *J Nutr.* 2003 Jun;133(6):1913-20.
17. Madani S, Hichami A, Legrand A, Belleville J, Khan NA. Implication of acyl chain of diacylglycerols in activation of different isoforms of protein kinase C. *FASEB J.* 2001 Dec;15(14):2595-601.
18. Nair SS, Leitch JW, Falconer J, Garg ML. Prevention of cardiac arrhythmia by dietary (n-3) polyunsaturated fatty acids and their mechanism of action. *The Journal of nutrition.* 1997 Mar;127(3):383-93.
19. Campos ACL. Metabolic changes and nutritional support in ill hypermetabolic. *Journal of Intensive care Medicine.* 1996;1:21-31.
20. Serhan CN, Savill J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat Immunol.* 2005 Dec;6(12):1191-7.
21. Babcock TA, Novak T, Ong E, Jho DH, Helton WS, Espat NJ. Modulation of Lipopolysaccharide-Stimulated Macrophage Tumor Necrosis Factor-[alpha] Production by [omega]-3 Fatty Acid Is Associated with Differential Cyclooxygenase-2 Protein Expression and Is Independent of Interleukin-10. *Journal of Surgical Research.* 2002;107(1):135-9.
22. De Caterina R, Cybulsky MI, Clinton SK, Gimbrone MA, Jr., Libby P. The omega-3 fatty acid docosahexaenoate reduces cytokine-induced expression of

proatherogenic and proinflammatory proteins in human endothelial cells. *Arterioscler Thromb.* 1994 Nov;14(11):1829-36.

23. Khalfoun B, Thibault F, Watier H, Bardos P, Lebranchu Y. Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids inhibit in vitro human endothelial cell production of interleukin-6. *Adv Exp Med Biol.* 1997;400B:589-97.

24. Caughey GE, Mantzioris E, Gibson RA, Cleland LG, James MJ. The effect on human tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 beta production of diets enriched in n-3 fatty acids from vegetable oil or fish oil. *Am J Clin Nutr.* 1996 Jan;63(1):116-22.

25. Kelley DS, Taylor PC, Nelson GJ, Schmidt PC, Ferretti A, Erickson KL, et al. Docosahexaenoic acid ingestion inhibits natural killer cell activity and production of inflammatory mediators in young healthy men. *Lipids.* 1999 Apr;34(4):317-24.

26. Babcock TA, Novak T, Ong E, Jho DH, Helton WS, Espat NJ. Modulation of lipopolysaccharide-stimulated macrophage tumor necrosis factor-alpha production by omega-3 fatty acid is associated with differential cyclooxygenase-2 protein expression and is independent of interleukin-10. *J Surg Res.* 2002 Sep;107(1):135-9.

27. Billiar TR, Bankey PE, Svingen BA, Curran RD, West MA, Holman RT, et al. Fatty acid intake and Kupffer cell function: fish oil alters eicosanoid and monokine production to endotoxin stimulation. *Surgery.* 1988 Aug;104(2):343-9.

28. Yaqoob P, Calder P. Effects of dietary lipid manipulation upon inflammatory mediator production by murine macrophages. *Cell Immunol.* 1995 Jun;163(1):120-8.

29. Endres S, Ghorbani R, Kelley VE, Georgilis K, Lonnemann G, van der Meer JW, et al. The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. *N Engl J Med.* 1989 Feb 2;320(5):265-71.

30. Meydani SN, Endres S, Woods MM, Goldin BR, Soo C, Morrill-Labrode A, et al. Oral (n-3) fatty acid supplementation suppresses cytokine production and lymphocyte proliferation: comparison between young and older women. *J Nutr.* 1991 Apr;121(4):547-55.

31. Abbate R, Gori AM, Martini F, Brunelli T, Filippini M, Francalanci I, et al. n-3 PUFA supplementation, monocyte PCA expression and interleukin-6 production. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.* 1996;54(6):439-44.

