

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA
(Associação Ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)

EFEITO DA GENISTEÍNA NA FUNCIONALIDADE DE MACRÓFAGOS: UM
ESTUDO COMPARATIVO ENTRE RATOS MACHOS E FÊMEAS

CAMILA JURASZECK

Ponta Grossa

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EVOLUTIVA
(Associação Ampla entre a UEPG e a UNICENTRO)

EFEITO DA GENISTEÍNA NA FUNCIONALIDADE DE MACRÓFAGOS: UM
ESTUDO COMPARATIVO ENTRE RATOS MACHOS E FÊMEAS

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa em associação com a Universidade do Centro Oeste do Paraná, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Área de Concentração em Biologia Evolutiva).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carla Cristine Kanunfre

Ponta Grossa

2011

Ficha catalográfica Elaborada pelo Setor de Tratamento da Informação BICEN/UEPG.

J95e Juraszeck, Camila
Efeito da genisteína na funcionalidade de macrófagos : um estudo comparativo entre ratos machos e fêmeas / Camila Juraszeck. Ponta Grossa, 2011.
111 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – área de concentração Biologia Evolutiva), Universidade Estadual de Ponta Grossa e Universidade Estadual do Centro - Oeste.
Orientador: Profa. Dra. Carla Cristine Kanunfre

1. Dimorfismo sexual. 2. 17 β - estradiol. 3. Fêmeas.
4. Fitoestrógenos. 5. Genisteína. 6. Macrófagos. I. Kanunfre, Carla Cristine. II. T.

CDD: 571



Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva

Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa (Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética) e a Universidade Estadual do Centro Oeste (Departamento de Ciências Biológicas)



ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº. 03/2011

Ata referente à Defesa de Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, uma Associação Ampla entre a Universidade Estadual de Ponta Grossa e a Universidade Estadual do Centro-Oeste, pela candidata **CAMILA JURASZECK**.

Aos dezenove do mês de abril de dois mil e onze, no Auditório do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva da Universidade Estadual de Ponta Grossa sob a presidência da Dr^a Carla Cristine Kanunfre, em sessão pública, reuniu-se a Comissão Examinadora da Defesa de Dissertação do (a) aluno(a) **CAMILA JURASZECK**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas-área de concentração Biologia Evolutiva, visando o título de Mestre, constituída pelos: Dr^a Carla Cristine Kanunfre (Orientadora), Dr^a Anita Nishiyama e Dr^a Henriette Rosa de Oliveira Emílio. Atestada pela colenda Congregação do Colegiado de Curso do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, área de concentração em Biologia Evolutiva. Iniciados os trabalhos a presidência deu conhecimento aos membros da Comissão e ao (a) candidato(a) das normas que regem a defesa de dissertação. A seguir a candidata passou a defesa de sua dissertação intitulada: **Efeito da Genisteína na Funcionalidade de Macrófagos: Um Estudo Comparativo entre Ratos Machos e Fêmeas**. Encerrada a defesa, procedeu-se ao julgamento e a Comissão Examinadora considerou o(a) candidato(a) **APROVADA**. A Presidência ressaltou que a obtenção do título de Mestre está condicionada ao disposto da atual aprovação de outorga do Título de Mestre em Ciências Biológicas, Área de concentração em Biologia Evolutiva, com validade de sessenta dias; o não depósito da versão definitiva de Dissertação, bem como as cópias em CD(PDF) com todas as correções feitas e atestadas pelo(a) orientador(a) neste prazo anulará toda possibilidade de outorga definitiva do Título, recebimento de Certidão e outros documentos, bem como a solicitação do Diploma. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Comissão Examinadora. Observação (se necessário)

Alteração de Título: sim ☐ não ☒

Novo título: _____

Ponta Grossa, 19 de abril de dois mil e onze.

Prof^a Dr^a Carla Cristine Kanunfre

Prof^a Dr^a Anita Nishiyama

Prof^a Dr^a Henriette Rosa de Oliveira Emílio

À minha família e ao meu noivo pelo incentivo e amor conferidos a mim, e principalmente pela compreensão em meus momentos de ausência.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por estar presente em todos os momentos da minha vida.

À minha orientadora Prof. Dra. Carla Cristine Kanunfre, exemplo de competência, por seus preciosos ensinamentos, que sempre com muito amor, carinho e dedicação, orientou este trabalho.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Evolutiva, que com os seus preciosos conhecimentos participaram de minha formação e colaboraram de alguma forma para o desenvolvimento deste trabalho.

A minha mãe Célia Juraszeck, ao meu pai Waldemar Juraszeck e ao meu irmão Alexandre Juraszeck, que sempre me apoiaram e me deram força nos momentos difíceis. E em especial ao meu noivo Gilberto Machado, pelas palavras de carinho, e por estar sempre ao meu lado me incentivando em seguir em frente.

A minha colega de mestrado e amiga Josimar Mariano Borille, que me acompanhou em muitos sábados, domingos e feriados de estudos e experimentos, bem como em muitas viagens cansativas, mas prazerosas, de idas e vindas de União da Vitória à Ponta Grossa.

Ao Prof. Dr. Roberto Ferreira Artoni, ao Professor Dr. Marcos Pileggi e Zoli Oliveira, sempre solícitos a prestar auxílio e esclarecimentos.

Ao professor José Rosa Gomes pelos ensinamentos repassados e a professora Márcia pela realização das análises bioquímicas.

A Talita Schena que cedeu gentilmente sua casa para hospedagem por tantas vezes.

Enfim a todas as pessoas que contribuíram para que esta pesquisa pudesse ser realizada.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Variações das estruturas básicas dos flavonóides.....	42
Figura 2 -	Semelhança entre as estruturas químicas do estrogênio e da isoflavona.....	43
Figura 3 -	Semelhanças estruturais da isoflavona genisteína e do estradiol.....	44
Figura 4 -	Efeito da genisteína em humanos e roedores.....	91
Figuras do Capítulo I (Artigo):		
Figura 1a -	Efeito da genisteína, quercetina e 17 β -estradiol na viabilidade celular de macrófagos (sem a indução de LPS) de ratos machos e fêmeas.....	84
Figura 2a -	Efeito da genisteína, quercetina e 17 β -estradiol na viabilidade celular de macrófagos (com a indução de LPS) de ratos machos e fêmeas em proestro.....	84
Figura 3a -	Porcentagem de produção de NO basal dos macrófagos de ratos machos e fêmeas tratados com genisteína, quercetina e 17 β -estradiol.....	85
Figura 4a -	Porcentagem de produção de NO induzida por LPS dos macrófagos de ratos machos e fêmeas tratados com genisteína, quercetina e 17 β -estradiol.....	86
Figura 5a -	Porcentagem da produção de H ₂ O ₂ induzida por LPS dos macrófagos de ratos machos e fêmeas tratados com genisteína, quercetina e 17 β -estradiol.....	87

Figura 6a -	Porcentagem de fagocitose de partículas opsonizadas de macrófagos (2×10^5 células) de ratos machos e fêmeas tratados com genisteína, quercetina e 17β -estradiol.....	88
Figura 7a -	Porcentagem de fagocitose de partículas não-opsonizadas de macrófagos (2×10^5 células) de ratos machos e fêmeas tratados com genisteína, quercetina e 17β -estradiol.....	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Efeito da genisteína em macrófagos.....	46
Tabela 2 -	Delineamento experimental em função dos grupos.....	49
Tabelas do Capítulo I (Artigo):		
Tabela 1a -	Variação do peso corporal, parâmetros bioquímicos e hormonais entre ratos machos e fêmeas (diestro e proestro) de 110-130 dias.....	83
Tabela 2a -	Comparação entre a produção de NO basal e induzida por LPS de macrófagos controle.....	83

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	17
2.1	EVOLUÇÃO DO SISTEMA IMUNE.....	17
2.2	PAPEL DOS MACRÓFAGOS.....	21
2.2.1	<i>Fagocitose de micro-organismos.....</i>	<i>25</i>
2.2.2	<i>Produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio pelos macrófagos.....</i>	<i>28</i>
2.2.3	<i>Estresse oxidativo.....</i>	<i>31</i>
2.3	DIMORFISMO SEXUAL NA RESPOSTA IMUNE DE MACRÓFAGOS.....	35
2.4	FITOESTRÓGENOS DA SOJA.....	40
2.4.1	<i>A atividade estrogênica das isoflavonas no sistema imune.....</i>	<i>43</i>
2.4.2	<i>Efeito da genisteína em macrófagos.....</i>	<i>46</i>
3	OBJETIVOS.....	47
3.1	OBJETIVO GERAL.....	47
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	47
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	48
4.1	REAGENTES.....	48
4.2	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL, OBTENÇÃO DO SORO E DOS MACRÓFAGOS	48
4.2.1	<i>Coleta do sangue, obtenção de soro e determinação dos parâmetros bioquímicos (glicose, colesterol e triglicerídeos) e</i>	

	<i>concentração sérica do 17β-estradiol</i>	50
4.2.2	<i>Obtenção de macrófagos peritoneais</i>	51
4.3	AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA GENISTEÍNA.....	52
4.4	AVALIAÇÃO DA FUNCIONALIDADE DE MACRÓFAGOS.....	53
4.4.1	<i>Determinação da produção de NO</i>	53
4.4.2	<i>Determinação da produção de H₂O₂</i>	54
4.4.3	<i>Ensaio de fagocitose</i>	55
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	56
5	RESULTADOS : Capítulo I: Comparação do efeito da genisteína na produção de óxido nítrico, peróxido de hidrogênio e na capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais de ratos machos e fêmeas.....	57
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	90
7	CONCLUSÕES	94
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

RESUMO

A genisteína tem atividades estrogênicas, e pode se ligar aos receptores de estrogênio (RE), por isso é considerada um fitoestrógeno. RE têm sido relatados em macrófagos e nesse sentido, os estrogênios modulam as respostas imunes. Apesar do dimorfismo sexual das respostas imunes de fêmeas e machos estar bem estabelecido, existem poucos estudos que elucidem o papel de compostos bioativos como a genisteína entre os sexos. Neste estudo, investigamos os efeitos da genisteína na funcionalidade de macrófagos de ratos, avaliando comparativamente machos e fêmeas, sendo estes divididos em três grupos de acordo com o sexo e a fase do ciclo estral. Primeiramente verificamos a citotoxicidade, empregando a técnica de redução do MTT, dos seguintes compostos: genisteína, quercetina e 17 β -estradiol, na presença ou ausência de lipopolissacarídeo (LPS). E nenhum destes alterou a viabilidade celular. Para o ensaio da funcionalidade dos macrófagos, as células foram tratadas por 24 horas com duas concentrações de genisteína e quercetina (5 μ M e 10 μ M), como também duas concentrações de 17 β -estradiol (0,01 e 10 η M), além do controle do veículo, o dimetilsulfoxido (DMSO) na concentração de 0,5%. Dos parâmetros de funcionalidade dos macrófagos, foram determinadas por espectrofotometria a produção de NO tanto basal quanto a induzida por LPS, bem como a produção de H₂O₂ induzida por LPS, e por microscopia de luz realizou-se a avaliação da capacidade fagocítica dos macrófagos, que foram desafiados a fagocitar partículas de Zimosan opsonizadas ou não, após tratamentos de 2 horas. Os resultados encontrados revelam uma porcentagem de inibição da produção de NO basal de macrófagos tratados com genisteína 10 μ M de 34% e 40%, para machos e fêmeas em diestro, respectivamente. Nos macrófagos obtidos das fêmeas em proestro apenas o tratamento quercetina (em menor e maior concentração) apresentou diminuição na produção de NO basal significativa em relação ao controle, com inibição de 24% e 34% respectivamente. Quanto a produção de NO induzida por LPS, macrófagos de machos apresentaram inibição significativa da produção com todos os tratamentos (exceto quercetina 5 μ M), enquanto nas fêmeas em diestro, os tratamentos genisteína (5 e 10 μ M) e quercetina (5 e 10 μ M), diminuíram significativamente esse parâmetro funcional de macrófagos, com os valores correspondentes respectivamente a 25%, 30%, 17% e 31%. Já nas fêmeas em proestro, a produção de NO basal e induzida por LPS foi apenas inibida pela quercetina (10 μ M). Todos os tratamentos dos macrófagos obtidos de machos reduziram a produção de H₂O₂, sendo porcentagem de inibição da genisteína 10 μ M de 27%. Nas fêmeas em diestro observa-se que os tratamentos com genisteína 5 e 10 μ M e quercetina 10 μ M inibiram respectivamente em 29%, 32% e 37% a produção de H₂O₂. A produção de H₂O₂ pelos macrófagos das fêmeas em proestro foi inibida significativamente por todos os tratamentos (exceto estradiol 0,01 η M e quercetina 10 μ M), sendo que a porcentagem de inibição da genisteína 5 e 10 μ M foi de 22%. A atividade fagocítica dos macrófagos não foi influenciada pelo tratamento com a genisteína para nenhum dos grupos. Nossos resultados são sugestivos de que a produção de NO nos macrófagos pré-modulados pela exposição ao hormônio estradiol o efeito da genisteína é menos acentuado, podendo ser explicado por possível *downregulation* dos RE em tratamentos *ex vivo*. Em conclusão podemos inferir que para o emprego da genisteína deve se levar em consideração o sexo, e por conseguinte, a variação da concentração hormonal sérica de 17 β -estradiol (ciclo sexual) em fêmeas.

Palavras-chaves: dimorfismo sexual , 17 β -estradiol, fêmeas, fitoestrógenos, genisteína, macrófagos.

ABSTRACT

Genistein has estrogenic activity and can bind to estrogen receptors (ER), so it is considered a phytoestrogen. ER have been reported in macrophages and in that sense, the estrogens modulate immune responses. Despite the sexual dimorphism of the immune responses in females and males is well established, there are few studies that elucidate the role of bioactive compounds such as genistein among the genders. We investigated the effects of genistein on mice macrophage functionality, benchmarking males and females, which are divided into three groups according to sex and stage of the estrous cycle. First we checked the cytotoxicity, employing the technique of MTT reduction, in the following compounds: genistein, quercetin and 17 β -estradiol in the presence or absence of lipopolysaccharide (LPS). And none of these altered cell viability. To test the functionality of macrophages, the cells were treated for 24 h with two concentrations of genistein and quercetin (5 μ M and 10 μ M) as well as two concentrations of 17 β -estradiol (0,01 and 10 nM), besides the control of the vehicle, the dimethylsulfoxide (DMSO) at 0,5%. The macrophages' function standards determined by spectrophotometry were the NO production in both basal and LPS induced, the production of H₂O₂ induced by LPS and by light microscopy was evaluated the phagocytic ability of macrophages, which were challenged to phagocytize Zymosan particles opsonized or not, after two hours of treatments. The results show a inhibition percentage of basal NO production in macrophages treated with genistein 10 μ M, 34% and 40% for males and females in diestrus, respectively. In the macrophages obtained from females in proestrus quercetin treatment alone (in lower and higher concentration) showed a decrease in basal NO production significantly compared to control, with inhibition of 24% and 34% respectively. As NO production induced by LPS, macrophages from males showed significant inhibition of production with all treatments (except quercetin 5 μ M), while in females in diestrus, treatments genistein (5 and 10 μ M) and quercetin (5 and 10 μ M), this parameter significantly decreased functional macrophages, with values corresponding respectively to 25%, 30%, 17% and 31%. Once in females in proestrus, basal NO production induced by LPS and was inhibited only by quercetin (10 μ M). All treatments of macrophages collected from the male reduced the production of H₂O₂ and genistein inhibition percentage of 10 μ M of 27%. In females in diestrus was observed that treatment with genistein 5 e 10 μ M and quercetin 10 μ M inhibited respectively 29%, 32% and 37% the production of H₂O₂. The H₂O₂ production by macrophages from females in proestrus was significantly inhibited by all treatments (except estradiol 0,01 nM and quercetin 10 μ M), and the percentage inhibition of genistein 5 e 10 μ M was 22%. The phagocytic activity of macrophages was not affected by treatment with genistein for either group. Our results suggest that NO production, macrophages pre-modulated by exposure to 17 β -estradiol, the effect of genistein is less pronounced, may possible be explained by downregulation of ER in ex vivo treatments. In conclusion we can infer that, the use of genistein should account for sex, and therefore variations in serum hormone concentrations of 17 β -estradiol (sexual cycle) in females.

Keywords: 17 β -estradiol, females, genistein, macrophages, phytoestrogens, sexual dimorphism.

1 INTRODUÇÃO

O sistema imune é o principal mecanismo de defesa do corpo contra agentes invasivos, sendo regulado por inúmeros fatores, como por exemplo, pela dieta. De fato, estudos demonstram que a alimentação tem direta implicação na funcionalidade das células do sistema imune (CHANDRA, 2002). Dos diferentes componentes de nossa dieta, os fitoestrógenos (FE), que representam um grande grupo de constituintes de plantas com estrutura similar aos estrogênios, podem modular as respostas imunes celulares (MEDEIROS; MAITELLI; NINCE, 2007).

Dos três maiores grupos de FE, flavonas, isoflavonas e cumestranos, (HAN et al., 2002), as isoflavonas são as mais encontradas nas dietas. Dentre as isoflavonas, podemos destacar a genisteína, presente na soja e em seus derivados. As isoflavonas além de apresentarem atividade estrogênica, (CLAPAUCH et al., 2002; FORTES et al., 2007) são também consideradas antioxidantes naturais, pois neutralizam radicais livres no organismo (FERRARI et al., 2001).

Os FE atualmente têm sido muito pesquisados, não somente por suas ações estrogênicas, sendo utilizada na terapia de reposição hormonal da menopausa, mas também por suas potenciais aplicações terapêuticas como fator de proteção a doenças inflamatórias, cardiovasculares e ao câncer (CLAPAUCH et al., 2002).

Existem evidências que os esteróides sexuais (estrogênio, progesterona e androgênio), têm efeito modulador sobre o sistema imune, podendo regular o número destas células, a produção de citocinas, bem como aspectos da diferenciação celular (MEDEIROS et al., 2007).

Estudos clínicos e experimentais, com humanos e animais, têm demonstrado a existência de dimorfismo sexual das respostas imunológicas. Fêmeas apresentam uma resposta imune humoral e celular mais efetiva (BOUMAN; HEINEMAN; FAAS, 2005) e uma maior resistência a infecções bacterianas e virais quando comparada aos machos (MILLER; HUNT, 1996). De fato, têm se demonstrado que 17 β -estradiol modula efeitos na funcionalidade de monócitos e macrófagos (BOUMAN; HEINEMAN; FAAS, 2005), este é o principal estrogênio circulando em mulheres pré-menopáusicas e tem um papel direto na modulação da imunidade inata (MESSINGHAM; HEINRICH; KOVACS, 2001; SUZUKI et al., 2008; HSIEH et al., 2007)

A influência dos estrogênios no sistema imune exige a existência de receptores apropriados, os receptores de estrogênio (RE), sendo que estes se apresentam sob duas principais isoformas, alfa (RE α) e beta (RE β), as quais são codificadas por diferentes genes. Muitos compostos de diversos grupos químicos podem ativar os RE, dentre os quais incluem-se os FE (DIEZ-PERES, 2006). A ligação do hormônio ou dos FE com os RE pode conduzir a respostas celulares distintas que ocorrem por diferentes vias de sinalização, a genômica e a não genômica (SIMONCINI; GENAZZANI; LIAO, 2002).

Os FE podem apresentar ações estrogênicas (agonista) e antiestrogênicas (antagonista) sobre os RE, todavia com potência estrogênica inferior à do estradiol, mas com maior estabilidade e com uma meia vida maior. As ações estrogênicas ou antiestrogênicas dependem das concentrações dos FE e dos esteróides endógenos, do órgão alvo específico, e da interação com os receptores α e β (CLAPAUCH et al., 2002; DIEZ-PERES, 2006) .

Tecidos e células imunes expressam RE (COOKE; SELVARAJ; YELLAYI, 2006), sendo assim respondem ao estrogênio e aos FE, incluindo os macrófagos, que apresentam sua funcionalidade regulada por este hormônio (NALBANDIAN; KOVATS, 2005). Neste sentido, pode-se inferir que também os FE podem ativar ou inibir diferentes aspectos das funções de macrófagos.

Apesar de controversos, os dados da literatura sustentam a idéia de que consumo de FE pode alterar a resposta imune. Porém em se tratando da funcionalidade de macrófagos, a correlação entre imunidade e sexo torna-se essencial, após evidências de que o sistema imune é mais eficiente em fêmeas do que em machos (GAILLARD; SPINEDI, 1998; FUENTE, 2004; BOUMAN; HEINEMAN; FAAS, 2005). Os estudos nesta linha são escassos e conflitantes, além de que não se encontram estudos que avaliem o efeito dos FE sobre a funcionalidade de macrófagos entre os sexos.