32. Trebble T, Arden NK, Stroud MA, Wootton SA, Burdge GC, Miles EA, et al. Inhibition of tumour necrosis factor-alpha and interleukin 6 production by mononuclear cells following dietary fish-oil supplementation in healthy men and response to antioxidant co-supplementation. *Br J Nutr.* 2003 Aug;90(2):405-12.
33. Thies F, Miles EA, Nebe-von-Caron G, Powell JR, Hurst TL, Newsholme EA, et al. Influence of dietary supplementation with long-chain n-3 or n-6 polyunsaturated fatty acids on blood inflammatory cell populations and functions and on plasma soluble adhesion molecules in healthy adults. *Lipids.* 2001 Nov;36(11):1183-93.
34. Schmidt EB, Varming K, Moller JM, Bulow Pedersen I, Madsen P, Dyerberg J. No effect of a very low dose of n-3 fatty acids on monocyte function in healthy humans. *Scand J Clin Lab Invest.* 1996 Feb;56(1):87-92.
35. Kew S, Mesa MD, Tricon S, Buckley R, Minihane AM, Yaqoob P. Effects of oils rich in eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on immune cell composition and function in healthy humans. *Am J Clin Nutr.* 2004 Apr;79(4):674-81.
36. Cooper AL, Gibbons L, Horan MA, Little RA, Rothwell NJ. Effect of dietary fish oil supplementation on fever and cytokine production in human volunteers. *Clin Nutr.* 1993 Dec;12(6):321-8.
37. Wallace FA, Miles EA, Calder PC. Comparison of the effects of linseed oil and different doses of fish oil on mononuclear cell function in healthy human subjects. *Br J Nutr.* 2003 May;89(5):679-89.
38. Yaqoob P, Pala HS, Cortina-Borja M, Newsholme EA, Calder PC. Encapsulated fish oil enriched in alpha-tocopherol alters plasma phospholipid and mononuclear cell fatty acid compositions but not mononuclear cell functions. *Eur J Clin Invest.* 2000 Mar;30(3):260-74.
39. Miles EA, Banerjee T, Dooper MM, M'Rabet L, Graus YM, Calder PC. The influence of different combinations of gamma-linolenic acid, stearidonic acid and EPA on immune function in healthy young male subjects. *Br J Nutr.* 2004 Jun;91(6):893-903.
40. Blok WL, Deslypere JP, Demacker PN, van der Ven-Jongekrijg J, Hectors MP, van der Meer JW, et al. Pro- and anti-inflammatory cytokines in healthy volunteers fed various doses of fish oil for 1 year. *Eur J Clin Invest.* 1997 Dec;27(12):1003-8.
41. Cannon JG, Fiatarone MA, Meydani M, Gong J, Scott L, Blumberg JB, et al. Aging and dietary modulation of elastase and interleukin-1 beta secretion. *Am J Physiol.* 1995 Jan;268(1 Pt 2):R208-13.