Uma melhor avaliação do efeito dos FE sobre a funcionalidade de macrófagos, nossa primeira linha de defesa a infecções, permitirá melhor orientação quanto aos riscos e benefícios do uso destes, quer na dieta ou no seu emprego como medicamento especialmente entre os sexos. E buscando contribuir realizamos este trabalho.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 EVOLUÇÃO DO SISTEMA IMUNE

Por volta do século XIX pesquisas começaram a especular sobre como nosso complexo sistema de defesa surgiu. Décadas depois, imunologistas modernos acreditam que o sistema imune deve ter iniciado com os organismos unicelulares e o aproveitamento de peptídeos tóxicos para impedir a invasão de micro-organismos. Estratégia de defesa ainda encontrada em eucariotos simples e em animais mais complexos (TRAVIS, 2009).

Acredita-se que a imunidade inata (primeira linha de defesa do organismo), tem sua origem nos eucariotos primitivos, tais como a ameba. Esta seria a forma primordial dos macrófagos, que teria dado origem por uma via evolutiva ainda desconhecida aos macrófagos modernos. A imunidade inata dos eucariotos pode ter surgido da necessidade de um micro-organismo unicelular como a ameba de discriminar entre o alimento e outras amebas, a ausência desta distinção poderia culminar no desaparecimento destes micro-organismos. Nesse sentido, podemos supor a existência de um receptor de superfície específico nas amebas que atue para reconhecer o alimento que pode ser englobado (JANEWAY et al., 2002).

Acredita-se também que as amebas possam ter ocupado a cavidade celômica dos organismos multicelulares primordiais, atuando como células de defesa. Todos os vertebrados e muitos invertebrados possuem uma população de células fagocíticas que têm muito em comum com as amebas. É possível que tais células, prováveis ancestrais dos macrófagos, possam ter derivado de uma

população de células de organismos multicelulares que mantiveram uma morfologia ancestral, uma forma evolutiva de neotenia, isto é, expressão de traços primitivos, na qual a ontogenia dos macrófagos pode relacionar sua filogenia (JANEWAY et al., 2002).

Uma única célula com capacidade fagocítica exerce as funções de nutrição, excreção e defesa em organismos unicelulares. Entretanto, a seletividade na ingestão de material estranho já é observada em alguns amebóides como os micro-organismo *Dictyostelium discoideum*. Quando este se encontra em suspensão, ingere a bactéria *Salmonella* de cepas não-virulentas, mas não ingere *Salmonella* de cepas virulentas, indicando que a fagocitose, nesse caso, é regida pela constituição de carboidratos presentes na membrana da bactéria, uma vez que a virulência é atribuída a estes componentes (CARVALHO; COLLARES-BUZZATO, 2005).

Recentes pesquisas da análise genômica das plantas e dos animais tem revelado que um mecanismo sofisticado de defesa existe desde o tempo que os ancestrais das plantas e animais divergiram (JANEWAY et al., 2002). Isto tem sido evidenciado devido à descoberta de uma via semelhante entre a mosca-das-frutas *Drosophila* e os mamíferos, em relação à de fatores de transcrição envolvidos na indução da imunidade inata (MEDZHITOV; PRESTON-HURLBURT; JANEWAY, 1997). Acredita-se também que esta via esteja presente em plantas, entretanto, as evidências são menos diretas (JANEWAY et al., 2002).

Este sistema compartilhado é a via receptor Toll-like (TLR) e a ativação do fator de transcrição nuclear *kappa* B (NF- κ B) da função gênica. As sequências de DNA necessárias para a expressão dos TLRs e a ativação do NF- κ B são

encontradas em três classes de organismos: invertebrados, vertebrados e plantas. Há evidências de que os produtos destes genes compartilhados interagem em vias similares atuando na defesa do hospedeiro. Na mosca-das-frutas, na qual este módulo genético foi descoberto como organizador do eixo dorsoventral durante o desenvolvimento embrionário, também foi demonstrado, subsequentemente, seu papel essencial na defesa do hospedeiro (JANEWAY et al., 2002).

Todos os organismos multicelulares têm mecanismos de defesa do hospedeiro contra micro-organismos, sendo esta a imunidade natural. Entretanto, os mecanismos de defesa mais especializados, que constituem a imunidade adquirida, só estão presentes nos vertebrados (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Nos invertebrados, várias células respondem aos micro-organismos, cercando estes agentes infecciosos e os destruindo. Em metazoários primitivos que não possuem sistema circulatório definido, como poríferos, cnidários e platelmintos, há células fagocíticas percorrendo o corpo atuando não apenas na defesa do hospedeiro, mas também envolvidas nas funções de nutrição e excreção, ingerindo material estranho e células mortas. Entretanto nos celomados (protostomos e deuterostomos), cujos organismos são maiores e mais complexos, foi necessário o aparecimento de um sistema circulatório para transportar alimentos e detritos pelo organismo. Em invertebrados como artrópodes, anelídeos e moluscos, as células fagocíticas são mais especializadas e migram pelo sistema circulatório. Esta especificidade adquirida pelas células fagocíticas foi consequência de elas não serem mais necessárias para apreensão do

alimento, provavelmente migraram do tecido conjuntivo circundante para o aparelho circulatório, onde surgiu uma infinidade de tipos celulares específicos na reatividade imune (CARVALHO; COLLARES-BUZZATO, 2005). Essas células se parecem com as células fagocitárias e foram denominados amebócitos fagocíticos nos acelomados, hemócitos nos moluscos e nos artrópodes, coelomócitos nos anelídeos, e leucócitos sanguíneos nos tunicados (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Nos moluscos, as células fagocíticas, além de ingerirem partículas e micro-organismos, são responsáveis por este fenômeno de encapsulamento. Nesse caso, uma célula encontra a superfície de um material com dimensões maiores do que ela própria, emite pseudópodes e adere. Muitas células espalhando-se sobre a superfície do material formam um tipo de “cápsula” em torno deste (CARVALHO; COLLARES-BUZZATO, 2005).

Notavelmente, todos os organismos multicelulares expressam receptores celulares semelhantes aos TLR que reconhecem micro-organismos e iniciam reações de defesa contra estes. Assim, a defesa do hospedeiro invertebrado é mediada por células e moléculas semelhantes aos mecanismos efetores da imunidade natural dos organismos superiores (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Muitos estudos têm demonstrado que os invertebrados são capazes de rejeitar transplantes de tecidos estranhos ou alotransplantes (nos vertebrados esse processo de rejeição de enxertos depende de respostas imunológicas adquiridas). Se poríferos de duas colônias diferentes forem unidas mecanicamente, elas se tornam necróticas de 1 a 2 semanas, enquanto as

esponjas da mesma colônia se fundem e continuam a crescer. Anelídeos e equinodermas também rejeitam transplantes de tecidos de outras espécies do filo. Essas reações de rejeição são mediadas principalmente por células semelhantes a células fagocitárias. Elas diferem das que ocorrem nos vertebrados porque a memória para o tecido transplantado não é gerada ou é difícil de ser demonstrada (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Os macrófagos foram primeiramente descritos por Elie Metchnikoff, no início do século XIX. O pesquisador denominou essas células de fagócitos (“células que comem”), quando observou células de estrelas-do-mar e de esponjas englobando partículas e espinhos. Em estudos posteriores, Metchnikoff constatou que no sangue de mamíferos existem células com características semelhantes. Aos fagócitos do sangue deu o nome de macrófagos e micrófagos, que atualmente são conhecidos, respectivamente por macrófagos e polimorfonucleares (CARVALHO; COLLARES-BUZZATO, 2005).

2.2 PAPEL DOS MACRÓFAGOS

Os macrófagos são células fagocitárias que desempenham papéis importantes na imunidade inata e adaptativa. Quando ativados por produtos microbianos fagocitam e destroem micro-organismos, secretam citocinas pró-inflamatórias e apresentam antígenos aos linfócitos T-auxiliares (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Ontogeneticamente, nos embriões, os macrófagos são originários no saco vitelínico. No segundo mês de gestação no homem e no sétimo dia no

camundongo, observam-se células hematopoéticas diferenciadas, entre elas os fagócitos mononucleares. No terceiro mês de gestação no homem e no décimo dia, em camundongos, as células sanguíneas se formam no fígado e no baço. Posteriormente as células hematopoéticas colonizarão a medula óssea, onde residirão durante toda a vida adulta dos mamíferos (CARVALHO; COLLARES-BUZZATO, 2005).

Nesse sentido, em indivíduos adultos, a origem dos macrófagos ocorre na medula óssea, a partir de uma célula pluripotente mielóide, a partir da qual são originadas diferentes células progenitoras, entre elas as “unidades formadoras de colônia” de granulócitos e monócitos. Estas células originam os pró-monócitos que já apresentam capacidade de pinocitose e expressam uma série de receptores característicos de macrófagos. Os pró-monócitos, por sua vez, dão origem aos monócitos, que saem da medula óssea e ganham a circulação sanguínea. Os monócitos permanecem na circulação por cerca de 1-3 dias (NELSON; JOW, 1990; NEVEU, 1986), por conseguinte, essas células migram para vários órgãos e sofrem diferenciação em macrófagos residentes especializados, onde são geralmente designados de acordo com a sua localização, por exemplo, células de Kupfer no fígado, micróglia no cérebro, osteoclastos no tecido ósseo, macrófagos alveolares nos pulmões e células mesangiais no rim (GYORKI; LINDEMAN, 2008). Nos tecidos os macrófagos residentes têm um tempo de vida variando entre 2 e 4 meses (NELSON; JOW, 1990; NEVEU, 1986).

Caracterizam-se morfologicamente por serem células relativamente grandes, medindo entre 60 a 80 μm de diâmetro. Apresentam núcleo irregular e

excentricamente posicionado (com um ou mais nucléolos e cromatina pouco condensada), superfície celular também irregular (com inúmeras projeções citoplasmáticas), possuem complexos golgienses, lisossomos e mitocôndrias em grande número, e um citoesqueleto bem desenvolvido (AUGER; ROSS, 1992).

Inicialmente os macrófagos residentes no tecido eram chamados de macrófagos fixos. Macrófagos livres eram denominados aqueles que se desenvolviam como resultado de um estímulo exógeno e migravam para sítios particulares. Estes nomes têm sido substituídos por macrófagos residentes e macrófagos ativados, respectivamente (GARTNER; HIATT, 1997). Após a ativação por estímulos externos, como os micro-organismos, os macrófagos podem assumir diferentes formas. Estas células podem desenvolver citoplasma abundante, sendo chamadas de células epitelióides, em virtude da sua semelhança com as células epiteliais da pele, como também podem se fundir para formar células gigantes multinucleadas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Macrófagos ativados, de maneira geral, são um pouco maiores que os não ativados, principalmente devido ao aumento de volume citoplasmático (STITES; TERR, 1992). Além disso, apresentam atividade metabólica, motilidade e atividade fagocítica aumentada, o que os torna muito mais eficientes no processo de destruição de patógenos, bem como se acentua a habilidade destas células para aderir e espalhar-se em substratos, e modificam-se propriedades como a taxa de endocitose e a fusão de lisossomos com vacúolos endocíticos (VENKATA-REDY; GANGADHARAN, 1992).

A ativação dos macrófagos pode ocorrer de diversas maneiras, tais como: contato direto com micro-organismos ou partículas inertes, com

lipopolissacarídeos (LPS) bacteriano, produtos do próprio tecido danificado, com componentes protéicos do sistema complemento ou da coagulação sanguínea. Os macrófagos também podem se tornar ativados pela indução de certas citocinas que podem ser secretadas por linfócitos que estejam ao redor (STITES; TERR, 1992).

LPS é um lipopolissacarídeo complexo composto por um polissacarídeo hidrofílico e um domínio hidrofóbico conhecido como lipídio A. É o maior componente da membrana externa de bactérias gram-negativas e um dos mais potentes iniciadores microbianos da inflamação. Ele ativa monócitos e macrófagos para a produção de citocinas pró-inflamatórias tais como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina (IL)-1, IL-6, IL-8 e IL-12. Os macrófagos também secretam em resposta ao LPS, uma ampla variedade de outros mediadores de resposta biológica, incluindo fator ativador de plaquetas, prostaglandinas, enzimas e radicais livres (RL), como o óxido nítrico (NO) (RAETZ, 1990; COHEN, 2002).

Macrófagos são células onipresentes que estão envolvidas em processos fisiológicos como a destruição de patógenos (DIA; BERHOW; MEJIA, 2008). Estas células fagocíticas respondem tipicamente aos micro-organismos quase tão prontamente quanto os neutrófilos, entretanto, persistem muito mais tempo nos locais de inflamação. Ao contrário dos neutrófilos, os macrófagos não são terminalmente diferenciados e podem sofrer divisão celular em um local inflamatório. Sendo assim, estas células são dominantes nos estágios mais tardios da resposta imunológica natural (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Os macrófagos internalizam, processam e digerem o antígeno, bem como o apresentam aos linfócitos, os quais irão produzir moléculas as quais irão desencadear respostas em outras células. Por outro lado, os linfócitos também vão produzir moléculas mediadoras que vão para os macrófagos, ativando-os, ou seja, potencializando sua ação (STITES; TERR, 1992).

2.2.1 Fagocitose de micro-organismos

O processo de digestão de antígenos ocorre através da fagocitose, realizada por neutrófilos e macrófagos. Esta pode ser definida como um processo ativo de englobamento de partículas grandes ($>0,5 \mu\text{m}$ de diâmetro) dependente de energia. A destruição microbiana ocorre em vesículas formadas na fagocitose, e dessa maneira, os mecanismos de destruição, que poderiam lesionar o fagócito, são isolados do restante da célula (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

A primeira etapa da fagocitose é o reconhecimento do micro-organismo pelo fagócito, este reconhecimento ocorre devido aos macrófagos expressarem receptores que reconhecem especificamente os micro-organismos. Alguns desses receptores são de reconhecimento padrão, incluindo lectinas tipo C e receptores *scavengers*. Os receptores de reconhecimento padrão podem contribuir para a fagocitose somente de organismos que expressam padrões moleculares particulares (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Estes reconhecem especificamente unidades de carboidratos, às quais se ligam, permitindo assim a internalização de glicoproteínas terminadas em manose, L-fucose e N-acetilglucosamina (SHEPHERD et al., 1981). O receptor para manose não é

expresso em monócitos circulantes. Em macrófagos a sua expressão é regulada, os glicocorticóides aumentam sua expressão, enquanto que o interferon gama (IFN- γ) diminui (STAHL et al., 1984).

Outro grupo de receptores nos fagócitos reconhece certas proteínas do hospedeiro que revestem micro-organismos. Essas proteínas são chamadas de opsoninas, e incluem anticorpos, proteínas do complemento e lectinas. Denomina-se de opsonização o processo de revestir um micro-organismo para torná-lo um alvo para a fagocitose (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Um dos métodos mais eficientes para opsonizar micro-organismos é revesti-los com anticorpos. Os anticorpos possuem locais de ligação de antígeno em uma extremidade, e a outra extremidade, chamada região Fc, interage com as células efectoras e moléculas do sistema imunológico natural. Os fagócitos expressam receptores de alta afinidade para Fc chamados Fc γ RI específicos para um tipo de anticorpo chamado IgG. Assim, se um indivíduo responder a uma infecção produzindo anticorpos IgG contra antígenos microbianos, as moléculas IgG se ligam a esses antígenos, as extremidades Fc dos anticorpos ligados podem interagir com Fc γ RI nos fagócitos, e o resultado final é a fagocitose eficiente dos micro-organismos. Sendo que podem ser produzidos muitos anticorpos diferentes que ligam muitos produtos microbianos diferentes, a opsonização mediada por anticorpo contribui para a fagocitose de uma variedade maior de micro-organismos do que os receptores de reconhecimento padrão. Os anticorpos IgG são essenciais para a fagocitose eficiente de muitos organismos, entretanto, eles são na realidade um produto do sistema imunológico adquirido (linfócitos B) que emprega células efectoras do sistema imunológico natural

(fagócitos) para executar suas funções protetoras (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Quando o micro-organismo ou partícula se ligar a receptores em um macrófago, a membrana plasmática na região dos receptores começa a se redistribuir e estende uma projeção em forma de concavidade em torno do micro-organismo. Por conseguinte, a concavidade de membrana protrusa se estende além do diâmetro da partícula, o topo da concavidade se fecha por cima (*zip up*) e destaca o interior da concavidade para formar uma vesícula intracelular (fagossomo) “com o lado de dentro para fora”. Esta vesícula contém a partícula estranha ingerida, e se afasta da membrana plasmática. Os receptores da superfície celular também fornecem sinais ativadores que estimulam as atividades microbidas dos fagócitos. O antígeno fagocitado é destruído e, ao mesmo tempo, peptídeos são gerados a partir das proteínas microbianas e apresentados aos linfócitos T para iniciarem respostas imunes adquiridas (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Diversos receptores que reconhecem micro-organismos, tais como os TLR, os receptores acoplados a proteína G, os receptores Fc e C3 e os receptores de citocinas, principalmente IFN- γ , atuam cooperativamente para ativar os fagócitos a destruírem os micro-organismos ingeridos. Os fagossomos então se fundem com os lisossomos, resultando na formação de fagolisossomos, onde os mecanismos microbidas são concentrados. Os macrófagos ativados produzem diversas enzimas proteolíticas nos fagolisossomos, os quais funcionam para destruir micro-organismos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Além disso, para eliminar essas partículas ingeridas, eles produzem espécies reativas de oxigênio

(ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) (KARNOVSKI; LAZDINS, 1978; NATHAN, 1985; FADOK et al., 1993; MARCINKIEWICZ, 1997; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

2.2.2 Produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio pelos macrófagos

Os macrófagos convertem o oxigênio molecular em ERO, os quais são altamente reativos na oxidação de agentes que destroem os micro-organismos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). A geração de radicais livres ocorre principalmente através do sistema da nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidases. As NADPH oxidases constituem um grupo de enzimas transmembrana presentes nos fagócitos, que catalisam a transferência de elétrons através da membrana celular (BABIOR, 1999; BEDARD; KRAUSE, 2007).

As NADPH oxidases são constituídas por componentes citosólicos e por uma flavoproteína ligada à membrana de vesículas secretoras que, sob estímulo, se fundem à membrana plasmática. Nos fagócitos as NADPH oxidases encontram-se normalmente inativas, porém, quando estas células são estimuladas com agentes apropriados, ocorre a translocação de proteínas fosforiladas para a membrana, onde se associam com o citocromo b_{558} , formando a NADPH oxidase ativa (YAMAGUCHI; KANEDA, 1988; JOHANSSON et al., 1995; PARK et al., 1992; PARK; BABIOR, 1992; BABIOR, 1992; SEGAL; ABO, 1993). A agregação do complexo NADPH oxidase permite o início da transferência eletrônica, a partir do substrato (NADPH), para o oxigênio molecular,

gerando ânion superóxido e em seguida, outras ERO. Ao mesmo tempo, todo o complexo é levado para a membrana celular, através da fusão dos grânulos com a membrana. Esta fusão leva à liberação de ERO também para o meio extracelular (BABIOR, 1999).

As ERO, que podem ser divididas em: radicais livres de oxigênio, sendo estas espécies altamente instáveis e de vida curta, como o superóxido ($O_2^{\bullet-}$), oxigênio singlete (1O_2) e radical hidroxila ($OH^{\bullet}$) e radicais mais estáveis e oxidantes não-radicalares como ácido hipocloroso (HOCl), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ozônio (O_3) (BABIOR, 1999; QUINN; AMMONS; DELEO, 2006).

Este mecanismo pelo qual as ERO são produzidas é denominado de explosão respiratória (*burst* respiratório) (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Os produtos do *burst* respiratório destroem os patógenos fagocitados ou presentes no meio extracelular (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Além das ERO, os macrófagos também produzem espécies reativas de nitrogênio (ERN). Dentre os intermediários reativos do nitrogênio, destaca-se o NO, produzido pela ação de uma enzima chamada óxido nítrico sintase induzida (iNOS). A iNOS é uma enzima citosólica que está ausente em macrófagos em repouso, mas pode ser induzida em resposta a outros produtos microbianos que ativam os TLR, especialmente em combinação com IFN- γ . A iNOS catalisa a conversão de arginina em citrulina, e o gás de NO é liberado. Existem evidências de que o NF-kB o fator de transcrição envolvido na expressão do gene da iNOS (GRISCAVAGE; WILK; IGNARRO, 1996). Nos fagolisossomos, os radicais NO e $O_2^{\bullet-}$ reagem para formar peroxinitrito (ONOO $^-$). Desta forma, ERO e NO podem agir sinergisticamente causando citotoxicidade, pois o peroxinitrito é um poderoso

oxidante capaz de nitrar proteína, enfraquecendo, desse modo, a atividade de diferentes enzimas mitocondriais, levando a uma diminuição nos níveis de energia (CADENAS; CADENAS, 2002).