42. Molvig J, Pociot F, Worsaae H, Wogensen LD, Baek L, Christensen P, et al. Dietary supplementation with omega-3-polyunsaturated fatty acids decreases mononuclear cell proliferation and interleukin-1 beta content but not monokine secretion in healthy and insulin-dependent diabetic individuals. *Scand J Immunol.* 1991 Oct;34(4):399-410.
43. Calder PC. Polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: new twists in an old tale. *Biochimie.* 2009 Feb 3;91(6):791-5.
44. Ben-Neriah Y. Regulatory functions of ubiquitination in the immune system. *Nat Immunol.* 2002 Jan;3(1):20-6.
45. Wilkinson KD. Signal transduction: aspirin, ubiquitin and cancer. *Nature.* [Comment News]. 2003 Aug 14;424(6950):738-9.
46. Kumar A, Takada Y, Boriek AM, Aggarwal BB. Nuclear factor-kappaB: its role in health and disease. *J Mol Med.* 2004 Jul;82(7):434-48.
47. Perkins ND. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Jan;8(1):49-62.
48. Lo CJ, Chiu KC, Fu M, Lo R, Helton S. Fish oil decreases macrophage tumor necrosis factor gene transcription by altering the NF kappa B activity. *J Surg Res.* 1999 Apr;82(2):216-21.
49. Zhao Y, Joshi-Barve S, Barve S, Chen LH. Eicosapentaenoic acid prevents LPS-induced TNF-alpha expression by preventing NF-kappaB activation. *J Am Coll Nutr.* 2004 Feb;23(1):71-8.
50. Novak TE, Babcock TA, Jho DH, Helton WS, Espat NJ. NF-kappa B inhibition by omega -3 fatty acids modulates LPS-stimulated macrophage TNF-alpha transcription. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2003 Jan;284(1):L84-9.
51. Chinetti G, Fruchart JC, Staels B. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation. *Inflamm Res.* 2000 Oct;49(10):497-505.
52. Belfiore A, Genua M, Malaguarnera R. PPAR-gamma Agonists and Their Effects on IGF-I Receptor Signaling: Implications for Cancer. *PPAR Res.* 2009;2009:830501.



53. Kersten S, Desvergne B, Wahli W. Roles of PPARs in health and disease. *Nature*. 2000 May 25;405(6785):421-4.
54. Lee CH, Olson P, Evans RM. Minireview: lipid metabolism, metabolic diseases, and peroxisome proliferator-activated receptors. *Endocrinology*. 2003 Jun;144(6):2201-7.
55. Feige JN, Gelman L, Michalik L, Desvergne B, Wahli W. From molecular action to physiological outputs: peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Prog Lipid Res*. 2006 Mar;45(2):120-59.
56. Michalik L, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome-proliferator-activated receptors and cancers: complex stories. *Nat Rev Cancer*. 2004 Jan;4(1):61-70.
57. Yki-Jarvinen H. Thiazolidinediones. *The New England journal of medicine*. [Review]. 2004 Sep 9;351(11):1106-18.
58. Lemberger T, Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: a nuclear receptor signaling pathway in lipid physiology. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 1996;12:335-63.
59. Cuzzocrea S, Mazzon E, Di Paola R, Peli A, Bonato A, Britti D, et al. The role of the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha (PPAR-alpha) in the regulation of acute inflammation. *J Leukoc Biol*. 2006 May;79(5):999-1010.
60. Cunard R, Ricote M, DiCampli D, Archer DC, Kahn DA, Glass CK, et al. Regulation of cytokine expression by ligands of peroxisome proliferator activated receptors. *Journal of immunology*. 2002 Mar 15;168(6):2795-802.
61. Marx N, Kehrle B, Kohlhammer K, Grub M, Koenig W, Hombach V, et al. PPAR activators as antiinflammatory mediators in human T lymphocytes: implications for atherosclerosis and transplantation-associated arteriosclerosis. *Circ Res*. 2002 Apr 5;90(6):703-10.
62. Rigamonti E, Chinetti-Gbaguidi G, Staels B. Regulation of macrophage functions by PPAR-alpha, PPAR-gamma, and LXRs in mice and men. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*. 2008 Jun;28(6):1050-9.
63. Jiang C, Ting AT, Seed B. PPAR-gamma agonists inhibit production of monocyte inflammatory cytokines. *Nature*. 1998 Jan 1;391(6662):82-6.

64. Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature*. 1998 Jan 1;391(6662):79-82.
65. Peterson LD, Jeffery NM, Thies F, Sanderson P, Newsholme EA, Calder PC. Eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids alter rat spleen leukocyte fatty acid composition and prostaglandin E2 production but have different effects on lymphocyte functions and cell-mediated immunity. *Lipids*. 1998 Feb;33(2):171-80.
66. Phang M, Garg ML, Sinclair AJ. Inhibition of platelet aggregation by omega-3 polyunsaturated fatty acids is gender specific-Redefining platelet response to fish oils. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 2009 Jul;81(1):35-40.
67. Hashimoto M, Hossain S, Yamasaki H, Yazawa K, Masumura S. Effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on plasma membrane fluidity of aortic endothelial cells. *Lipids*. 1999 Dec;34(12):1297-304.
68. Verlengia R, Gorjao R, Kanunfre CC, Bordin S, Martins De Lima T, Martins EF, et al. Comparative effects of eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on proliferation, cytokine production, and pleiotropic gene expression in Jurkat cells. *J Nutr Biochem*. 2004 Nov;15(11):657-65.
69. Komatsu W, Ishihara K, Murata M, Saito H, Shinohara K. Docosahexaenoic acid suppresses nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in interferon-gamma plus lipopolysaccharide-stimulated murine macrophages by inhibiting the oxidative stress. *Free Radic Biol Med*. 2003 Apr 15;34(8):1006-16.
70. Lecchi C, Invernizzi G, Agazzi A, Ferroni M, Pisani LF, Savoini G, et al. In vitro modulation of caprine monocyte immune functions by omega-3 polyunsaturated fatty acids. *Veterinary journal*. 2010 Oct 1 In Press.
71. Pisani LF, Lecchi C, Invernizzi G, Sartorelli P, Savoini G, Cecilian F. In vitro modulatory effect of omega-3 polyunsaturated fatty acid (EPA and DHA) on phagocytosis and ROS production of goat neutrophils. *Vet Immunol Immunopathol*. 2009 Sep 15;131(1-2):79-85.
72. Khalfoun B, Gruel Y, Bardos P, Lebranchu Y. Docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids inhibit in vitro human lymphocyte proliferation induced by allogenic cells. *Transplant Proc*. 1997 Aug;29(5):2397.
73. Mullen A, Loscher CE, Roche HM. Anti-inflammatory effects of EPA and DHA are dependent upon time and dose-response elements associated with LPS stimulation in THP-1-derived macrophages. *J Nutr Biochem*. 2010 May;21(5):444-50.

74. Weldon SM, Mullen AC, Loscher CE, Hurley LA, Roche HM. Docosahexaenoic acid induces an anti-inflammatory profile in lipopolysaccharide-stimulated human THP-1 macrophages more effectively than eicosapentaenoic acid. *J Nutr Biochem*. 2007 Apr;18(4):250-8.
75. Sperling RI, Benincaso AI, Knoell CT, Larkin JK, Austen KF, Robinson DR. Dietary omega-3 polyunsaturated fatty acids inhibit phosphoinositide formation and chemotaxis in neutrophils. *J Clin Invest*. 1993 Feb;91(2):651-60.
76. Thies F, Nebe-von-Caron G, Powell JR, Yaqoob P, Newsholme EA, Calder PC. Dietary supplementation with gamma-linolenic acid or fish oil decreases T lymphocyte proliferation in healthy older humans. *J Nutr*. 2001 Jul;131(7):1918-27.
77. Halvorsen DS, Hansen JB, Grimsgaard S, Bonna KH, Kierulf P, Nordoy A. The effect of highly purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on monocyte phagocytosis in man. *Lipids*. 1997 Sep;32(9):935-42.
78. Schmidt EB, Varming K, Pedersen JO, Lervang HH, Grunnet N, Jersild C, et al. Long-term supplementation with n-3 fatty acids, II: Effect on neutrophil and monocyte chemotaxis. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 1992 May;52(3):229-36.
79. Chen GY, Nunez G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat Rev Immunol*. 2010 Dec;10(12):826-37.
80. Barton GM. A calculated response: control of inflammation by the innate immune system. *J Clin Invest*. 2008 Feb;118(2):413-20.
81. Stubbs CD, Smith AD. The modification of mammalian membrane polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. *Biochimica et biophysica acta*. 1984 Jan 27;779(1):89-137.
82. Mahoney EM, Hamill AL, Scott WA, Cohn ZA. Response of endocytosis to altered fatty acyl composition of macrophage phospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Nov;74(11):4895-9.
83. Pham CT. Neutrophil serine proteases: specific regulators of inflammation. *Nat Rev Immunol*. 2006 Jul;6(7):541-50.
84. Lefkovits I, Velha TA. *Imunobiologia. O sistema imune na saúde e na doença*. 5ª ed: Artmed; 2002.