O NO é uma molécula que desempenha um papel fundamental na patogênese da inflamação e é considerado como um mediador pró-inflamatório (DIA; BERHOW; MEJIA, 2008). iNOS é expressa e continuamente ativa durante inflamações, onde está envolvida a defesa do hospedeiro contra patógenos (CADENAS; CADENAS, 2002). O aumento na transcrição do gene para esta forma da enzima é observado em resposta a diferentes estímulos, como citocinas (por exemplo, IL-1, IFN- γ , TNF- α), bactérias, ou produtos bacterianos (por exemplo, LPS) (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1994; JAMES, 1995), desta forma a iNOS tende a produzir altas concentrações de NO na célula (CADENAS; CADENAS, 2002). Além disso têm sido demonstrado que o NO desempenha um papel importante na inflamação associada a carcinogênese pela modificação direta do DNA e inativação das enzimas de reparo do DNA (DIA; BERHOW; MEJIA, 2008).

O NO produzido por macrófagos está envolvido na ação citotóxica exercida por estas células, para certos micro-organismos e células tumorais (PRINCE; GUNSON, 1993; COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1994; MONCADA; PALMER; HIGGS, 1994; MAYER; HEMMENS, 1997). Outras ações descritas para o NO incluem ainda a proteção contra os danos sistêmicos induzidos por citocinas, assim como a inibição da adesão e migração de leucócitos através do endotélio vascular da camada celular endotelial (KUBES; KUROSE; GRANGER, 1994). Porém, a produção descontrolada de NO pode levar a uma resposta maciça

tóxica, implicada em uma série de doenças inflamatórias (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1994; ZHUANG; WOGAN, 1997).

Nesse sentido, a ativação dos macrófagos lhes permite, entre outras funções, adquirir uma grande capacidade de eliminar micro-organismos e algumas células tumorais, principalmente devido a produção de espécies reativas do oxigênio, como também de nitrogênio (WOOD; AUSTYN, 1993). No entanto, os produtos microbicidas destas células não distinguem entre tecidos próprios e micro-organismos, sendo assim, se esses produtos entram no ambiente extracelular, eles são capazes de causar lesão tecidual (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

ERO e ERN são consideradas moléculas tóxicas, especialmente quando sob forma de RL. Aos efeitos nocivos das reações de oxidação induzidas pelos RL e capazes de lesar as estruturas dos sistemas biológicos, dá-se o nome de estresse oxidativo (LEITE; SARNI, 2003).

2.2.3 Estresse oxidativo

O estresse oxidativo pode ser benéfico nos casos de infecção, quando ocorre produção de RL por células fagocitárias para eliminar micro-organismos invasores. No entanto, passa a ser prejudicial quando a inflamação se torna sistêmica, como na sepse, em que a perda de controle da produção de RL pode causar lesão. Esta condição pode ser resultado do excesso na produção oxidante ou da depleção das defesas antioxidantes (LEITE; SARNI, 2003).

ERO podem facilmente reagir com macromoléculas incluindo lipídios, proteínas e DNA (CADENAS; CADENAS, 2002). Todos os componentes celulares são suscetíveis à ação das ERO, porém a membrana é um dos mais atingidos em decorrência da peroxidação lipídica, que acarreta alterações na estrutura e na permeabilidade das membranas celulares (FERREIRA; MATSUBARA, 1997), altera a fluidez destas e leva a perda da integridade celular (CADENAS; CADENAS, 2002). Conseqüentemente, há perda da seletividade na troca iônica e liberação do conteúdo de organelas, como as enzimas hidrolíticas dos lisossomas, e formação de produtos citotóxicos (como o malonaldeído), culminando com a morte celular (HERSHKO, 1989). A lipoperoxidação também pode estar associada aos mecanismos de envelhecimento, de câncer e à exacerbação da toxicidade de xenobióticos (SHAN; AW; JONES, 1990).

Os RL de oxigênio em situações fisiológicas de desequilíbrio oxidativo podem produzir graves alterações no DNA (ROCHE; ALVIRA, 1996). Essas lesões podem ocorrer devido à oxidação direta dos ácidos nucléicos ou, muitas vezes, podem levar à formação de quebras em uma das cadeias do DNA ou quebras simples em posições aproximadamente simétricas nas duas cadeias do DNA. Além disso, quebras simples podem gerar quebras duplas durante a replicação celular. Mais de vinte diferentes tipos de danos nas bases do DNA foram identificados após a exposição dessa biomolécula às diversas formas de estresses oxidativos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Quando o tipo e a quantidade de danos superam a capacidade de reparo das células, estes podem levar as células à morte, ou resultarem na incorporação de mutações no genoma, sendo transmitidas para as gerações futuras. Mais ainda, essas mutações podem

provocar efeitos genotóxicos severos e, conseqüentemente, gerar instabilidade genômica e até aparecimento de câncer (BERRA; MENCK; MASCIO, 2006).

Nos aminoácidos, espécies radicalares podem reagir na cadeia lateral, onde atacam preferencialmente cisteína, histidina, triptofano, metionina e fenilalanina, e, em menores proporções, arginina e asparagina. Os ataques aos aminoácidos que compõem as proteínas podem gerar danos como clivagens de ligações com ou sem geração de fragmentos e ligações cruzadas, o que pode ter como conseqüência perda de atividade enzimática, dificuldades no transporte ativo através das membranas celulares, citólise e morte celular (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Além de seu efeito geral citotóxico, os RL atuam como mensageiros das vias de sinalização intracelular das células inflamatórias. Um exemplo é a ativação do NF- κ B, induzida pelo peróxido de hidrogênio e bloqueada por vários antioxidantes, incluindo a vitamina E. O NF- κ B é um fator central de transcrição, envolvido na regulação de numerosos genes pro-inflamatórios, incluindo muitas citocinas (TNF α , IL-1, IL-6, IL-8 e IL-2), fatores de crescimento hematopoiéticos, moléculas de adesão celular e a iNOS. Esse fator nuclear é considerado um importante mediador no sinal de transdução para endotoxinas e atividade inflamatória induzida por citocinas (LEITE; SARNI, 2003).

O organismo se defende da agressão de ERO e dos danos celulares, utilizando diferentes mecanismos. Para proteger-se, a célula possui um sistema de defesa que pode atuar em duas linhas. Uma delas atua como detoxificadora do agente antes que ele cause lesão, esta linha é constituída por glutathiona reduzida (GSH), superóxido-dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathiona-peroxidase

(GSH-Px) e vitamina E. A outra linha de defesa tem a função de reparar a lesão ocorrida, sendo constituída pelo ácido ascórbico, pela glutathiona-redutase (GSH-Rd) e pela GSHPx, entre outros. Com exceção da vitamina E (α -tocoferol), que é um antioxidante estrutural da membrana, a maior parte dos agentes antioxidantes está no meio intracelular (ROSS; MOLDEUS, 1991; HEBBEL, 1986).

A SOD elimina o radical superóxido produzindo H_2O_2 (GARCIA, 2000). Desta forma a SOD previne a conversão do óxido nítrico em suas formas oxidativas, tais como o peroxinitrito ($ONOO^-$) (LEITE; SARNI, 2003), pois este é originado quando o NO combina-se com o radical superóxido (CADENAS; CADENAS, 2002). A CAT é uma hemoproteína citoplasmática que catalisa a redução do H_2O_2 a H_2O e O_2 (MAYES, 1990).

A GSH está presente na maioria das células e é o tiol (-SH) mais abundante no meio intracelular (MEISTER; ANDERSON, 1983). Sua capacidade redutora é determinada pelo grupamento -SH, presente na cisteína. A GSH pode ser considerada um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula (GALLEANO; PUNTARULO, 1995). Após exposição da GSH ao agente oxidante, ocorre sua oxidação a GSSG (HEBBEL, 1986). A recuperação da GSH é feita pela enzima GSH-Rd, uma etapa essencial para manter íntegro o sistema de proteção celular (GILBERT; MCLEAN, 1997). Habitualmente, a reserva intracelular de GSH-Rd é alta e somente uma grave deficiência desta enzima resultará em sinais clínicos (FRISCHER; AHMAD, 1987). A GSH-Rd é uma flavoproteína dependente da nicotinamida-adenina-dinucleotídeo-fosfato reduzida (NADPH) e, portanto, também dependente da integridade da via das pentoses (ROSS; MOLDEUS, 1991). A GSH-Px catalisa a

redução do peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e peróxidos orgânicos para seus correspondentes alcoóis às custas da conversão da GSH a GSSG (SHAN; AW; JONES, 1990). Embora a GSH-Px tenha ação fundamentalmente citosólica, *in vitro* ela é capaz de reduzir hidroperóxidos de membrana (HEBBEL, 1986). A GPX juntamente com a CAT são os principais varredores enzimáticos de EROs (LEITE; SARNI, 2003).

Existem ainda os antioxidantes não enzimáticos, estes derivam principalmente da dieta, como a mencionada vitamina E, além da vitamina C, coenzima Q, betacarotenos e o glutathione e seus precursores (GARCIA, 2000; LEITE; SARNI, 2003). Dentre os componentes da dieta com atividade antioxidante, podemos destacar os compostos fenólicos de fontes vegetais, estes apresentam significativa capacidade antioxidante e são associados à baixa incidência e baixa mortalidade de câncer em seres humanos (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKY, 2004). Dentre os flavonóides destacamos as isoflavonas encontradas no grão de soja, brotos de alfafa, sementes de linhaça, trevo vermelho e outros vegetais. Estes compostos apresentam as atividades antioxidantes, bactericida, antifúngica, anticarcinogênica, antiinflamatória, antimutagênica, antihipertensiva, antiviral, antiproliferativa, estrogênica e às vezes antiestrogênica (FERREIRA, 2002).

2.3 DIMORFISMO SEXUAL NA RESPOSTA IMUNE DE MACRÓFAGOS

O dimorfismo sexual no sistema imunológico de fêmeas e machos está bem estabelecido (TALAL, 1992; ANSAR-AHMED; PENHALE; TALAL, 1985). As

diferentes respostas imunes dependentes do sexo são geralmente atribuídas à influência de estrógenos, progesteronas e andrógenos, embora ainda têm-se pouca informação sobre os mecanismos de ação específicos de esteróides em células do sistema imunológico (EIDINGER; GARRETT, 1972; BUCKLEY; DORSEY, 1971).

Respostas imunes de fêmeas são mais efetivas do que em machos, como é mostrado pela mais rápida rejeição de aloenxertos, uma maior capacidade de regredir tumores e sua baixa incidência de certos tumores (MEISSNER; DIAMDOPOULOS, 1977). As fêmeas também têm em geral uma maior resistência a várias infecções bacterianas e virais, desta forma, as suas maiores capacidades imunológicas podem contribuir para a sua maior sobrevivência (WILLOUGHBY; WATSON, 1969; HAMILTON; HAMILTON; MESTLER, 1969). No entanto, estas características verificadas no sistema imune feminino podem estar ligadas a uma maior incidência de doenças autoimunes (ANSAR-AHMED; PENHALE; TALAL, 1985).

Os esteróides sexuais modulam as respostas imunes, sendo que os estrogênios parecem estimular as respostas imunes, enquanto os androgênios e a progesterona mostram um efeito oposto. Todavia os estrogênios ainda podem ser tanto imunoestimuladores (em baixas doses) como imunossupressores (em altas doses) (GROSSMAN; ROSSELE; MENDENHALL, 1994).

Em 1969 foi demonstrado pela primeira vez que o estrogênio aumenta a atividade fagocítica de macrófagos de camundongos, desde então um crescente número de artigos têm apoiado a idéia de que hormônios sexuais esteroidais têm potentes efeitos na funcionalidade de macrófagos (VERNON-ROBERTS, 1969).

Demonstrou-se também que o número de granulócitos humanos (células progenitoras de macrófagos) é aumentado pela concentração fisiológica de estrógenos (MAOZ et al., 1985; BARAK et al., 1986). Isto é bem observado durante a gravidez e em outros momentos em que ocorrem alterações nos níveis estrogênicos. Na gravidez o número de macrófagos humanos e sua capacidade fagocítica aumentam com crescentes concentrações de estrógeno (VERNON-ROBERTS, 1969). Em contrapartida, estudos demonstram que, neste período, ocorre supressão do sistema imune celular para prevenir a rejeição materna fetal (GROSSMAN, 1984). A progesterona tem efeito imunossupressor sobre o sistema imune celular e pode aumentar a atividade dos linfócitos supressores T (CD8). Em baixas concentrações, estimula a secreção de IL- α e TNF- α ; enquanto em níveis mais elevados, tem uma ação inibitória sobre a síntese e secreção destas citocinas. O papel supressivo da progesterona é evidenciado pelo conhecimento de que muitas doenças autoimunes, como a artrite reumatóide e a esclerose múltipla, podem melhorar com a gravidez e piorar depois do parto (JAIN et al., 2004).

Estudos revelam que níveis baixos de estrogênio, observados em animais castrados ou em mulheres após a menopausa, atenuam a resposta imune e predispõem o organismo à invasão microbiana e infecção (OLSEN; KOVACS, 1996; MEDEIROS; OLIVEIRA; YAMAMOTO, 2003). Têm-se observado que mulheres na pós-menopausa têm menor número de células secretoras de citocinas do que na pré-menopausa, entretanto a perda da função ovariana com a menopausa está associada ao aumento dos marcadores séricos pró-inflamatórios (IL-1, IL-6, TNF- α , selectina-E, moléculas de adesão intracelular ICAM-1) e

hiperesponsividade das células do organismo a estas citocinas em consequência do aumento no número de receptores e co-fatores facilitadores da ação das citocinas (KELLER; ZHANG; YAO, 2001; VERTHELYI; KLINMAN, 2000). Na carência de estrógenos observou-se um aumento nas citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF- α e na atividade do fator estimulante de colônias secretadas pelos macrófagos granulócitos (GM-CSF) foi detectado em cultura de monócitos circulantes, macrófagos medulares e osteoblastos (YASUI et al., 2007).

Os esteróides sexuais podem regular o número de monócitos, sua produção de citocinas e a diferenciação destes em macrófagos, exercendo suas funções sobre o sistema imunológico por modificar a secreção das citocinas imunomoduladoras e regular a expressão de receptores na superfície celular (MEDEIROS; MAITELLI; NINCE, 2007).

A inibição da proliferação das células mononucleares do sangue periférico (PBMC) pode estar relacionada à ação dos estrogênios (PRABHALA et al., 1998). Especificamente o estradiol aumenta as concentrações de IgA e IgG nas secreções do útero, bem como estimula a expressão do mRNA do IFN- γ nos linfócitos e a expressão dos receptores desta citocina no endométrio (MEDEIROS; MAITELLI; NINCE, 2007).

A regulação do sistema imune pelos hormônios esteróides sexuais requer que as células deste sistema expressem receptores adequados (TALAL, 1992). Os receptores para diferentes hormônios diferem nos diversos tipos de células do sistema imunológico, tanto em número como na atividade destes receptores, sendo estes dependentes da ativação celular. Estas células podem ligar prolactina, hormônio de crescimento, corticosteróides, estradiol e testosterona

(MEDEIROS; MAITELLI; NINCE, 2007). Os receptores de estrogênio (RE) têm sido relatados em macrófagos de ratos e humanos (FRAZIER-JESSEN; KOVACS, 1995).

Os RE apresentam-se sob duas principais isoformas, alfa (RE α) e beta (RE β), as quais são codificadas por diferentes genes (DIEZ-PERES, 2006). RE são receptores ligantes dependentes, ou seja, para sua efetiva ativação e função necessitam interagir com o hormônio (estrogênio) ou outras moléculas ligantes, os moduladores seletivos do receptor de estrogênio (SERM). A ligação do hormônio ou dos SERM com o RE pode conduzir a respostas celulares distintas que ocorrem por diferentes vias de sinalização, a genômica e a não genômica (SIMONCINI; GENAZZANI; LIAO, 2002). Quanto à via de sinalização genômica, sabe-se que a função dos RE é de fatores de transcrição ligante dependente, onde RE modulam a expressão de genes pela ligação com elemento responsivo ao RE, o ERE (do inglês “Estrogen Response Element”). Cumpre ressaltar que a resposta da ativação do receptor pelo estrogênio difere da ativação induzida pelos SERM, pois estudos mostraram que seqüências consenso (ERE) são reconhecidas em genes diferentes resultando em efeitos agonistas e antagonistas descritos para o receptor (DIEZ-PERES, 2006). A via de sinalização não genômica caracteriza-se pela resposta rápida, cujo mecanismo ainda não está elucidado, mas que possivelmente envolve a regulação da MAK cinase e ERK/AKT (HO; LIAO, 2002).

Muitos compostos de diversos grupos químicos podem ativar o RE, e hoje mais de setenta moléculas já foram descritas como pertencentes ao grupo dos SERM, dentre as quais incluem-se os fitoestrógenos (DIEZ-PERES, 2006).

2.4 FITOESTRÓGENOS DA SOJA

A ação estrogênica e antiestrogênica de algumas substâncias derivadas de plantas é conhecida há algumas décadas e, por esta razão, são denominadas de fitoestrógenos (FE). Historicamente, estas plantas foram utilizadas por povos das civilizações antigas. O pomegranato (*Punica granatum*) era o símbolo de imortalidade, fertilidade e amor na religião Oriental, na mitologia grega e judaica esta substância apresentava poderes lendários. No Antigo Egito, o pólen do grão da planta *Phonix dactylifera* era usado para induzir a fertilidade nas mulheres (HAN et al., 2002).

Os FE são compostos de origem vegetal que atuam de forma similar aos estrogênios endógenos, são substâncias vegetais estrutural e funcionalmente semelhantes ao estradiol (KNIGHT; EDEN, 1996). Há um interesse crescente no uso dos estrógenos vegetais, particularmente daqueles encontrados em produtos de soja, como uma alternativa potencial na terapia de reposição hormonal. Estudos demonstram uma menor incidência de sintomas da menopausa em mulheres asiáticas devido a sua dieta rica em soja. Além disso, uma alta ingestão de FE está associada com uma menor incidência de câncer de mama (AN et al., 2001). Muitos são os mecanismos pelos quais os FE podem desempenhar ação quimiopreventiva, incluindo propriedades antiproliferativas, modulação de enzimas envolvidas na esteroidogênese e proteínas de ligação, indução da apoptose (VOGEL et al., 2006), atividade antioxidante (RUFER; KULLING, 2006), inibição às enzimas tirosina quinase e DNA topoisomerase II, envolvidas no controle do

crescimento celular (THAM, 1998) e afinidade com os receptores de estrogênio (KOSTELAC; RECHKEMMER; BRIVIBA, 2003).

Os três maiores grupos de FE encontrados são: flavonas, isoflavonas e cumestranos, sendo o poder estrogênico destas substâncias variável (HAN et al., 2002). As isoflavonas estão presentes principalmente em produtos à base de soja, mas também em outros grãos como na ervilha verde, lentilha, legumes, feijão e seus derivados (LIGGINS et al., 2000).

As isoflavonas são compostos polifenólicos não esteroidais e podem ser encontradas na soja principalmente nas formas de β -glicosídeos conjugados: genistina, daidzina, glicitina, acetil daidzina, acetil glicitina, acetil genistina, malonil daidzina, malonil glicitina e malonil genistina; e sob a forma de agliconas: genisteína, daidzeína e gliciteína (KUDOU et al., 1991; BARRET, 2006; LAMPE, 2009).

A soja é particularmente rica nas isoflavonas genisteína e a daidzeína (NAKAYA; TACHIBANA; YAMADA, 2005). Após o processamento de um grão de soja, a quantidade de isoflavonas é de aproximadamente 2.661 $\mu\text{g/g}$, dos quais 53,58% seriam genisteína, e 35,36% de daidzeína (SAKAI; KOGISO, 2008).

As isoflavonas juntamente com as chalconas, flavanonas, flavanonóis, flavonas, flavonóis, flavan-3-ols e antocianidinas são as subclasses de um grupo denominado de flavonóides (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009). Os flavonóides são compostos polifenólicos que são amplamente encontrados no reino vegetal. Como componentes intrínsecos das frutas, legumes e bebidas, muitos dos 4.000 diferentes flavonóides conhecidos são parte da dieta humana regular. Os flavonóides são compostos de dois anéis aromáticos ligados por três

átomos de carbono que formam um heterociclo oxigenado. Variações sobre estruturas básicas dos flavonóides produzem diferentes classes de flavonóides (Figura 1). Estas variações estruturais podem explicar as diferenças observadas na bioatividade destes compostos (COMALADA et al., 2006).

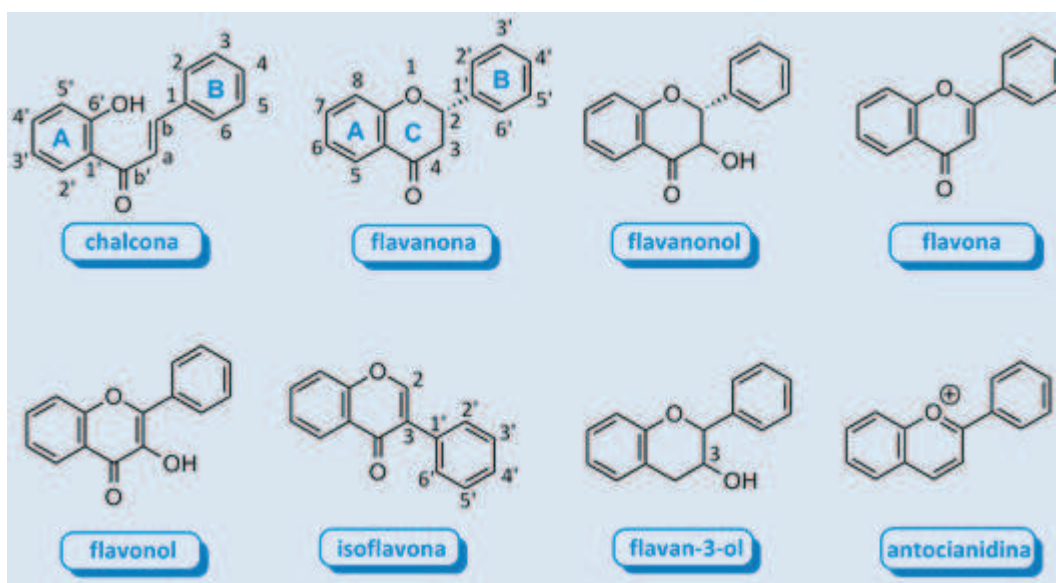


Figura 1 - Variações das estruturas básicas dos flavonóides.
Fonte: COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009.

Os flavonóides possuem várias atividades biológicas e farmacológicas, incluindo propriedades antioxidantes, antitumorais, antiangiogênicas, antiinflamatórias, antialérgicas e antivirais. Destas atividades biológicas, a capacidade antiinflamatória dos flavonóides tem sido muito utilizada na medicina chinesa e nas indústrias de cosméticos como extratos vegetais brutos, bem como, alguns flavonóides têm sido utilizados para inibir a inflamação crônica em vários modelos experimentais em animais. Assim, os flavonóides podem ser considerados promissoras drogas antiinflamatórias (COMALADA et al., 2006).

2.4.1 A atividade estrogênica das isoflavonas no sistema imune

O sistema imunológico é um alvo importante dos estrogênios, e os dados recentes indicam que um grupo de FE, as isoflavonas, podem produzir efeitos imunológicos (COOKE; SELVARAJ; YELLAYI, 2006). As isoflavonas exercem efeito sobre metabolismo de hormônios, nesse sentido estas assumem atividades estrogênicas, como prevenção da perda óssea e decréscimo do nível de lipoproteína de baixa densidade (KURZER, 2000; NAKAYA; TACHIBANA; YAMADA, 2005). Nessa classe, a genisteína e a daidzeína da soja são os mais consumidos na dieta (PERRY et al., 2007).

Devido à semelhança estrutural com o 17β -estradiol (Figura 2), as isoflavonas são capazes de se ligar a dois RE conhecidos, $RE\alpha$ e $RE\beta$ (AN et al., 2001).

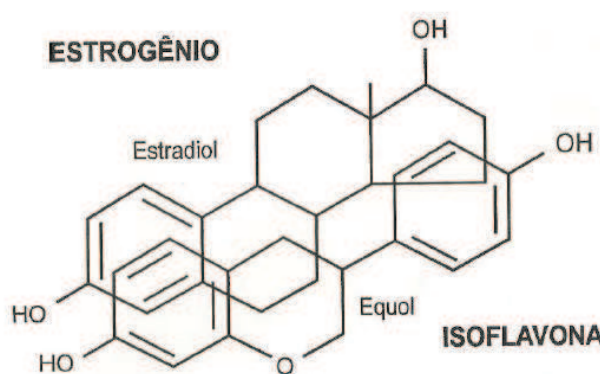


Figura 2 – Semelhança entre as estruturas químicas do estrogênio e da isoflavona.
Fonte: PIMENTEL; FRANCKI; GOLLÜCKE, 2005.

Entretanto, as isoflavonas têm maior afinidade com apenas um dos RE, e por isso, são consideradas estrógenos fracos. Devido a similaridade estrutural com o estradiol (Figura 3), a isoflavona genisteína se liga aos RE, levando a formação de complexos que são funcionalmente equivalentes àqueles formados pela ligação

do 17 β -estradiol aos seus receptores específicos (BARNES; SFAKIANOS; COWARD, 1996). Todavia, a resposta obtida com a genisteína, não é tão intensa quanto com o 17 β -estradiol, isto ocorre porque ela possui menor afinidade pelos RE, esta variação depende do tipo de receptor estrogênico (α ou β) presente no tecido ou órgão específico (KUIPER et al., 1998).

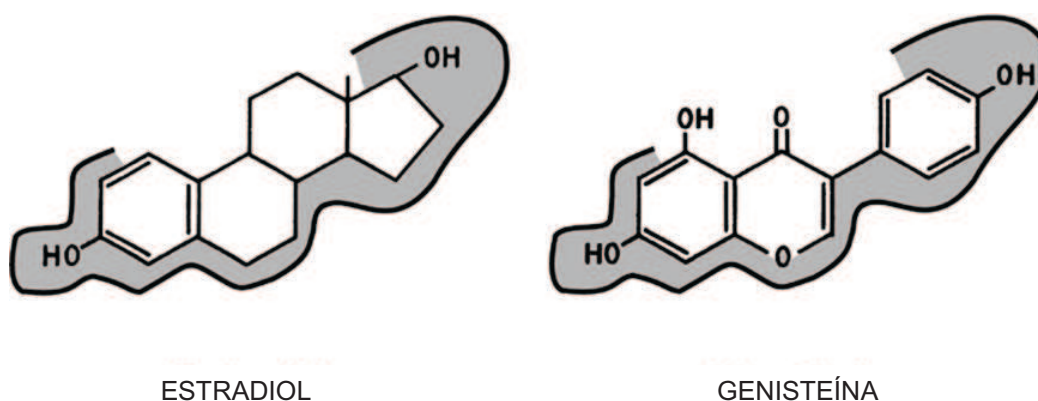


Figura 3- Semelhanças estruturais da isoflavona genisteína e do estradiol.
Fonte: DEMMIG-ADAMS; MCCAULEY, 2005.

A genisteína se liga com afinidade maior ao RE β , supõem-se assim que suas ações são mais marcantes naqueles órgãos e tecidos nos quais os receptores β predominam tais como SNC, ossos, parede vascular e trato urogenital (VALSSECCHI et al., 2008; KUIPER et al., 1998). Estudos demonstram que ela tem de sete a oito vezes menos afinidade com o RE α do que com RE β (KUIPER et al., 1997; AN et al., 2001).

A relativa seletividade da ligação da genisteína com RE β indica que as isoflavonas podem produzir diferentes efeitos clínicos em relação aos estrogênios (AN et al., 2001). As isoflavonas podem agir como agonistas, agonistas parciais ou antagonistas em relação ao estrógeno fisiológico. A potência e o efeito gerados variam de acordo com sua concentração tecidual, o tipo celular onde atuam, o tipo de receptor hormonal ao qual se liga e o estágio de diferenciação celular

(ÁLVAREZ et al., 2006; BARRET, 2006; YEB; CHANB; LEUNG, 2009). Além disso, podem ter ação supressora sobre a síntese estrogênica por ação inibitória sobre as enzimas aromatase e 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase tipo II (OLIVEIRA; ALDRIGHI; RINALDI, 2006).

Os macrófagos expressam RE (NALBANDIAN; KOVATS, 2005), e estudos têm demonstrado que o estrogênio os ativa, resultando em uma maior produção de IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, interferon gama (INF- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (MILLER; HUNT, 1996; DELOIA et al., 2002). Entretanto, tem sido relatado que os macrófagos e monócitos de humanos possuem maior expressão do RE α do que do RE β (VEGETO et al., 2004; MURPHY et al., 2009), o que poderia ocasionar diferentes efeitos das isoflavonas nos macrófagos quando comparados ao estradiol.

Os flavonóides apresentam atividades anti-inflamatórias e imunomoduladoras sobre os macrófagos (KIM et al., 1999). Vários flavonóides, por exemplo, são capazes de diminuir a produção de NO e a expressão da enzima iNOS em macrófagos RAW 264.7 (SANTANGELO et al., 2007). Sadowska-Krowicka et al. (1998) demonstraram a propriedade da isoflavona genisteína inibir a produção de NO induzida por LPS em macrófagos RAW 264.7. A inibição da atividade da iNOS ou a regulação da expressão de iNOS pode ser benéfica para reduzir a resposta inflamatória. Além disso, uma extensa literatura tem documentado que altas concentrações de genisteína são uma forma eficaz de inibir as proteínas tirosinas quinases, essas enzimas estão envolvidas em muitas vias de sinalização em vários tipos de células do sistema imunológico, tais como os macrófagos. No entanto, a genisteína inibe tirosinas quinases apenas em

concentrações suprafisiológicas, maiores do que as concentrações que podem ser obtidas através da dieta (COOKE; SELVARAJ; YELLAYI, 2006).

2.4.2 Efeito da genisteína em macrófagos

São escassos os dados disponíveis até o momento que esclareçam os efeitos da genisteína na funcionalidade dos macrófagos, sendo alguns destes representados na Tabela 1.

Tabela 1 – Efeito da genisteína em macrófagos.

FUNCIONALIDADE DOS MACRÓFAGOS	EFEITO	AUTORES
Atividade fagocítica	↓	Greenberg, Chang e Silverstein (1993) McGilvray et al. (2000)
Produção de NO	↓	Sadowska-Krowicka et al. (1998) Choi et al. (2003) Hämäläinen et al. (2007) Dia, Berhow e Mejia (2008)
	↑	Nakaya, Tachibana e Yamada (2005)
Produção de H₂O₂	↓	Kim et al. (2001)
Enzima proteína tirosina quinase	↓	Wei et al. (1998) Kim et al. (2001)
Ativação do NF-κB	↓	Choi et al. (2003) Hämäläinen et al. (2007)

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar os efeitos do fitoestrógeno genisteína na funcionalidade de macrófagos de ratos machos e de fêmeas em diestro ou em proestro.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Classificar as fêmeas de ratos quanto à fase do ciclo estral em diestro ou proestro.
- Caracterizar machos e fêmeas quanto à variação de peso corporal, parâmetros bioquímicos (glicose, colesterol e triglicerídeos) e concentração de 17 β -estradiol sérica.
- Verificar a toxicidade dos compostos genisteína, quercetina e 17 β -estradiol em macrófagos obtidos de machos e de fêmeas na presença e ausência de lipopolissacarídeos (LPS).
- Avaliar a funcionalidade de macrófagos, obtidos de ratos machos e fêmeas em diestro e proestro, tratados com genisteína, quercetina e 17 β -estradiol, quanto: a) capacidade fagocítica, b) produção de óxido nítrico basal e induzida por LPS, e c) produção de peróxido de hidrogênio induzida por LPS.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 REAGENTES

Os reagentes genisteína, quercetina, 17β -estradiol, Zimosan, lipopolissacarídeo (LPS) e MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide thiazolyl blue) foram obtidos da Sigma-Aldrich Chemical. O dimetilsulfóxido (DMSO) foi adquirido da Biotec. O meio de cultura RPMI 1640, soro fetal bovino, penicilina e estreptomicina foram adquiridos da Vitrocell. Os reagentes para determinação da glicose, colesterol e triglicerídeos foram adquiridos da Kovalent.

4.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL, OBTENÇÃO DO SORO E DOS MACRÓFAGOS

O modelo animal utilizado para o ensaio biológico foi ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus* var. *albinus*) machos e fêmeas de 110-130 dias fornecidos pelo Biotério da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG).

Os animais receberam ração (Purina) e água *ad libitum* e foram mantidos em ambiente com controle de temperatura (25°C) e com ciclo claro/escuro de 12 horas. Todos os procedimentos adotados seguiram as normativas de experimentação animal preconizada pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) que salienta aspectos de trato e uso humanitário com animais de laboratório, bem como

obtiveram aprovação da Comissão de Ética em Experimentação Animal da UEPG, registrado sob número 03511/2010.

A Tabela 1 mostra o delineamento experimental proposto para este trabalho, sendo que os animais foram divididos em três grupos de acordo com os critérios: a) o sexo do animal e b) fase do ciclo estral.

Tabela 2 - Delineamento experimental em função dos grupos.

GRUPO	SEXO	CICLO ESTRAL
G1 (n= 12)	Machos	—
G2 (n=11)	Fêmeas	Diestro (baixa concentração plasmática de estradiol)
G3 (n=14)	Fêmeas	Proestro (alta concentração plasmática de estradiol)

No dia anterior ao sacrifício dos animais, que foi realizado por decapitação, esses foram deixados em jejum por 12 horas e divididos em 2 caixas, sendo que uma caixa continha 3 ratos machos e 3 fêmeas, separados por uma grade, com o intuito de induzir as fêmeas à proestro por ferômonios. E a outra caixa, que foi mantida afastada dos machos, no laboratório ao lado, que continha 3 fêmeas.

Para a formação dos grupos foi realizado, no dia do experimento, o esfregaço vaginal das fêmeas, para identificação da fase do ciclo estral. Para tanto, as ratas foram imobilizadas e introduziu-se na vagina da rata um cotonete umedecido em solução fisiológica, coletando-se o material epitelial com movimentos rotatórios delicados. Posteriormente o material foi estendido sobre uma lâmina limpa, sendo

esse fixado com uma solução álcool éter (3:1) e corado com hematoxilina e eosina (HE). A identificação das fases do ciclo estral foi realizada por microscopia óptica de luz por comparação com imagens de laminário fornecido por Marcondes; Bianchi e Ttanno (2002).

A partir da formação dos grupos, os animais foram pesados em balança, para determinação de variação do peso corporal entre os grupos. As mensurações foram feitas em balança analítica digital da marca Marte AS 200c., sendo os animais posteriormente sacrificados.

4.2.1 Coleta do sangue, obtenção de soro e determinação dos parâmetros bioquímicos (glicose, colesterol e triglicerídeos) e concentração sérica do 17 β -estradiol

Os animais após decapitação foram vertidos rapidamente sobre funis acoplados a tubos de vidros, os quais foram deixados em repouso em temperatura ambiente por aproximadamente 3 horas para completa coagulação sanguínea. Para a obtenção do soro realizou-se a centrifugação a 600 g (centrífuga clínica da marca Bio Eng BE-4004). O soro foi colocado em tubos tipo *ependorf* e armazenados em freezer em temperatura de -20°C.

A partir do soro foram feitas determinações de glicose, colesterol total e triglicerídeos por métodos espectrofotométricos utilizando-se sistemas colorimétricos e enzimáticos. Os reagentes empregados foram adquiridos da KOVALENT[®] e as análises conduzidas conforme instruções dos fabricantes. A concentração sérica de

17 β -estradiol foi determinada por quimiluminescência, sendo essas amostras encaminhadas ao laboratório de análises clínicas Louis Pasteur, União da Vitória – PR.

4.2.2 Obtenção de macrófagos peritoneais

Os macrófagos foram obtidos por laparotomia mediana conforme descrito por Sampaio (2000), injetando-se 10 – 20 mL de PBS (Tampão salina fosfato: 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 8,0 mM Na₂HPO₄; 0,6 mM CaCl₂; 1 mM MgCl₂; 1,4 mM KHPO₄; e pH 7,4) estéril com antibiótico (10.000 U de penicilina e 10 mg de estreptomicina por litro) na cavidade peritoneal dos animais mortos e posteriormente aspirando-se todo líquido possível com auxílio de uma pipeta Pasteur de plástico.

A suspensão de células retirada do animal foi centrifugada para obtenção dos macrófagos. O precipitado foi então ressuspendido em 30 mL de solução de hemólise estéril e gelada, foram aguardados de 8-10 minutos com a amostra em gelo para a completa lise das hemácias, e após outra centrifugação, os macrófagos foram lavados duas vezes com PBS gelado e novamente centrifugados. Todas as centrifugações foram realizadas a 200 g, durante 8 minutos.

Após a última lavagem, os macrófagos foram ressuspendidos em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 2 mM de bicarbonato de sódio e 10 % de soro fetal bovino (SFB) e procedeu-se a contagem das células, que foi feita em câmara de Neubauer através da técnica de exclusão por Azul de Tripán. A concentração

celular foi ajustada para 4×10^6 células/mL também utilizando-se meio de cultura RPMI com 10% de SFB.

4.3 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DA GENISTEÍNA, QUERCETINA E 17β -ESTRADIOL

Para os ensaios de citotoxicidade os macrófagos foram semeados em placas de cultura de 96 poços na concentração de 4×10^5 células/poço e foram incubadas em estufa de atmosfera úmida, com CO_2 a 5%, para a adesão celular pelo período de 4 horas. Posteriormente os macrófagos foram tratados com: Genisteína (10 μM), quercetina (10 μM) ou 17β -estradiol (10 nM), na presença ou ausência de LPS (10 $\mu\text{g/mL}$) e incubadas novamente por 24 horas. Após este período de incubação, o sobrenadante da cultura foi descartado, e sobre as células foi adicionada uma solução diluída 1:10 de MTT (5mg/mL) em meio RPMI com 10% de SFB conforme descrito por MOSMANN et al. (1983). As células foram mantidas a 37°C por 30 minutos, e o sobrenadante novamente foi desprezado e então 200 μL de DMSO foram adicionados ao precipitado formado (formazan), resultado da redução do MTT.

A amostra foi homogeneizada e a cor do sobrenadante foi medida em espectrofotômetro a 550 nm. A viabilidade celular (%) foi calculada pela fórmula % viabilidade = (Abs média da amostra x 100) / Abs média do controle.

4.4 AVALIAÇÃO DA FUNCIONALIDADE DE MACRÓFAGOS

Para avaliação do efeito da genisteína sobre a funcionalidade de macrófagos de ratos machos e fêmeas, as células foram semeadas em placas de 24 ou 96 poços na concentração adequada para cada experimento (2 ou 4×10^5 células/poço). Após o cultivo a 37°C em estufa com atmosfera úmida e 5% de CO_2 por 4 horas, para a completa adesão celular, as culturas foram lavadas com PBS estéril e os tratamentos foram realizados pelo acréscimo de meio de cultivo fresco com duas diferentes concentrações ($5 \mu\text{M}$ e $10 \mu\text{M}$) não citotóxicas de genisteína (KIM et al., 2000). Estes tratamentos foram comparados com os controles de atividade antioxidante, a quercetina ($5 \mu\text{M}$ e $10 \mu\text{M}$) e de atividade estrogênica, o 17β -estradiol ($0,01$ e 10 nM), em concentrações fisiológicas (YOU et al., 2003), além do controle do veículo, o DMSO na concentração de $0,5\%$, concentração do solvente empregado para solubilização das maiores concentrações dos diferentes tratamentos utilizados neste trabalho. Todos os experimentos foram realizados na presença ou ausência de LPS solubilizado em PBS ($10 \mu\text{g/mL}$). Os tratamentos foram realizados por 24 horas, após este período de incubação os sobrenadantes das culturas foram colhidos para a determinação da produção de óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

4.4.1 Determinação da produção de NO

A produção basal de NO e a induzida por lipolissacarídeo (LPS) foi determinada através da concentração de nitrito (NO_2) no sobrenadante do cultivo de

células, utilizando-se reagente de Griess, o qual foi adicionado na proporção de 1:1 (v/v) com sobrenadante das culturas, procedendo-se posteriormente a leitura a 550 nm em espectrofotômetro. Os valores de leitura foram comparados a uma curva padrão de NaNO_2 , e os resultados obtidos em μM de nitrito liberado por 4×10^5 células foram expressos em porcentagem de produção de NO de dados normalizados pelo controle/DMSO (SAMPAIO, 2000), através da fórmula: (valor do NO produzido x 100) / valor médio produzido pelo controle/DMSO.