85. Calder PC. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids. [Review]. 2007 Nov-Dec;77(5-6):327-35.
86. Nathan C. Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat Rev Immunol*. 2006 Mar;6(3):173-82.
87. Scapini P, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, Calzetti F, Bazzoni F, Cassatella MA. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev*. 2000 Oct;177:195-203.
88. Cassatella MA. The production of cytokines by polymorphonuclear neutrophils. *Immunol Today*. 1995 Jan;16(1):21-6.
89. Segal AW. How neutrophils kill microbes. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:197-223.
90. Batot G, Martel C, Capdeville N, Wientjes F, Morel F. Characterization of neutrophil NADPH oxidase activity reconstituted in a cell-free assay using specific monoclonal antibodies raised against cytochrome b558. *Eur J Biochem*. 1995 Nov 15;234(1):208-15.
91. El-Benna J, Dang PM, Perianin A. Peptide-based inhibitors of the phagocyte NADPH oxidase. *Biochem Pharmacol*. 2010 Sep 15;80(6):778-85.
92. Welch HC, Coadwell WJ, Ellson CD, Ferguson GJ, Andrews SR, Erdjument-Bromage H, et al. P-Rex1, a PtdIns(3,4,5)P3- and Gbetagamma-regulated guanine-nucleotide exchange factor for Rac. *Cell*. 2002 Mar 22;108(6):809-21.
93. Groemping Y, Rittinger K. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. *Biochem J*. 2005 Mar 15;386(Pt 3):401-16.
94. Babior BM. NADPH oxidase: an update. *Blood*. 1999 Mar 1;93(5):1464-76.
95. Wientjes FB, Segal AW. NADPH oxidase and the respiratory burst. *Semin Cell Biol*. 1995 Dec;6(6):357-65.
96. El-Benna J, Dang PM, Gougerot-Pocidal MA. Priming of the neutrophil NADPH oxidase activation: role of p47phox phosphorylation and NOX2 mobilization to the plasma membrane. *Semin Immunopathol*. 2008 Jul;30(3):279-89.

97. Hampton MB, Kettle AJ, Winterbourn CC. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase, and bacterial killing. *Blood*. 1998 Nov 1;92(9):3007-17.
98. Lambeth JD, Cheng G, Arnold RS, Edens WA. Novel homologs of gp91phox. *Trends Biochem Sci*. 2000 Oct;25(10):459-61.
99. Winterbourn CC. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. *Nat Chem Biol*. 2008 May;4(5):278-86.
100. Peachman KK, Lyles DS, Bass DA. Mitochondria in eosinophils: functional role in apoptosis but not respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Feb 13;98(4):1717-22.
101. Maianski NA, Geissler J, Srinivasula SM, Alnemri ES, Roos D, Kuijpers TW. Functional characterization of mitochondria in neutrophils: a role restricted to apoptosis. *Cell Death Differ*. 2004 Feb;11(2):143-53.
102. Mandavilli BS, Santos JH, Van Houten B. Mitochondrial DNA repair and aging. *Mutat Res*. 2002 Nov 30;509(1-2):127-51.
103. Lokesh BR, Black JM, German JB, Kinsella JE. Docosahexaenoic acid and other dietary polyunsaturated fatty acids suppress leukotriene synthesis by mouse peritoneal macrophages. *Lipids*. 1988 Oct;23(10):968-72.
104. Finkel T, Holbrook NJ. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*. 2000 Nov 9;408(6809):239-47.
105. Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*. 2005 Feb 25;120(4):483-95.
106. Hibbs JB, Jr., Taintor RR, Vavrin Z, Rachlin EM. Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule. *Biochemical and biophysical research communications*. 1988 Nov 30;157(1):87-94.
107. Rimele TJ, Sturm RJ, Adams LM, Henry DE, Heaslip RJ, Weichman BM, et al. Interaction of neutrophils with vascular smooth muscle: identification of a neutrophil-derived relaxing factor. *J Pharmacol Exp Ther*. 1988 Apr;245(1):102-11.
108. Bredt DS, Snyder SH. Nitric oxide mediates glutamate-linked enhancement of cGMP levels in the cerebellum. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Nov;86(22):9030-3.