4.4.2 Determinação da produção de H_2O_2

A determinação da produção de H_2O_2 foi realizada por espectrofotometria usando a técnica de *xlenol orange*, conforme descrito por Fabiani et al. (2009). Para realização desta técnica o sobrenadante do cultivo dos macrófagos tratados (20 μl) foi coletado em uma nova placa onde adicionou-se 200 μL de solução de cor que continha 1mL do reagente 1 (25 mM de sulfato de amônio ferroso e 2,5 M de Ácido Sulfúrico) e 100 mL do reagente 2 (100 mM de sorbitol e 125 μM de *xlenol orange*) sendo a absorbância determinada a 546 nm.

Os valores de leitura foram comparados com a curva padrão de H_2O_2 e os resultados em μM de H_2O_2 liberado por 4×10^5 células foram expressos em porcentagem de produção de H_2O_2 de dados normalizados pelo controle/DMSO, através da fórmula: (valor do H_2O_2 produzido x 100) / valor médio produzido pelo controle/DMSO.

4.4.3 Ensaio de fagocitose

Para o ensaio de fagocitose foram semeados sobre as lamínulas de vidro 2×10^5 células/lamínulas em placas de 24 poços. Estas foram incubadas a 37°C em estufa com atmosfera úmida e 5% com CO₂ por 4 horas, para completa adesão celular. Após este período de incubação, os macrófagos foram tratados com: Genisteína (5 e 10 µM), quercetina (5 e 10 µM) e 17β-estradiol (0,01 e 10 nM) pelo período de 2 horas em estufa.

Para o ensaio de avaliação da capacidade fagocítica propriamente dito, o meio de cultivo dos diferentes tratamentos foi retirado e sobre os macrófagos aderidos às lamínulas foram adicionados meio fresco de cultivo acrescidos com uma suspensão de Zimosan opsonizadas ou não com soro de rato normal, sendo as culturas mantidas em temperatura ambiente pelo período de 1 hora.

Posteriormente, as lamínulas foram lavadas com PBS e coradas com Rosenfeld (Corante May-Grünwald-Giemsa). A capacidade fagocítica foi avaliada por microscopia óptica, conforme descrito por Sampaio (2000), onde um total de 100 células por tratamento e em duplicata foi contado, sendo a porcentagem de células determinada pelo número de macrófagos que fagocitaram 3 ou mais partículas de Zimosan.

Cumprе ressaltar que para a opsonização, o Zimosan foi diluído com soro de rato normal na proporção de 1:1, e incubado a 37° C em banho maria, sob agitação constante. Após 30 minutos, o Zimosan já opsonizado foi centrifugado a 550 g por 15 minutos. O precipitado foi lavado com PBS por três vezes.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Utilizando o programa PRISMA Graph Pad 5.01, as comparações entre os tratamentos foram obtidas por teste de variância ANOVA e a diferença entre os grupos foi avaliada pelo pós-teste de Tukey e na comparação de dois grupos isolados empregou-se o teste t.

5 RESULTADOS

Os resultados estão organizados em um capítulo correspondente ao artigo científico:

Capítulo I – Comparação do Efeito da Genisteína na Produção de Óxido Nítrico, Peróxido de Hidrogênio e na Capacidade Fagocítica de Macrófagos Peritoneais de Ratos Machos e Fêmeas.

COMPARAÇÃO DO EFEITO DA GENISTEÍNA NA PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO, PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO E NA CAPACIDADE FAGOCÍTICA DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATOS MACHOS E FÊMEAS.

Camila Juraszeck, Josimar Mariano Borille, Carla Kanunfre

RESUMO

O fitoestrógeno genisteína é uma isoflavona encontrada em abundância na soja. Há um grande interesse em isoflavonas de soja como alternativa para estrogênios endógenos, não só em alterações hormonais (menopausa), como também em processos inflamatórios. A genisteína tem atividade estrogênica e pode se ligar aos receptores de estrogênio (RE). RE têm sido relatados em macrófagos de ratos e humanos, e em células de linhagem humana monocítica. De fato, os estrogênios modulam as respostas imunes, todavia existem evidências controversas, de que os estrogênios ora possuem ação pró-inflamatória, ora antiinflamatória. E apesar do dimorfismo sexual do sistema imunológico estar bem estabelecido, existem poucos estudos que elucidem o papel de compostos bioativos como a genisteína entre os sexos. Neste estudo, investigamos os efeitos da genisteína na funcionalidade de macrófagos de ratos, avaliando comparativamente machos e fêmeas em diferentes fases do ciclo estral. Para tanto previamente verificou-se a citotoxicidade deste composto empregando a técnica de redução do MTT. Na sequência os parâmetros funcionais de macrófagos avaliados foram: 1) Produção de óxido nítrico (NO) basal e induzida por LPS, 2) Produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) na presença de LPS, e 3) Capacidade fagocítica. Observou-se que a genisteína não é tóxica e inibiu significativamente a produção de NO basal e induzida por LPS em machos e em fêmeas em diestro, mas não inibiu a produção de NO nas fêmeas em proestro. A comparação do perfil de resposta da genisteína com quercetina (controle de atividade antioxidante) e 17β -estradiol (controle de atividade estrogênica), revela que a genisteína apresenta efeito de inibição da produção de NO intermediário em todos os grupos, sendo o controle quercetina o maior inibidor e o 17β -estradiol o menor. A produção de H_2O_2 foi inibida significativamente pelo tratamento genisteína em todos os grupos. Todavia a atividade fagocítica dos macrófagos não foi influenciada pelo tratamento com a genisteína. Nossos resultados são sugestivos de que a genisteína parece ter efeito mais efetivo na inibição de NO em condições com baixa concentração de hormônio, o que corrobora sua ação antiinflamatória quando empregada como fitoestrógeno na menopausa, por exemplo. Em células previamente moduladas pelo hormônio endógeno (estradiol), conforme mostrado também por outros pesquisadores, o efeito da genisteína é menos acentuado, e pode ser explicado por *downregulation* dos RE. Em conclusão podemos inferir, que para o emprego da genisteína deve se levar em consideração o sexo, e por conseguinte, a concentração sérica de 17β -estradiol.

Palavras-chaves: *dimorfismo sexual, 17β -estradiol, fêmeas, fitoestrógenos, genisteína, macrófagos.*

ABSTRACT

The phytoestrogen genistein is an isoflavone found in abundance in soybeans. There is a considerable interest in soy isoflavones as an alternative to endogenous estrogens, not just on hormonal changes (menopause), but also in inflammatory processes. Genistein has estrogenic activity and can bind to estrogen receptors (ER). ER have been reported in macrophages from mice and humans, and human monocytic cell line. In fact, estrogens modulate immune responses, however there are controversial evidences that estrogens sometimes have proinflammatory action, sometimes anti-inflammatory. And despite the sexual dimorphism of the immune system is well established, there are a few studies that elucidate the role of bioactive compounds such as genistein among the genders. We investigated the effects of genistein on mice macrophage functionality, comparatively evaluating males and females in different phases of the estrous cycle. For that reason the cytotoxicity of this compound was previously observed using the technique of reduction of MTT. The Following macrophage functional parameters were successively evaluated: 1) Production of nitric oxide (NO) basal and LPS-activated, 2) Production of hydrogen peroxide (H_2O_2) in the presence of LPS, and 3) Phagocytic capacity. It was observed that genistein is not toxic and significantly inhibited NO production induced by LPS at baseline and in both males and females in diestrus, but did not inhibit NO production in females in proestrus. The comparison of the response profile of genistein with quercetin (antioxidant activity control) and 17β -estradiol (estrogenic control) shows that genistein has an inhibition effect on NO intermediate production in all the groups, the quercetin control is the greatest inhibitor and 17β -estradiol is the lowest. The H_2O_2 production was significantly inhibited by genistein treatment in all groups. However, the phagocytic activity of macrophages was not affected by treatment with genistein. Our results suggest that genistein seems to have a more significant effect on NO inhibition in conditions with low hormone levels, which confirms its anti-inflammatory action when employed as a phytoestrogen menopause, for example. In cells previously modulated by endogenous hormone (17β -estradiol), as shown by other researchers, the effect of genistein is less pronounced, and can be explained by downregulation of ER. In conclusion we can infer that, the use of genistein should account for gender, and therefore, the serum concentration of 17β -estradiol.

Keywords: *17β -estradiol, females, genistein, macrophages, phytoestrogens, sexual dimorphism.*

1 INTRODUÇÃO

Fitoestrogênios (FE) são compostos de origem vegetal que atuam de forma similar aos estrogênios endógenos, pois são substâncias estrutural e funcionalmente semelhantes a esses (KNIGHT; EDEN, 1996). A ação estrogênica e antiestrogênica destas substâncias já é conhecida há algumas décadas (HAN et al., 2002).

Dos três maiores grupos de FE, flavonas, isoflavonas e cumestranos, (HAN et al., 2002), as isoflavonas são as mais encontrados nas dietas, presentes principalmente em produtos à base de soja (LIGGINS et al., 2000).

Existe um interesse crescente no uso das isoflavonas, como uma alternativa potencial na terapia de reposição hormonal (AN et al., 2001). A genisteína é considerada a isoflavona mais biologicamente ativa da soja (DIA, BERHOW; MEJIA, 2008).

As isoflavonas exercem efeito sobre o metabolismo de hormônios, e por conseguinte estas assumem atividades estrogênicas, como prevenção da perda óssea e decréscimo do nível de lipoproteína de baixa densidade (KURZER, 2000; NAKAYA; TACHIBANA; YAMADA, 2005).

Devido à semelhança estrutural com o 17β -estradiol, as isoflavonas são capazes de se ligar a dois RE conhecidos, o alfa e o beta ($RE\alpha$ e $RE\beta$). $RE\beta$ exibe maior afinidade com a isoflavona genisteína, enquanto o estradiol possui a mesma afinidade com $RE\alpha$ e $RE\beta$. A relativa seletividade da ligação do $RE\beta$ com a genisteína com indica que as isoflavonas podem produzir diferentes efeitos clínicos em relação aos estrogênios (AN et al., 2001).

Tecidos e células imunes expressam RE (COOKE; SELVARAJ; YELLAYI, 2006), sendo assim, respondem ao estrogênio e aos FE. A ativação de RE em macrófagos (NALBANDIAN; KOVATS, 2005), resulta em uma maior produção de IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, interferon gama (INF- γ) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (MILLER; HUNT, 1996; DELOIA et al., 2002).

A existência do dimorfismo sexual na resposta imune em humanos e animais é comprovada pelas observações de que fêmeas produzem reação imunológica humoral mais vigorosa, são mais resistentes a certas infecções, como infecções bacterianas, e sofrem uma maior incidência de doenças auto-imunes, em comparação com machos (ANSAR-AHMED; PENHALE; TALAL, 1985; BOUMAN; HEINEMAN; FAAS, 2005). De forma que os estrogênios parecem estimular as respostas imunes, enquanto os androgênios mostram um efeito oposto (GROSSMAN; ROSSELE; MENDENHALL, 1994).

Ainda não está claro o efeito das isoflavonas, como a genisteína, na funcionalidade de macrófagos, além disso, existem poucos estudos que relatem o efeito destes compostos entre os sexos. No entanto, uma ampla variedade de componentes estrogênicos estão presentes na dieta da população. Nesse sentido, é necessário investigar melhor os efeitos destes no sistema imune (NAKAYA; TACHIBANA; YAMADA, 2005).

O objetivo deste estudo foi comparar do efeito da genisteína na produção de óxido nítrico, peróxido de hidrogênio e na capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais de ratos machos e fêmeas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 REAGENTES

Genisteína, quercetina, 17 β -estradiol, Zimosan, lipolissacarídeo (LPS) e MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide thiazolyl blue) foram obtidos da Sigma- Aldrich Chemical . O dimetil sulfóxido (DMSO) foi adquirido da Biotec. O meio de cultura RPMI 1640, soro fetal bovino, penicilina e estreptomicina foram adquiridos da Vitrocell. Os reagentes para detecção da glicose, colesterol e triglicerídeos foram adquiridos da Kovalent.

2.2 GRUPOS EXPERIMENTAIS E OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus* var. *albinus*) machos e fêmeas de 110-130 dias fornecidos pelo biotério da Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG). Os animais foram divididos em três grupos de acordo com o sexo e a fase do ciclo estral (através da avaliação do material vaginal). Os animais foram pesados e posteriormente sacrificados por decapitação, e em seguida, realizou-se a coleta de sangue e de soro para posteriores dosagens de parâmetros bioquímicos e hormonais.

Para a obtenção de macrófagos foi realizada laparotomia mediana conforme descrito por Sampaio (2000), injetando-se 10–20 mL de PBS estéril com antibiótico (10.000 U de penicilina e 10 mg de estreptomicina por litro) na cavidade peritoneal dos animais e posteriormente aspirando-se todo líquido possível com auxílio de uma pipeta Pasteur de plástico. Os macrófagos foram

então ressuspensos em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com 2 mM de bicarbonato de sódio e 10 % de soro fetal bovino .

2.3 ENSAIO DE REDUÇÃO DO MTT- VIABILIDADE CELULAR

Para os ensaios de citotoxicidade dos compostos utilizados nos tratamentos, os macrófagos foram semeados em placas de cultura de 96 poços na concentração de 4×10^5 cel/poço e foram incubadas em estufa de atmosfera úmida de CO₂ a 5% para a adesão por 4 horas. Posteriormente os macrófagos foram tratados com: Genisteína (10 µM), quercetina (10 µM) e 17β-estradiol (10 nM), na presença ou ausência de LPS (10 µg / mL) e incubadas novamente por 24 horas. Após este período, sobre as células foi adicionada uma solução diluída 1:10 de MTT (5 mg/mL) em meio RPMI com 10% de SFB e a viabilidade celular foi determinada conforme descrito por Mosmann et al. (1983). As células foram mantidas a 37°C por 30 minutos, e o sobrenadante novamente foi desprezado e então 200 µL de DMSO foram adicionados ao precipitado de cor púrpura formado (formazan), resultado da redução do MTT. A amostra foi homogeneizada e a cor do sobrenadante foi medida em espectrofotômetro a 550 nm. A viabilidade celular (%) foi calculada pela fórmula $\% \text{ viabilidade} = (\text{Abs média da amostra} \times 100) / \text{Abs média do controle}$.

2.4 ENSAIO DA FUNCIONALIDADE DE MACRÓFAGOS

Para avaliação a funcionalidade de macrófagos, as células foram semeadas em placas de 24 ou 96 poços na concentração adequada para cada experimento (2 ou 4×10^5 células/poço). Após o cultivo de 4 horas, as células

foram tratadas com meio de cultivo fresco acrescidos de duas concentrações de genisteína (5 μM e 10 μM), sendo estes tratamentos comparados com os controles de atividade antioxidante, a quercetina (5 μM e 10 μM) e de atividade estrogênica, o 17 β -estradiol (0,01 e 10 ηM), além do controle do veículo, o DMSO na concentração final de (0,5%), na presença ou ausência de LPS (10 $\mu\text{g/mL}$), sendo as células incubadas novamente por 24 horas. Após este período de incubação os sobrenadantes das culturas foram colhidos para a determinação da produção de óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

2.4.1 Produção de NO

A produção de NO basal e a induzida por LPS foi determinada através da avaliação por espectrofotometria da concentração de nitrito (NO_2) no sobrenadante do cultivo de células tratadas, utilizando-se reagente de Griess. Os valores de leitura (550 nm) foram comparados a uma curva padrão de NaNO_2 , e os resultados obtidos em μM de nitrito liberado por 4×10^5 células e foram expressos em porcentagem após normalização dos dados (SAMPALHO, 2000).

2.4.2 Produção de H_2O_2

A determinação da produção de H_2O_2 foi realizada por espectrofotometria usando a técnica de *xlenol orange*, conforme descrito por Fabiani et al. (2009). Os valores de leitura (546 nm) foram comparados com a curva padrão de H_2O_2 e os resultados obtidos em μM de H_2O_2 liberado por 4×10^5 células, foram expressos em porcentagem após normalização dos dados.

2.4.3 Capacidade Fagocítica

Para o ensaio de fagocitose foram semeados sobre as lamínulas de vidro 2×10^5 macrófagos em placas de 24 poços. Após este período de incubação (4 horas), os macrófagos foram tratados conforme descrito no item 2.4 pelo período de 2 horas. A avaliação da capacidade fagocítica foi realizada pelo acréscimo de uma suspensão de Zimosan opsonizadas ou não com soro de rato normal, sendo as culturas mantidas em temperatura ambiente pelo período de 1 hora. Posteriormente, as lamínulas foram lavadas com PBS e coradas com Rosenfeld (Corante May-Grünwald-Giemsa). A capacidade fagocítica foi avaliada por microscopia óptica, conforme descrito por Sampaio (2000), onde um total de 100 células por tratamento e em duplicata foi contado, sendo a porcentagem de células determinada pelo número de macrófagos que fagocitaram 3 ou mais partículas de Zimosan.

2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Utilizando o programa PRISMA Graph Pad 5.01, as comparações entre os tratamentos foram obtidas por teste de variância ANOVA e a diferença entre os grupos avaliada pelo pós-teste de Tukey e a diferença entre os grupos foi avaliada pelo pós-teste de Tukey e na comparação de dois grupos isolados empregou-se o teste t.

3 RESULTADOS

3.1 VARIAÇÃO DO PESO CORPORAL E PARÂMETROS BIOQUÍMICOS ENTRE RATOS MACHOS E FÊMEAS EM DIESTRO E PROESTRO

Os machos apresentaram maior média de peso corporal em relação as fêmeas em diestro e proestro, que não diferiram de peso em relação a fase do ciclo estral. Como o esperado, um maior nível de 17β -estradiol foi obtido nas fêmeas em proestro (25,01 pg/mL). Para fêmeas em diestro, bem como para machos, a média de 17β -estradiol foi menor, sendo 11,11 pg/mL para diestro e 5,82 pg/mL para machos. Com relação aos demais parâmetros bioquímicos (glicose, colesterol e triglicerídeos), as médias obtidas foram similares entre os grupos (Tabela 1a).

3.2 CITOTOXICIDADE DA GENISTEÍNA, QUERCETINA E 17β -ESTRADIOL EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATOS MACHOS E FÊMEAS

Os compostos genisteína, quercetina e 17β -estradiol não foram tóxicos para os macrófagos de nenhum dos grupos testados (machos e fêmeas em proestro), visto que não houve diminuição significativa na viabilidade celular na presença e ausência de LPS. Todavia observou-se aumento na atividade de desidrogenases mitocondriais (Figura 1a e 2a).

3.3 EFEITO DA GENISTEÍNA, QUERCETINA E 17 β -ESTRADIOL NA FUNCIONALIDADE DE MACRÓFAGOS DE RATOS MACHOS E FÊMEAS

3.3.1 *Produção de NO basal e induzida por LPS*

Considerou-se produção de NO basal o óxido nítrico produzido por macrófagos quando estes não se encontram ativados. A produção de NO induzida por LPS foi significativamente maior em todos os grupos, quando comparada a produção de NO basal em macrófagos (Tabela 2a).

Na Figura 3a, está representada a porcentagem de produção de NO basal dos macrófagos de machos e de fêmeas, em diestro e proestro, respectivamente. A genisteína (10 μ M) inibiu significativamente a produção de NO basal de machos em cerca de 34% em relação ao controle. A quercetina (5 e 10 μ M) foi mais efetiva na inibição da produção de NO de ratos machos, com porcentagem de inibição de 36% e 41% respectivamente.

Nos macrófagos de fêmeas em diestro (Figura 3a), a produção de NO basal foi significativamente inibida pela genisteína (10 μ M) e quercetina (10 μ M), com valores de inibição correspondentes a 40% e 37%, respectivamente em relação ao controle.

Nos macrófagos obtidos das fêmeas em proestro (Figura 3a) apenas o tratamento quercetina (em menor e maior concentração) apresentou diminuição na produção de NO basal significativa em relação ao controle, com inibição de 24% e 34% respectivamente. Todavia o 17 β -estradiol, em ambas as concentrações, não alterou a produção de NO basal nos diferentes grupos.

Ao compararmos a porcentagem de inibição da produção de NO basal entre os grupos empregando o *teste t*, verificamos que a genisteína 10 μ M inibiu significativamente a produção de NO em machos e em fêmeas em diestro quando comparados as fêmeas em proestro ($p < 0,05$). Todavia, não observamos mesmo perfil de inibição quando a genisteína foi utilizada na menor concentração (5 μ M), pois entre os grupos houve apenas diferença significativa entre as fêmeas em diestro e as fêmeas em proestro ($p < 0,05$).