109. Nathan C, Xie QW. Nitric oxide synthases: roles, tolls, and controls. *Cell*. 1994 Sep 23;78(6):915-8.
110. Hibbs JB, Jr. Synthesis of nitric oxide from L-arginine: a recently discovered pathway induced by cytokines with antitumour and antimicrobial activity. *Res Immunol*. [Review]. 1991 Sep;142(7):565-9; discussion 96-8.
111. Reynolds A, Rubin J, Clermont G, Day J, Vodovotz Y, Bard Ermentrout G. A reduced mathematical model of the acute inflammatory response: I. Derivation of model and analysis of anti-inflammation. *J Theor Biol*. 2006 Sep 7;242(1):220-36.
112. McCann SM, Mastronardi C, de Laurentiis A, Rettori V. The nitric oxide theory of aging revisited. *Ann N Y Acad Sci*. 2005 Dec;1057:64-84.
113. de Lima TM, Amarante-Mendes GP, Curi R. Docosahexaenoic acid enhances the toxic effect of imatinib on Bcr-Abl expressing HL-60 cells. *Toxicol In Vitro*. 2007 Dec;21(8):1678-85.
114. Vinolo MA, Rodrigues HG, Hatanaka E, Sato FT, Sampaio SC, Curi R. Suppressive effect of short-chain fatty acids on production of proinflammatory mediators by neutrophils. *The Journal of nutritional biochemistry*. 2010 Dec 15;in Press.
115. Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*. 1991 Jun 3;139(2):271-9.
116. Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol*. 1988 Oct 1;141(7):2407-12.
117. de Lima TM, de Sa Lima L, Scavone C, Curi R. Fatty acid control of nitric oxide production by macrophages. *FEBS Lett*. 2006 May 29;580(13):3287-95.
118. Pithon-Curi TC, Trezena AG, Tavares-Lima W, Curi R. Evidence that glutamine is involved in neutrophil function. *Cell Biochem Funct*. 2002 Jun;20(2):81-6.
119. Sampaio SC, Brigatte P, Sousa-e-Silva MC, dos-Santos EC, Rangel-Santos AC, Curi R, et al. Contribution of crotoxin for the inhibitory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom on macrophage function. *Toxicon*. 2003 Jun;41(7):899-907.

120. Zhou M, Diwu Z, Panchuk-Voloshina N, Haugland RP. A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Anal Biochem.* 1997 Nov 15;253(2):162-8.
121. Stevenson SW, Dudley GA. Dietary creatine supplementation and muscular adaptation to resistive overload. *Med Sci Sports Exerc.* 2001 Aug;33(8):1304-10.
122. Slusser WN, Wade GN. Testicular effects on food intake, body weight, and body composition in male hamsters. *Physiol Behav.* 1981 Oct;27(4):637-40.
123. Hatanaka E, Levada-Pires AC, Pithon-Curi TC, Curi R. Systematic study on ROS production induced by oleic, linoleic, and gamma-linolenic acids in human and rat neutrophils. *Free Radic Biol Med.* 2006 Oct 1;41(7):1124-32.
124. Gyllenhammar H. Lucigenin chemiluminescence in the assessment of neutrophil superoxide production. *Journal of immunological methods.* 1987 Mar 12;97(2):209-13.
125. Simon SF, Taylor CG. Dietary zinc supplementation attenuates hyperglycemia in db/db mice. *Exp Biol Med (Maywood).* 2001 Jan;226(1):43-51.
126. Zhang B, Hirahashi J, Cullere X, Mayadas TN. Elucidation of molecular events leading to neutrophil apoptosis following phagocytosis: cross-talk between caspase 8, reactive oxygen species, and MAPK/ERK activation. *The Journal of biological chemistry.* 2003 Aug 1;278(31):28443-54.
127. Rosenfeld G. Método rápido de coloração de esfregaços de sangue: noções práticas sobre corantes pancrômicos e estudo de diversos fatores. São Paulo: Mem. Inst. Butantan; 1947. p. 315-28.
128. Fock RA, Vinolo MA, de Moura Sa Rocha V, de Sa Rocha LC, Borelli P. Protein-energy malnutrition decreases the expression of TLR-4/MD-2 and CD14 receptors in peritoneal macrophages and reduces the synthesis of TNF-alpha in response to lipopolysaccharide (LPS) in mice. *Cytokine.* 2007 Nov;40(2):105-14.
129. Rogero MM, Borelli P, Fock RA, de Oliveira Pires IS, Tirapegui J. Glutamine in vitro supplementation partly reverses impaired macrophage function resulting from early weaning in mice. *Nutrition.* 2008 Jun;24(6):589-98.
130. Rogero MM, Borelli P, Vinolo MA, Fock RA, de Oliveira Pires IS, Tirapegui J. Dietary glutamine supplementation affects macrophage function, hematopoiesis and nutritional status in early weaned mice. *Clinical nutrition.* 2008 Jun;27(3):386-97.

131. Herscowitz HB, Holden HT, Belantl JA, Ghaffar A. In Manual of macrophage methodology. Dekker M, editor 1981; New York, 161-70.
132. Corazzini R. Avaliação morfo-fisiológica de macrófagos peritoneais de camundongos submetidos ao choque térmico: dissertação Mestrado, 2010 Universidade de São Paulo; 1993.
133. Saarinen MT, Kettunen H, Pulliainen K, Peuranen S, Tiihonen K, Remus J. A novel method to analyze betaine in chicken liver: effect of dietary betaine and choline supplementation on the hepatic betaine concentration in broiler chicks. *J Agric Food Chem.* 2001 Feb;49(2):559-63.
134. Sanderson P, Sattar N, Olthof M, Grimble RF, Calder PC, Griffin BA, et al. Dietary lipids and vascular function: UK Food Standards Agency workshop report. *Br J Nutr.* 2004 Mar;91(3):491-500.
135. Satyanarayana K, Naidu AN, Rao BS. Studies on the effect of nutritional deprivation during childhood on body composition of adolescent boys: creatinine excretion. *Am J Clin Nutr.* 1981 Feb;34(2):161-5.
136. Schmid-Schonbein GW. Analysis of inflammation. *Annu Rev Biomed Eng.* 2006;8:93-131.
137. Furchgott RF, Cherry PD, Zawadzki JV, Jothianandan D. Endothelial cells as mediators of vasodilation of arteries. *Journal of cardiovascular pharmacology.* 1984;(6 Suppl 2):S336-43.
138. Guzik TJ, Korbout R, Adamek-Guzik T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and immune regulation. *J Physiol Pharmacol.* [Review]. 2003 Dec;54(4):469-87.
139. Renier G, Skamene E, DeSanctis J, Radzioch D. Dietary n-3 polyunsaturated fatty acids prevent the development of atherosclerotic lesions in mice. Modulation of macrophage secretory activities. *Arterioscler Thromb.* 1993 Oct;13(10):1515-24.
140. Poulos A, Robinson BS, Ferrante A, Harvey DP, Hardy SJ, Murray AW. Effect of 22-32 carbon n-3 polyunsaturated fatty acids on superoxide production in human neutrophils: synergism of docosahexaenoic acid with f-met-leu-phe and phorbol ester. *Immunology.* 1991 May;73(1):102-8.
141. Aburto EM, Cribb AE, Fuentealba C. Effect of chronic exposure to excess dietary copper and dietary selenium supplementation on liver specimens from rats. *Am J Vet Res.* 2001 Sep;62(9):1423-7.