A porcentagem de produção de NO induzida por LPS está representada na Figura 4a. Em macrófagos obtidos de machos (Figura 4a) a porcentagem de produção de NO induzida foi inibida significativamente pelos tratamentos: Estradiol 0,01 e 10 η M (13% e 16%), genisteína 5 e 10 μ M (14% e 15%) e quercetina 10 μ M (15%), quando comparados ao controle.

Nos macrófagos das fêmeas em diestro (Figura 4a), a porcentagem de inibição da produção de NO induzida foi significativa apenas nos tratamentos genisteína (5 e 10 μ M) e quercetina (5 e 10 μ M), com os valores de inibição correspondentes respectivamente a 25%, 30%, 17% e 31%. Quando a produção de NO induzida por LPS foi comparada grupo a grupo pelo emprego do *teste t* observamos diferença significativa entre macrófagos de machos e fêmeas em diestro tratados com genisteína 10 μ M.

Ao analisar a produção de NO induzida nos macrófagos das fêmeas em proestro, observou-se que apenas quercetina 5 e 10 μ M inibiu significativamente a produção de NO em relação ao controle (20% e 24%, respectivamente) (Figura 4a).

3.3.2 Produção H_2O_2 induzida por LPS

Não foi possível detectar a produção basal de H_2O_2 por macrófagos de ratos de ambos os sexos, todavia em estado ativado (induzido por LPS) os macrófagos de ratos machos, fêmeas em diestro e proestro produziram baixas concentrações de peróxido de cerca de 4 - 6 μM H_2O_2 por 4×10^5 células.

Na Figura 5a observa-se que todos os tratamentos reduziram significativamente a produção de H_2O_2 nos macrófagos de ratos machos, com porcentagens de inibição correspondentes a: 29%, 27% e 26% nas maiores concentrações de 17 β -estradiol, genisteína e quercetina respectivamente.

Os macrófagos obtidos das fêmeas em diestro (Figura 5a) apresentaram inibição de 29%, 32% e 37% na produção de H_2O_2 nos tratamentos com genisteína (5 e 10 μM) e quercetina (10 μM), respectivamente.

A produção de H_2O_2 pelos macrófagos das fêmeas em proestro (Figura 5a) foi inibida significativamente pelos tratamentos estradiol 10 ηM , genisteína 5 e 10 μM e quercetina 5 μM , quando comparados ao controle, com os respectivos valores de inibição: 23%, 22%, 22% e 20%.

3.3.3 Efeito da genisteína sobre a capacidade fagocítica de macrófagos opsonizados e não opsonizados

O efeito da genisteína, do 17 β -estradiol e da quercetina, foram testados nos macrófagos desafiados a fagocitar partículas opsonizadas (Figura 6a), como também não-opsonizadas (Figura 7a). Os resultados mostram que os tratamentos não alteraram significativamente a atividade fagocítica dos macrófagos, quando estes são comparados ao controle em todos os grupos.

4 DISCUSSÃO

Neste estudo comparamos o efeito da isoflavona genisteína na funcionalidade de macrófagos de ratos machos, de fêmeas em diestro (baixo nível hormonal) e de fêmeas em proestro (alto nível hormonal).

Todos os animais utilizados neste estudo encontravam-se dentro dos valores de referência para os parâmetros bioquímicos analisados. Nossos resultados foram similares aos de Dantas et al. (2006), no entanto, pequenas variações podem ser atribuídas a vários fatores como: ambiente, peso corporal, características genéticas, faixa etária, entre outros. Dantas et al. (2006) em um estudo sobre parâmetros fisiológicos e bioquímicos em ratos machos da linhagem Wistar, com peso corporal entre 200 e 220 gramas, avaliaram a glicemia (n=64) e obtiveram a média de 108 mg/dL. Ainda de acordo com Dantas et al. (2006), o valor médio encontrado para triglicerídeos (n=38) foi de 82 mg/dL e para colesterol total (n=51) a média foi de 87 mg/dL. Em nosso estudo, os machos obtiveram média de peso corporal de 271,7 gramas, enquanto as fêmeas apresentam médias de peso corporal menores (~193 gramas). Esses achados nos permitiram realizar os ensaios biológicos seguramente, pois é sabido que alterações bioquímicas podem interferir na resposta imune. Aksnes; Eide e Nordstrand (1996) e Lawton (1998) relataram que o excesso de lipídios provoca aumento da fagocitose pelos macrófagos alveolares e aumento de infecção pulmonar em animais. Os mesmos pesquisadores, ainda descreveram que com o aumento da disponibilidade de triglicérides, os macrófagos tendem a fagocitá-los, em detrimento a fagocitose de bactérias, além disso, aumento dos níveis de

glicose circulante também pode prejudicar o sistema imune, pois inibe a atividade de monócitos. Em pacientes com hiperglicemia foi observado que a aderência leucocitária, a quimiotaxia, a fagocitose, bem como o sistema antioxidante podem ser afetados (MUCHOVA; LIPTAKOVA; ORSZAGHOVA, 1999; GALLACHER et al., 1995; VALERIUS; EFF; HANSEN, 1982).

A dosagem de estradiol no soro dos animais confirmou o delineamento dos grupos, realizado previamente através da técnica do esfregaço vaginal. Assim, os experimentos foram realizados em macrófagos de animais com níveis hormonais distintos e bem característicos para cada grupo. Em um estudo realizado por Marcondes et al. (2001) com ratas da linhagem Wistar, as fêmeas em proestro apresentaram nível hormonal de aproximadamente 30 pg/mL, enquanto fêmeas em diestro apresentaram valor aproximado de 10 pg/mL. Resultados similares foram encontrados nesta pesquisa, com médias de 17 β -estradiol de: 25,01 pg/mL e 11,11 pg/mL, para fêmeas em proestro e diestro respectivamente. Para o grupo dos machos a concentração média de estradiol foi de 5,82 pg/mL.

Cumpramos ressaltar que ao utilizarmos células de animais (*ex vivo* e *in vitro*), estando estas programadas biologicamente por condições fisiológicas próprias do organismo, tais como a regulação prévia por hormônios esteroidais, as respostas imunes frente a diferentes desafios podem estar pré-moduladas. Assim, ao trabalharmos com machos e fêmeas em diferentes fases do ciclo estral, e sabendo da ação imunomoduladora dos hormônios esteroidais, podemos inferir que os macrófagos peritoneais de ratos, (machos, fêmeas em proestro e fêmeas em diestro), podem responder de maneiras distintas, exibindo funcionalidade e

metabolismo diferenciado, sendo este dimorfismo na resposta imune um dos principais focos deste estudo.

Inicialmente realizamos o teste para verificar o potencial tóxico dos compostos que seriam utilizados *in vitro* ao longo do estudo. Genisteína, 17 β -estradiol e quercetina não foram citotóxicos tanto para macrófagos peritoneais ativados por LPS, quanto para os macrófagos não ativados, pois não houve redução significativa da viabilidade celular. Nesse sentido, demonstramos que estes compostos nas concentrações testadas (Figura 1a e 2a) foram empregados nos tratamentos com segurança, pois não induzem morte celular. Dia; Berhow e Mejia (2008), testaram a genisteína em macrófagos de cultura RAW 264.7, em concentrações maiores (1-300 μ M), que as concentrações de genisteína utilizadas neste estudo (5 e 10 μ M), e verificaram que a genisteína não alterou a viabilidade celular.

No ensaio biológico de produção de NO, observou-se que a produção de NO basal foi menos acentuada em todos os grupos, quando comparada a produção de NO de macrófagos ativados por LPS (Tabela 2a). De fato, o LPS bacteriano é um potente ativador de macrófagos (STITES; TERR, 1992), e potente iniciador de processos inflamatórios. Os macrófagos também secretam em resposta ao LPS, uma ampla variedade de outros mediadores de resposta biológica, incluindo o óxido nítrico (RAETZ, 1990; COHEN, 2002). Estudos realizados por Choi et al. (2003), demonstram que macrófagos RAW 264.7 ativados por LPS apresentaram geração de NO significativamente mais elevada do que a produção basal, o que confirma nossos resultados.

Dentre os mecanismos moleculares envolvidos no desencadeamento da resposta inflamatória, destaca-se a via de sinalização do fator de transcrição nuclear *kappa* B (NF- κ B), o qual aumenta a expressão de diversos genes que codificam para proteínas envolvidas na resposta inflamatória, incluindo iNOS (FERRANTE, 2007). O LPS atua na estimulação de macrófagos por meio da sua ligação às proteínas CD14 e TLR4, que estão presentes na membrana plasmática e como consequência geram a ativação de moléculas envolvidas na transdução de sinal que permitem a liberação e a translocação do NF- κ B do citosol para o núcleo, o qual promove a ativação de genes que codificam para proteínas envolvidas na resposta inflamatória (BAUD; KARIN, 2009).

Acreditamos que a genisteína parece atuar nessa via de sinalização, por sua vez inibindo-a. Kundu e Surh (2004) relatam que flavonóides, podem interferir na via de sinalização do NF- κ B. Ainda Choi et al. (2003) verificaram que o tratamento genisteína com 50 μ M e 100 μ M inibem significativamente a ativação NF- κ B induzida por LPS em macrófagos de cultura RAW 264.7. Essa dupla sinalização nas células (LPS e genisteína) com efeitos contrários poderia justificar a inibição da produção de NO menos acentuada da genisteína na presença do LPS nos diferentes grupos. Portanto podemos inferir que a genisteína e a quercetina modulam negativamente a expressão de NO sintetase induzível, sendo esse um dos mecanismos pelo qual a genisteína pode atuar inibindo a produção de NO.

Atualmente sabe-se que as isoflavonas, tais como a genisteína, assumem atividades estrogênicas, sendo desta maneira, consideradas fitoestrogênios (KURZER, 2000; NAKAYA; TACHIBANA; YAMADA, 2005), o que deveria lhe

conferir perfil de resposta celular similar ao 17 β -estradiol na porcentagem de inibição de NO. Todavia, em nossos resultados, esta similaridade foi apenas observada nos macrófagos de machos ativados com LPS, onde os tratamentos com 17 β -estradiol ocasionaram diminuição significativa da produção de NO em relação ao controle. É provável que neste grupo a ação do 17 β -estradiol foi mais evidente devido a uma maior disponibilidade de RE, pois estudos demonstram ocorrer *downregulation* da expressão de RE α , em resposta a estrógenos (ALARID; BAKOPOULOS; SOLODIN, 1999). Desta forma, macrófagos de machos que não foram pré-modulados por estrógenos, não sofreram *downregulation* de RE.

Em machos também observamos mais claramente a ação antiinflamatória do 17 β -estradiol, embora na literatura usualmente seja evidenciada a relação do 17 β -estradiol com efeitos pró-inflamatórios (BAIN; ENGLAND, 1976; NORTHERN; RUTTER; PETERSON, 1994). No estroma uterino, diversos autores afirmam que o 17 β -estradiol estimula a proliferação das células epiteliais, aumenta a permeabilidade vascular, o edema e o recrutamento de macrófagos e eosinófilos. No entanto, sua propriedade antiinflamatória é corroborada por estudos tais como o realizado por Hayashi et al. (1998), em que foi demonstrado que concentrações fisiológicas de 17 β -estradiol podem atenuar a liberação de NO, bem como a expressão da iNOS em macrófagos J774 estimuladas por IFN- γ e LPS.

Todavia, cumpre ressaltar também que até o presente momento, o efeito do 17 β -estradiol *per se* na funcionalidade de macrófagos ainda não está claro, pois estudos neste sentido apresentam-se controversos, o que dificulta conferir o papel estrogênico para genisteína, sem efeito padrão de comparação definido.

Nakaya; Tachibana e Yamada, (2005), ao examinar o efeito do estradiol na produção de NO em macrófagos de cultura RAW 264.7, observaram que estradiol aumentou a produção de NO, sendo que este aumento foi dose-dependente. No entanto, Hayashi et al. (1998) e Savita (1998) demonstraram que estradiol inibe a produção de NO induzida por LPS e a expressão de iNOS em macrófagos. iNOS é induzida, em uma variedade de células, por endotoxinas, sendo essa isoenzima expressa continuamente durante as inflamações, estando envolvida na defesa do hospedeiro contra patógenos. A expressão de iNOS gera a produção de altas concentrações de NO na célula (CADENAS; CADENAS, 2002).

Esta resposta diferenciada da genisteína em relação ao 17β -estradiol, também poderia ser explicada pela ação estrogênica ou antiestrogênica que a genisteína pode assumir. Estas ações dos FE decorrem da sua interação com os RE (KONDO; NAKAJIMA; YAMAMOTO, 1990; SETCHELL et al., 1987). $RE\beta$ exibe maior afinidade com a genisteína, enquanto o estradiol possui a mesma afinidade com $RE\alpha$ e $RE\beta$. Vegeto et al. (2004), para melhor caracterizarem o mecanismo de ação do estrógeno nos macrófagos, verificaram a presença de RE em duas diferentes linhagens de células, e observaram que em uma dessas linhagens os macrófagos expressavam RNAm do $RE\alpha$. Murphy et al. (2009) relataram a expressão de RE em macrófagos e monócitos de humanos e demonstraram que o RNAm do $RE\alpha$ foi expresso em maiores concentrações que o RNAm do $RE\beta$, tanto em monócitos como em macrófagos diferenciados.

Desta forma, a relativa seletividade de ligação da genisteína ao $RE\beta$, indica que as isoflavonas podem produzir diferentes efeitos em relação aos estrogênios nos macrófagos. Segundo Han et al., (2002) as isoflavonas têm atividade

estrogênica fraca e, às vezes, antiestrogênica que dependerá do tipo celular, do nível de expressão dos receptores, presença de ligante endógeno (17 β -estradiol) e exógeno.

Neste estudo observamos que em macrófagos de machos e fêmeas em diestro o tratamento com genisteína 10 μ M inibe significativamente a produção de NO basal (Figura 3a), e os tratamentos com genisteína 5 e 10 μ M inibem significativamente a produção de NO induzida por LPS (Figura 4a), o que não foi observado nos macrófagos das fêmeas em proestro. Cumpre ressaltar, que machos e fêmeas em diestro apresentam baixos níveis de 17 β -estradiol, enquanto fêmeas em proestro apresentam altos níveis de 17 β -estradiol, conforme está mostrado na Tabela 1a. A comparação grupo a grupo revelou que a genisteína apenas na maior concentração (10 μ M) inibiu significativamente a produção de NO basal de macrófagos de machos e de fêmeas em diestro, quando comparados as fêmeas em proestro ($p < 0,05$).

Em relação a produção de NO, sabe-se que esta pode ser inibida ou estimulada por concentrações dependente da dose de estrogênio (MOHAN; JACOBSON, 1993; CHAO; VAN ALTEN; WALTER, 1994). Devido a sua fraca capacidade de ligação aos RE, a genisteína, podem agir como agonista, agonista parcial ou antagonista quando comparada ao estrógeno fisiológico (17 β -estradiol), conforme mencionado anteriormente. A potência e o efeito gerados variam de acordo com sua concentração tecidual, o tipo celular onde atuam, o tipo de receptor hormonal ao qual se ligam e o estágio de diferenciação celular (ÁLVAREZ et al., 2006; BARRET, 2006; YEB; CHANB; LEUNG, 2009). Face ao exposto, para fêmeas em proestro, podemos sugerir que os macrófagos obtidos

estariam pré-modulados pelo maior nível de 17β -estradiol, a que estavam expostos. Condição que poderia gerar *downregulation* do RE e por conseguinte da ação fitoestrogênica, sendo esta condição provavelmente a responsável pela diferença entre os grupos, macho, fêmea em diestro e fêmea em proestro, observada na inibição da produção de NO basal. Segundo Alarid; Bakopoulos e Solodin, (1999) a *downregulation* da expressão de $RE\alpha$, em resposta a estrógenos, ocorre sem alteração do RNAm e através de rápida proteólise, que pode ser um evento inicial (resposta a curto prazo) da ação estrogênica. Em estudos como o de Cotroneo et al. (2001), mostraram que os grupos tratados com genisteína e com benzoato de estradiol, apresentaram uma diminuição da expressão de $RE\alpha$ no útero. *Downregulation* foi também observado em glândulas mamárias de ratos tanto para $RE\alpha$ quanto para $RE\beta$ (HATSUMI; YAMAMURO, 2005). Desta forma, podemos inferir que as células de fêmeas em proestro, tratadas com genisteína, poderiam apresentar resposta reduzida ao composto por um menor número de receptores disponíveis. Todavia tal *downregulation* ainda não foi relatado para células do sistema imune.

Diferente do que foi observado neste estudo, Nakaya; Tachibana e Yamada (2005), observaram aumento na produção de NO de macrófagos (RAW 264.7) em tratamentos com genisteína. Isto poderia ser explicado pelas baixas concentrações de genisteína utilizadas por estes autores, sendo estas inferiores a $1\ \mu\text{M}$. No entanto, a resposta dose-dependente precisa ser considerada, pois Dia; Berhow e Mejia (2008) ao avaliarem o efeito da genisteína também em macrófagos (RAW 264.7) tratados com diferentes concentrações (1 a $300\ \mu\text{M}$) verificaram, primeiramente, aumento na produção de NO em baixas

concentrações de genisteína, que reduziu com o aumento da concentração a valores significativamente menores em relação ao controle. A redução da produção de NO dependente da concentração da genisteína também foi observada por Choi et al. (2003) em macrófagos RAW 264.7, esse autor classificou o efeito da genisteína como o de moléculas antioxidantes. De fato a isoflavona genisteína faz parte do grupo dos flavonóides e apresenta atividade antioxidante, desta forma, por esta sua propriedade, tem sido empregada no combate ao câncer (RUFER; KULLING, 2006).

O flavonóide quercetina apresentou perfil de atividade antioxidante e antiinflamatório em nosso estudo, inibindo a produção de NO em todos os grupos, todavia o efeito inibitório foi mais acentuado que os demais tratamentos. De fato, Mascolo et al. (1998) relataram testes com os flavonóides quercetina e kaempferol, nos quais esses comportaram-se como compostos antiinflamatórios, ou seja, inibiram a produção de NO. Outros estudos têm sido conduzidos com esta classe de flavonóide, onde a quercetina têm mostrado efeitos como antioxidante, com destaque na prevenção de câncer (LIMA; OLIVEIRA; NAGEM, 2003). Nossos resultados são sugestivos de que o efeito da quercetina nos macrófagos aparentemente não é pré-modulado pelo microambiente com diferentes concentrações de estradiol.

A produção de peróxido de hidrogênio em macrófagos não ativados não foi detectada. O peróxido de hidrogênio é formado principalmente na matriz mitocondrial pela redução do oxigênio, ou ainda pela dismutação do superóxido pela SOD (FRIDOVICH, 1998). Assim, quando antígenos se ligam aos receptores da superfície dos fagócitos, há um aumento no consumo de oxigênio, resultante

da ativação do complexo enzimático NADPH oxidase que catalisa a redução do oxigênio a superóxido tendo como doador de elétrons o NADPH. Em seguida, o superóxido pode ser convertido a peróxido de hidrogênio pela ação da SOD (KLEBANOFF, 1992; BEUTLER, 2004). Entretanto, em macrófagos não-ativados a NADPH oxidase está inativa e encontra-se na parte citosólica da célula, podendo ser ativada quando os macrófagos são estimulados por agentes tais como: LPS, ésteres de forbol (PMA), entre outros (MACMICKING, 2009). Em estado ativado, o complexo NADPH oxidase é transferido para a membrana plasmática onde se liga ao citocromo b558 para formar NADPH oxidase ativa (MA et al., 2005; SEGAL; ABO 1993; BABIOR, 1992). O que justifica o porquê não detectamos produção de peróxido de hidrogênio na ausência de LPS, pois nessa condição não há ativação da enzima NADPH oxidase, essencial no processo de formação do peróxido de hidrogênio.

O flavonóide genisteína (5 e 10 μM), inibiu significativamente a produção de peróxido de hidrogênio pelos macrófagos estimulados por LPS obtidos de ratos machos, fêmeas em diestro e fêmeas em proestro. Nesse sentido, em nossos resultados, não houve interferência de uma pré-modulação hormonal na ação inibitória da genisteína na produção de H_2O_2 .

Kim et al. (2001) em seu estudo realizado com macrófagos elicitados obtidos da cavidade peritoneal de fêmeas de camundongos, demonstraram que a produção de peróxido de hidrogênio foi atenuada pela genisteína, de forma dependente de concentração (1, 5, 10 e 20 μM). Em nosso trabalho não observamos inibição da produção de peróxido de hidrogênio dose-dependente provavelmente devido a pequena diferença de concentração entre os dois

tratamentos empregados (5 e 10 μM), sendo que no estudo de Kim a maior diferença de inibição foi observada entre as concentrações de 10 e 20 μM . A de se considerar ainda, que alguns flavonóides são capazes de se ligar a íons metálicos, impedindo-os de atuarem como catalisadores na produção de radicais livres, esta atividade é o resultado de um conjunto de propriedades tais como atividade sequestrante de radicais livres e inibição de enzimas produtoras de EROs, como a NADPH oxidase (HAVSTEEN, 2002; MUROTA; TERAOKA, 2003; DAS; ROSAZZA, 2006). Nesse sentido, Pincemail et al. (1987) mostraram em seus estudos que flavonóides seriam capazes de reduzir a produção de radicais superóxido, hidroxila e peróxido de hidrogênio via inibição da NADPH oxidase em fagócitos de humanos estimulados. O que sugere que o efeito da inibição da produção de H_2O_2 seja resultante da propriedade antioxidante da genisteína. Haja visto que também a quercetina inibiu a produção de H_2O_2 nos três grupos.

Em relação a capacidade fagocítica de macrófagos, estudos realizados por Hespanhol e Mantovani (2002), mostram que o desencadeamento da fagocitose é dependente da atividade da proteína tirosina quinase (PTK), e que a genisteína é considerada um inibidor específico desta proteína (WEI et al., 1998).

Greenberg; Chang e Silverstein (1993) trabalhando com macrófagos de camundongos estimulados por tioglicolato, verificaram que a isoflavona genisteína reduz tanto o número de macrófagos ingerindo partículas, como o número de partículas ingeridas por estes macrófagos. Além disso, em seus estudos demonstraram que o composto genisteína provoca uma diminuição dose-dependente reversível do índice fagocitário destes macrófagos elicitados. Entretanto, estes pesquisadores utilizaram concentrações de genisteína

significativamente maiores do que as utilizadas neste trabalho, sendo que foi obtido 50% de inibição da atividade fagocítica apenas com a concentração de 70 μ M de genisteína.

McGilvray et al. (2000) utilizaram a genisteína como agente inibidor da fagocitose em seus experimentos, obtendo cerca de 60% de inibição da atividade fagocítica de monócitos/macrófagos de humanos, utilizando a genisteína na concentração de 10 μ g/mL, cerca de 4x a concentração utilizada nesse trabalho. Em nossos resultados não observamos redução significativa da atividade fagocítica dos macrófagos tratados com genisteína, como também não verificamos influência de prévia regulação hormonal no efeito dos tratamentos.

Em resumo podemos inferir que a funcionalidade de macrófagos pode ser regulada diferencialmente pela genisteína, pois observamos em nossos estudos que este composto inibiu significativamente a produção de NO e de H₂O₂ dos macrófagos, entretanto não alterou a atividade fagocítica destas células. Em alguns parâmetros funcionais, tais como a produção de NO, a genisteína parece ter seu efeito dependente de uma possível pré-modulação hormonal (17 β -estradiol) dos macrófagos. Nos macrófagos de machos e de fêmeas em diestro, que estavam em contato com menor nível sérico de 17 β -estradiol, o efeito da genisteína foi mais efetivo na redução de NO. Neste sentido, sua ação fitoestrogênica-antiinflamatória em baixas concentrações de 17 β -estradiol, parece ser mais efetiva. No entanto, faz-se necessário maior número de estudos para compreender as propriedades moduladoras da genisteína sobre a funcionalidade de macrófagos entre os sexos.

Referências Bibliográficas

As referências citadas neste capítulo estão listadas ao final da dissertação em um único tópico com todas as demais referências.

Tabela 1a - Variação do peso corporal, parâmetros bioquímicos e hormonais entre ratos machos e fêmeas (diestro e proestro) de 110-130 dias.

Grupo	Peso (g)	Estradiol (pg/mL)	Glicose (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)	Triglicerídeos (mg/dL)
Macho (n=12)	271,7 ± 8,11	5,82 ± 0,29	102,7 ± 5,76	100,5 ± 10,43	63,00 ± 4,87
Diestro (n= 11)	193,0 ± 3,14*	11,11 ± 4,20	113,0 ± 7,49	106,2 ± 5,69	77,73 ± 6,27
Proestro (n=14)	192,2 ± 3,63*	25,01 ± 5,57*	112,5 ± 7,01	88,50 ± 3,00	64,07 ± 5,83

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média e a diferença entre os grupos foi obtida por análise de variância ANOVA. * Indica quais grupos apresentaram diferença significativa em relação ao grupo de machos, definidos pelo teste de Tukey, onde $p < 0,05$. n= número de animais.

Tabela 2a - Comparação entre a produção de NO basal e induzida por LPS de macrófagos controle.

Grupo	Produção de NO basal ($\mu\text{M}/4 \times 10^5 \text{ cél}$)	Produção de NO induzida por LPS ($\mu\text{M}/4 \times 10^5 \text{ cél}$)
Machos	9,37 ± 0,87	29,29 ± 1,28 *
Diestro	17,33 ± 2,74	26,57 ± 2,00 *
Proestro	8,11 ± 0,80	24,17 ± 0,96 *

Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média. * Indica diferença significativa entre a produção de NO basal e a produção induzida por LPS dentro de cada grupo, definidos pelo teste de Tukey, onde $p < 0,05$. n= 3, corresponde ao número de experimentos.

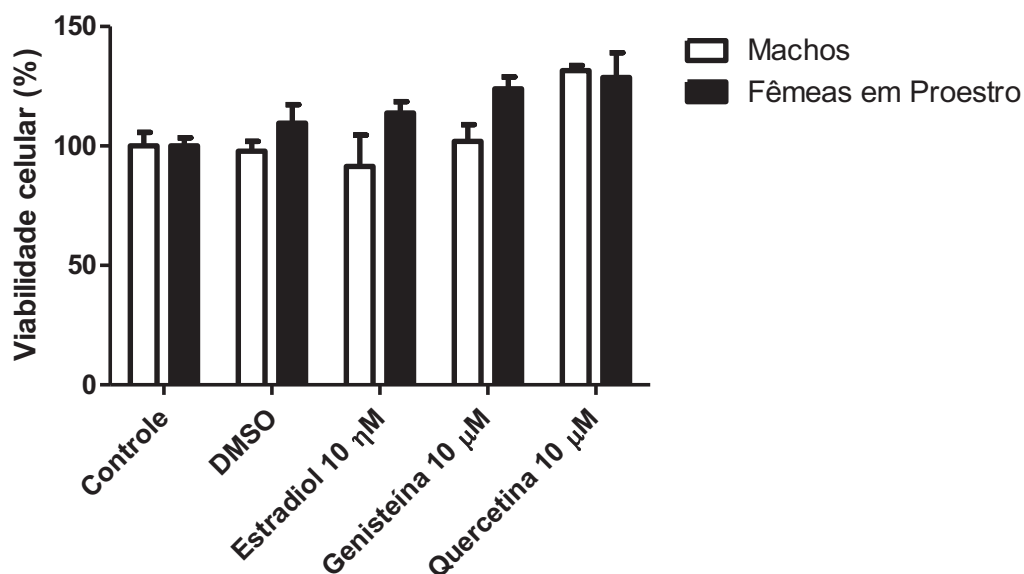


Figura 1a – Efeito da genisteína, quercetina e 17 β -estradiol na viabilidade celular de macrófagos (sem a indução de LPS) de ratos machos e fêmeas em proestro. Os macrófagos foram semeados em placas de cultura de 96 poços na concentração de 4×10^5 cel/100 μ l/poço e a viabilidade celular foi determinada pela redução do MTT conforme descrito em material e métodos. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média, n=4 determinações.

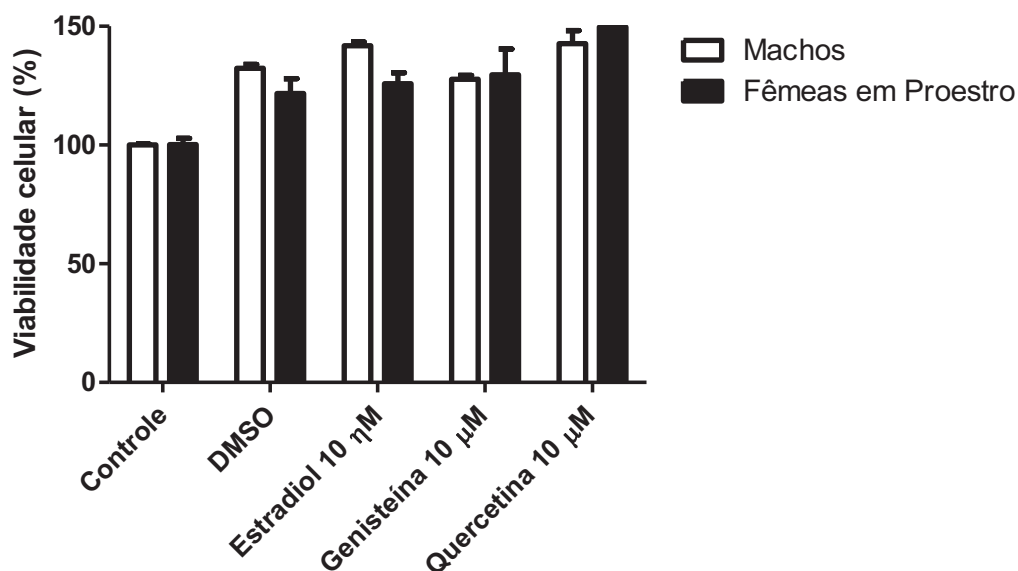


Figura 2a - Efeito da genisteína, quercetina e 17 β -estradiol na viabilidade celular de macrófagos (com a indução de LPS) de ratos machos e fêmeas em proestro. Os macrófagos foram semeados em placas de cultura de 96 poços na concentração de 4×10^5 cel/100 μ l/poço e a viabilidade celular foi determinada pela redução do MTT conforme descrito em material e métodos. Os resultados estão expressos como média $\pm$ erro padrão da média, n=4 determinações.

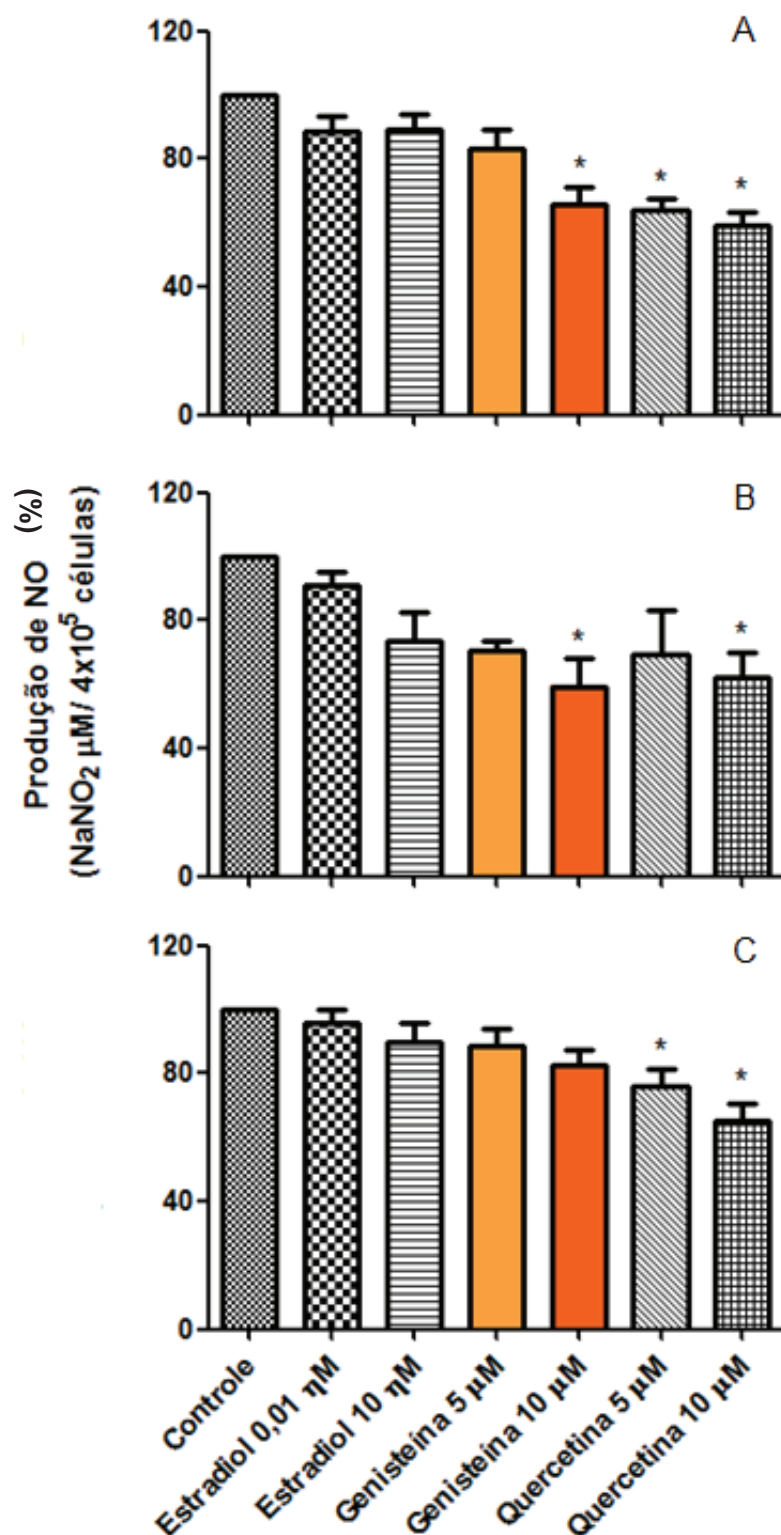


Figura 3a - Porcentagem de produção de NO basal dos macrófagos de ratos machos e fêmeas tratados com genisteína, quercetina e 17β-estradiol. Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média. * Indica quais grupos obtiveram diferença significativa na produção de NO em relação ao controle, definidos pela análise de variância ANOVA e pelo pós-teste de Tukey, onde $p < 0,05$. A) Machos; B) Fêmeas em diestro; C) Fêmeas em proestro. $n = 3$ correspondente ao número de experimentos.

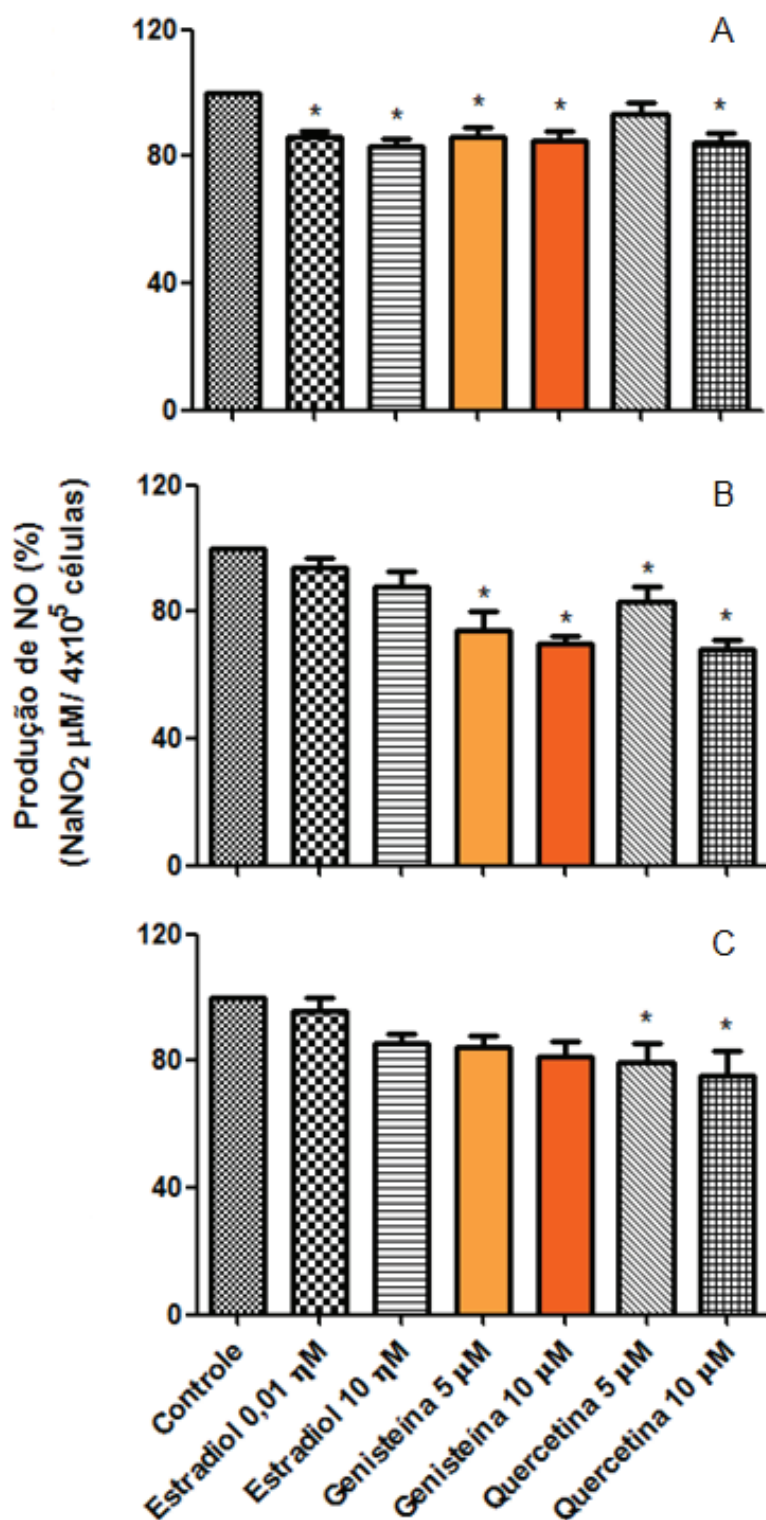


Figura 4a - Porcentagem de produção de NO induzida por LPS dos macrófagos de ratos machos e fêmeas tratados com genisteína, quercetina e 17β-estradiol. Os resultados são expressos como média ± erro padrão da média. * Indica quais grupos obtiveram diferença significativa na produção de NO em relação ao controle, definidos pela análise de variância ANOVA e pelo pós-teste de Tukey, onde $p < 0,05$. A) Machos; B) Fêmeas em diestro; C) Fêmeas em proestro. $n = 3$ correspondente ao número de experimentos.

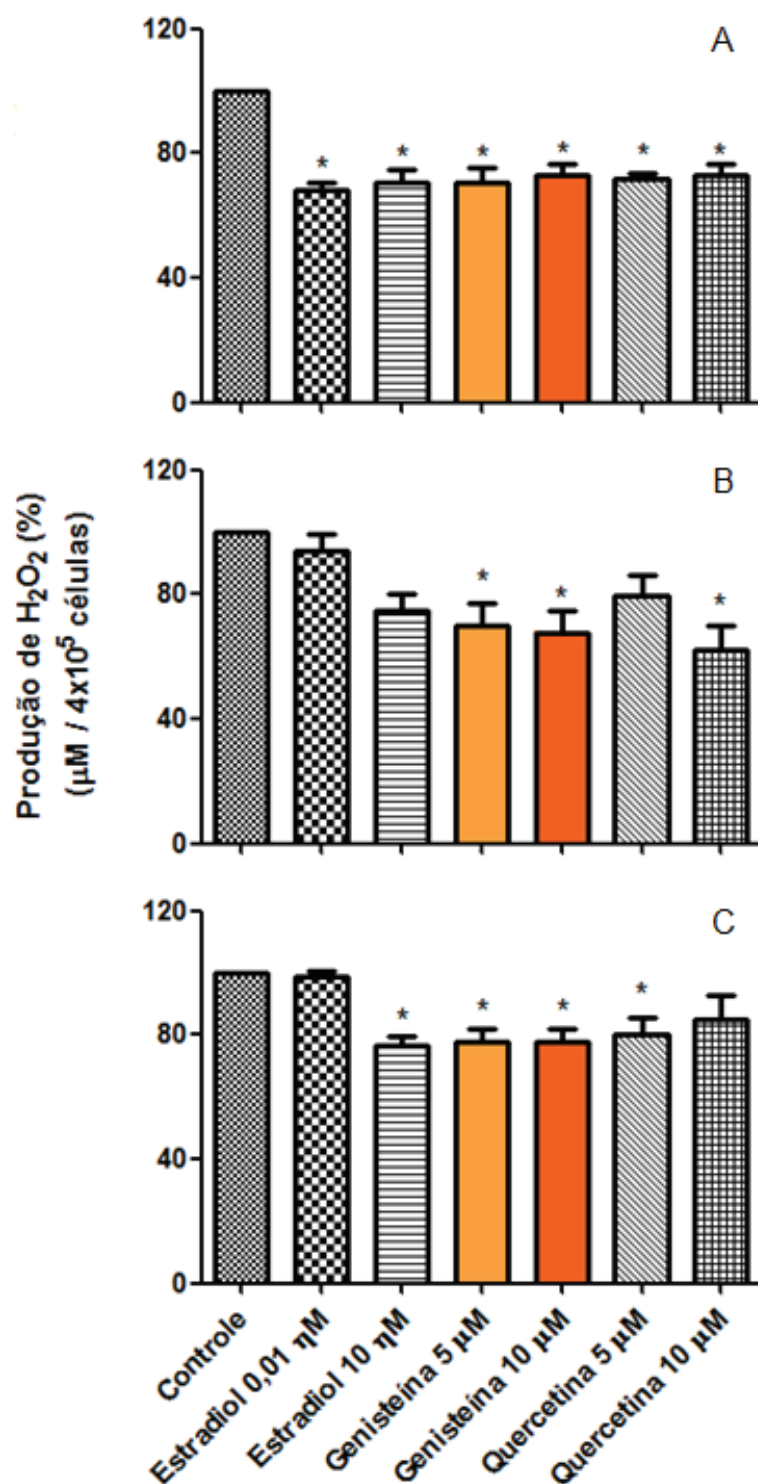


Figura 5a – Porcentagem da produção de H_2O_2 induzida por LPS dos macrófagos de ratos machos e fêmeas tratados com genisteína, quercetina e 17β -estradiol. Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média. * Indica quais grupos obtiveram diferença significativa na produção de H_2O_2 em relação ao controle, definidos pela análise de variância ANOVA e pelo pós-teste de Tukey, onde $p < 0,05$. A) Machos; B) Fêmeas em diestro; C) Fêmeas em proestro. $n = 3$ correspondente ao número de experimentos.