142. Shizgal HM. The effect of malnutrition on body composition. *Surg Gynecol Obstet.* 1981 Jan;152(1):22-6.
143. Calder PC. Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity. *Lipids.* [Review]. 2001 Sep;36(9):1007-24.
144. Eicher SD, McVey DS. Dietary modulation of Kupffer cell and splenocyte function during a *Salmonella typhimurium* challenge in mice. *J Leukoc Biol.* 1995 Jul;58(1):32-9.
145. Hughes DA, Pinder AC, Piper Z, Johnson IT, Lund EK. Fish oil supplementation inhibits the expression of major histocompatibility complex class II molecules and adhesion molecules on human monocytes. *The American journal of clinical nutrition.* 1996 Feb;63(2):267-72.
146. Calder PC, Bond JA, Harvey DJ, Gordon S, Newsholme EA. Uptake and incorporation of saturated and unsaturated fatty acids into macrophage lipids and their effect upon macrophage adhesion and phagocytosis. *Biochem J.* 1990 Aug 1;269(3):807-14.
147. Schroit AJ, Gallily R. Macrophage fatty acid composition and phagocytosis: effect of unsaturation on cellular phagocytic activity. *Immunology.* 1979 Feb;36(2):199-205.
148. Lokesh BR, Wrann M. Incorporation of palmitic acid or oleic acid into macrophage membrane lipids exerts differential effects on the function of normal mouse peritoneal macrophages. *Biochimica et biophysica acta.* 1984 Feb 9;792(2):141-8.
149. Greene ME, Blumberg B, McBride OW, Yi HF, Kronquist K, Kwan K, et al. Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. *Gene Expr.* 1995;4(4-5):281-99.
150. Belvisi MG, Hele DJ, Birrell MA. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonists as therapy for chronic airway inflammation. *Eur J Pharmacol.* [Review]. 2006 Mar 8;533(1-3):101-9.
151. Standiford TJ, Keshamouni VG, Reddy RC. Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  as a regulator of lung inflammation and repair. *Proc Am Thorac Soc.* [Review]. 2005;2(3):226-31.

152. Reddy RC, Narala VR, Keshamouni VG, Milam JE, Newstead MW, Standiford TJ. Sepsis-induced inhibition of neutrophil chemotaxis is mediated by activation of peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ . *Blood*. 2008 Nov 15;112(10):4250-8.
153. Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, Vanden Berghe W, Peters JM, Gonzalez FJ, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappaB and AP-1. *The Journal of biological chemistry*. 1999 Nov 5;274(45):32048-54.
154. Chung SW, Kang BY, Kim SH, Pak YK, Cho D, Trinchieri G, et al. Oxidized low density lipoprotein inhibits interleukin-12 production in lipopolysaccharide-activated mouse macrophages via direct interactions between peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and nuclear factor-kappa B. *The Journal of biological chemistry*. 2000 Oct 20;275(42):32681-7.
155. Delerive P, Martin-Nizard F, Chinetti G, Trottein F, Fruchart JC, Najib J, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway. *Circ Res*. 1999 Sep 3;85(5):394-402.
156. Edwards IJ, O'Flaherty JT. Omega-3 Fatty Acids and PPARgamma in Cancer. *PPAR Res*. 2008;2008:358052.
157. Lazennec G, Canaple L, Saugy D, Wahli W. Activation of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) by their ligands and protein kinase A activators. *Mol Endocrinol*. 2000 Dec;14(12):1962-75.