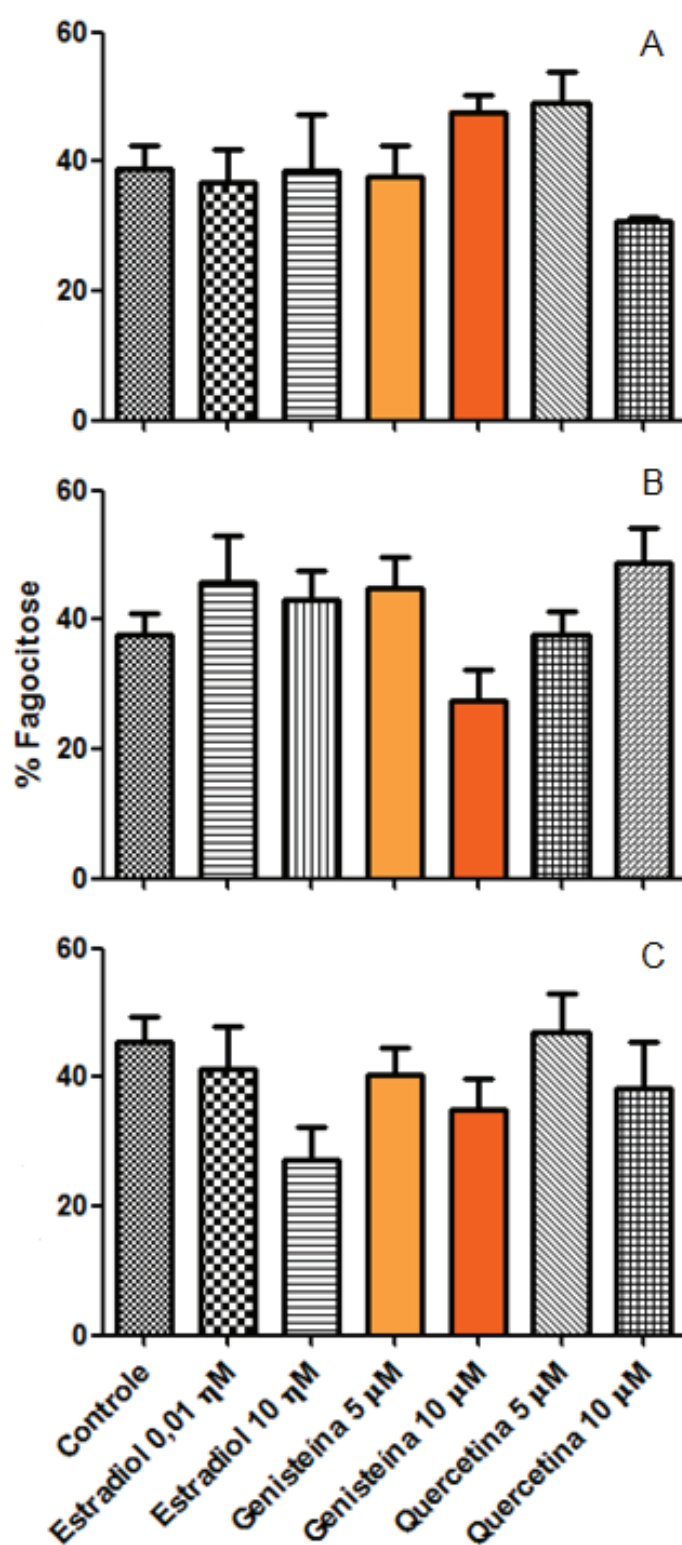


Figura 6a - Porcentagem de fagocitose de partículas opsonizadas de macrófagos (2×10^5 células) de ratos machos e fêmeas tratados com genisteína, quercetina e 17β-estradiol. Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média. n= 3, corresponde ao número de experimentos.

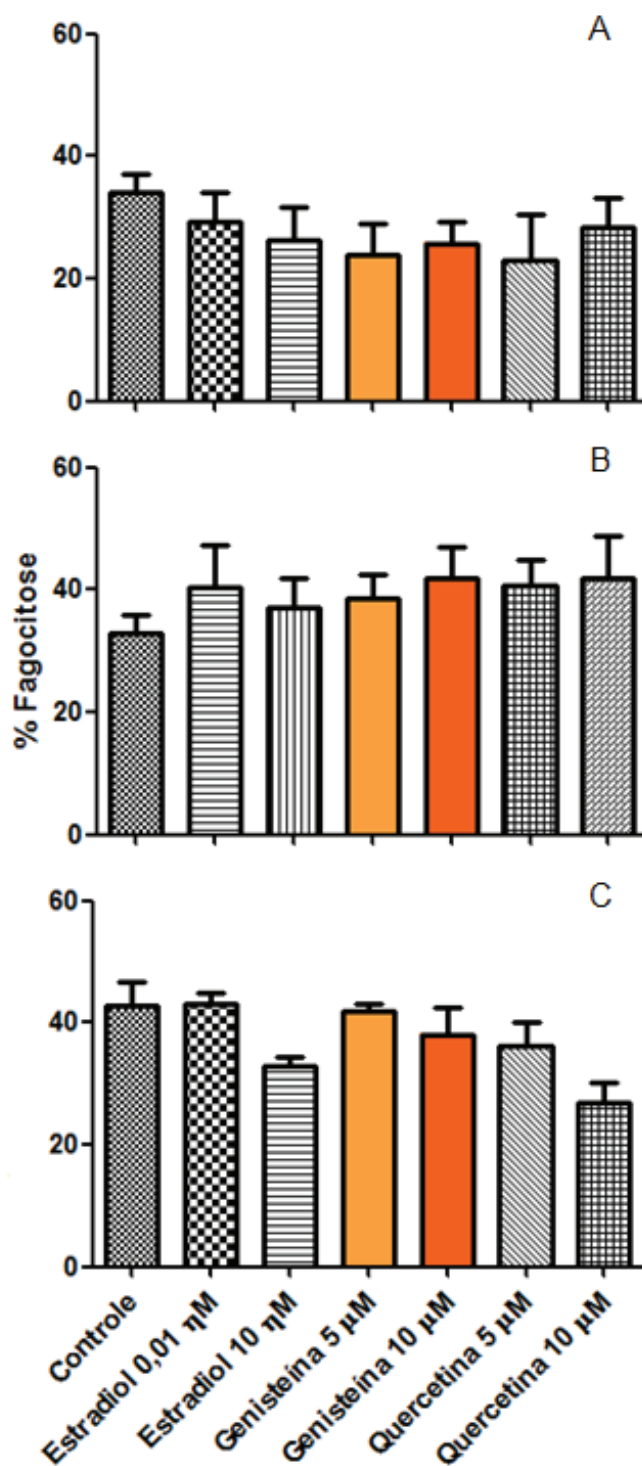


Figura 7a - Porcentagem de fagocitose de partículas não-opsonizadas de macrófagos (2×10^5 células) de ratos machos e fêmeas tratados com genisteína, quercetina e 17β -estradiol. Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média. $n = 3$, corresponde ao número de experimentos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo observamos que alguns parâmetros funcionais da funcionalidade de macrófagos, tais como a produção de NO, a ação fitoestrogênica da genisteína é mais efetiva em células pré-moduladas por baixas concentrações de 17 β -estradiol. Por conseguinte, podemos inferir que em células moduladas previamente por altas concentrações deste hormônio, a genisteína tem seu efeito menos acentuado, o que pode ser explicado por *downregulation* dos RE, resultado da exposição ao estradiol.

Fazendo um paralelo dos resultados obtidos nas fêmeas de ratos com humanos, o efeito biológico das isoflavonas varia de acordo com a fase biológica da mulher (Figura 4). Na pré-menopausa, quando a concentração de hormônios circulantes é alta, o resultado é a fraca ação estrogênica ou antiestrogênica. Na pós-menopausa, quando a concentração do estrogênio endógeno diminui, em média 60%, os receptores ficam mais disponíveis, favorecendo a ação estrogênica das isoflavonas, que acabam compensando a deficiência do hormônio humano. Assim, além de proporcionarem melhora dos sintomas da menopausa, elas mantêm ação estrogênica positiva no metabolismo ósseo, no sistema nervoso central e no sistema cardiovascular (CLARKSON et al., 1998; BU,; SETCHELL; LEPHART, 2005).

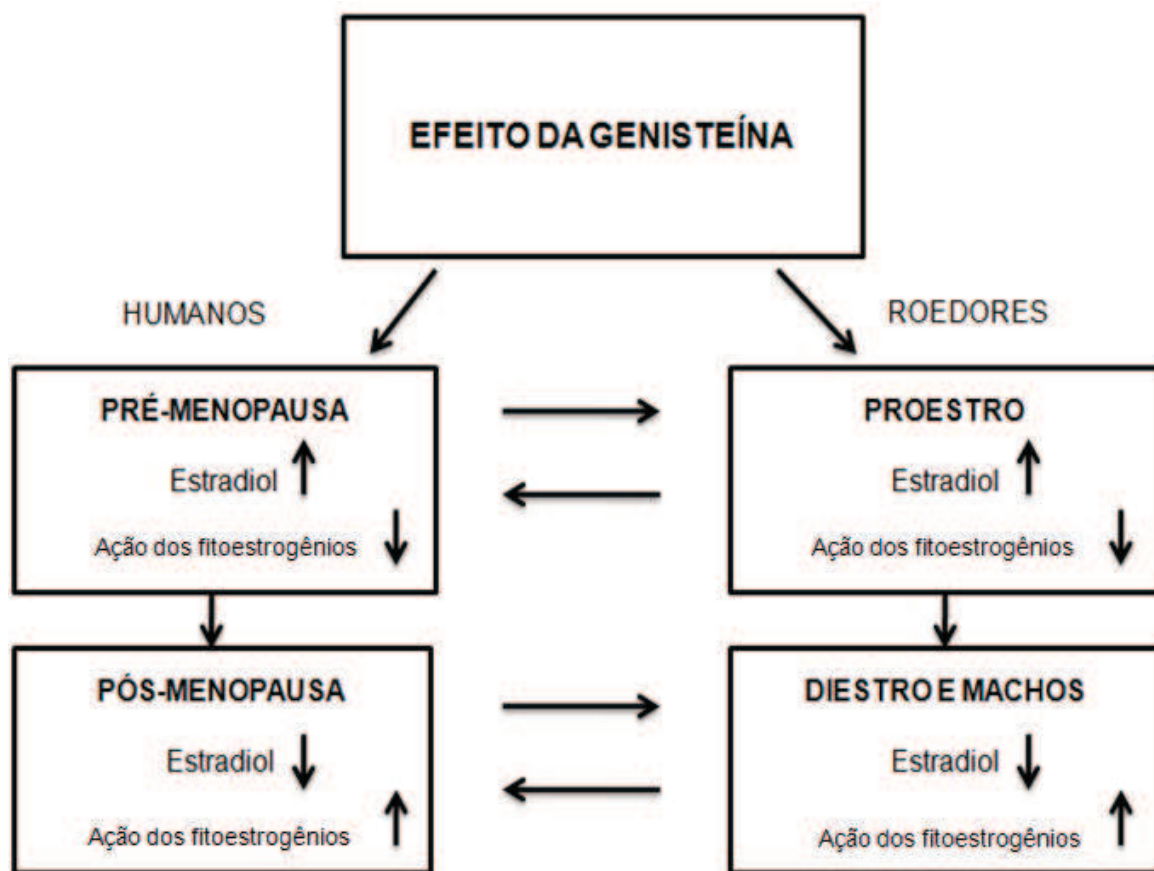


Figura 4 – Efeito da genisteína em humanos e roedores.

Cumprе ressaltar que as ações dos FE decorrem da sua interação com os RE. A afinidade diferencial das isoflavonas com os RE, em relação aos estrogênios endógenos, pode indicar que estas podem produzir diferentes efeitos nos macrófagos.

Estudos demonstram que a genisteína é muito mais efetiva na regulação gênica via RE β , o que a diferencia do estradiol, que consegue recrutar proteínas co-reguladoras quando ligada em ambos os receptores, α e β . Todavia, a ativação do RE β pela genisteína, lhe confere apenas os efeitos benéficos do estradiol, pois é através da ativação do RE α que o estradiol apresenta seus efeitos promotores de indução tumoral (AN et al., 2001).

Na terapia de reposição hormonal, os estrogênios são utilizados para evitar ondas de calor, atrofia urogenital e osteoporose em mulheres pós-menopáusicas. Entretanto, os estrógenos têm sido associados com uma incidência aumentada de câncer de mama e do endométrio. Desta forma, há um crescente interesse no uso de FE, particularmente aqueles encontrados em produtos de soja, como uma alternativa potencial à ação dos estrogênios na terapia de reposição hormonal. Mulheres asiáticas, que têm uma dieta rica em produtos de soja, têm uma menor incidência de sintomas da menopausa, osteoporose, doença cardiovascular e de câncer de mama e de endométrio (AN et al., 2001).

Além disso, devido a ação inibitória da genisteína nas espécies reativas observada neste estudo, esta pode apresentar ação antioxidante e antiinflamatória, sendo estas características típicas dos flavonóides, grupo no qual a genisteína está incluída. É bem conhecido que os flavonóides possuem várias atividades biológicas e farmacológicas, incluindo propriedades antioxidantes, antitumorais, antiangiogênicas, antiinflamatórias, antialérgicas e antivirais, assim, os flavonóides podem ser considerados promissores agentes de prevenção e tratamento de doenças, todavia a discriminação de uma específica atividade biológica dentre todas conferidas ao composto, por exemplo, algumas vezes é uma limitação do estudo, porque algumas atividades poderiam ser confundidas ou não completamente diferenciadas da outra.

Sendo assim, nossos resultados são um indicativo que a isoflavona genisteína pode atuar em diversas vias do organismo, bem como modular a resposta imunológica de macrófagos, podendo atuar como agonistas ou antagonistas em relação ao estradiol. Entretanto ainda mostram-se necessários maiores esclarecimentos sobre a ação da isoflavona genisteína sobre a

funcionalidade de macrófagos, principalmente em relação a sua ação dose-dependência correlacionada com a concentração de estradiol no organismo, por conseguinte, com o sexo e ciclo sexual, no caso das mulheres.

7 CONCLUSÕES

Neste estudo comparativo entre machos e fêmeas, a técnica do esfregaço vaginal demonstrou-se eficiente para a classificação das fêmeas segundo a fase do ciclo estral, visto que realizou-se posteriormente a confirmação destas fases mediante verificação do nível de estradiol sérico.

Os animais que participaram do estudo se encontravam dentro dos padrões de normalidade para os parâmetros bioquímicos analisados, e constatou-se que os machos apresentaram média de peso corporal maior do que as fêmeas, o que era esperado pensando-se em animais adequados para uso em pesquisa.

A genisteína, bem como os demais tratamentos empregados no trabalho, não foram citotóxicos, pois não houveram diminuições da viabilidade celular.

A genisteína inibiu a produção de NO, tanto basal, como a induzida por LPS. Seu efeito foi mais efetivo em macrófagos de animais que apresentaram menor nível de estradiol sérico (machos e fêmeas em diestro), sendo a inibição da produção de NO basal significativa entre os grupos, ou seja, machos e fêmeas em diestro quando comparados as fêmeas em proestro.

A produção de H_2O_2 também foi inibida nos macrófagos tratados com genisteína, todavia, não houve diferença entre os grupos.

A atividade fagocítica dos macrófagos não foi significativamente alterada pela genisteína e pelos demais tratamentos.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

AKSNES, J.; EIDE, T. J.; NORDSTRAND, K. Lipid entrapment and cellular changes in the rat, lung and liver after long-term parenteral nutrition with lipid emulsion. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 104 (7-8), p. 515-522.11, 1996.

ALARID, E. T.; BAKOPOULOS, N.; SOLODIN, N. Proteasome-mediated proteolysis of estrogen receptor: a novel component in autologous down-regulation. **Molecular Endocrinology**, v. 13, p.1522-1534, 1999.

ÁLVAREZ, P. et al. Diet supplementation for 5 weeks with polyphenol-rich cereals improves several functions and the redox state of mouse leucocytes. **European Journal of Nutrition**, v 45, p. 428-438, 2006.

AN, J. et al. Estrogen receptor beta-selective transcriptional activity and recruitment of coregulators by phytoestrogens. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 17808–17814, 2001.

ANSAR-AHMED, S.; PENHALE W.J.; TALAL, N. Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. **The American Journal of Pathology**, v. 121, p. 531–551, 1985.

AUGER, M. J.; ROSS, J. A. The biology of the macrophages. **The macrophage**, p. 1-74, 1992.

BABIOR, M. B. The respiratory burst oxidase. **Advances in Enzymology & Related Areas of Molecular Biology**, v. 65, p. 49-95. 1992

BABIOR, B. M. NADPH oxidase: an update. **Blood**, v.93 (5), p.1464-76, 1999.

BAIN, B. J.; ENGLAND, J. M. Normal Haematological Values: Sex Difference in Neutrophil Count. **British Medical Journal**, v.1, p. 306-309, 1976.

BARAK, V. et al. The effect of estradiol on human myelomonocytic cells: II. Mechanism of enhanced activity of colony formation. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 9, p. 355-363, 1986.

BARNES, S., SFAKIANOS, J., COWARD, L. Soy isoflavonoids and cancer prevention. Underlying biochemical and pharmacological issues. **Advances in Experimental Medical Biology**, v. 401, p.87-100, 1996.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v.29, n.1, p. 113-123, 2006.

BARRET, J.R The science of soy: what do we really know. **Environmental Health Perspectives**, v. 114(6), p. 352-359, 2006.

BAUD, V.; KARIN, M. OPINION: Is NF-kappa B a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8(1), p. 33-40, 2009.

BEDARD, K.; KRAUSE, H. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. **Physiological Reviews**, v.87(1), p.245-313, 2007.

BERRA, C. M.; MENCK, C. F. M.; DI MASCIO, P. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1340-1344, 2006

BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. **Molecular Immunology**, v. 40, p. 845-859, 2004.

BOUMAN, A.; HEINEMAN, M. J.; FAAS M. M. Sex hormones and immune response in humans. **Human Reproduction Update**, v. 11(4), p. 411- 423, 2005.

BU, L.; SETCHELL, K.; LEPHART, E. Influences of dietary soy isoflavones on metabolism but not nociception and stress hormone responses in ovariectomized female rats. **Reproductive Biology Endocrinology**, v. (3), p. 58-65, 2005.

BUCKLEY, C.E.; DORSEY, F.C. Serum immunoglobulin levels throughout the life-span of healthy man. **Internal Medicine**, v. 75, p. 673, 1971.

CADENAS, S.; CADENAS, A. M. Flighiting the stranger-antioxidante protection against endotoxin toxicity. **Toxicology**, v. 180, p. 45-63. 2002.

CARVALHO, H. F.; COLLARES-BUZATO, C. B. **Células - uma abordagem multidisciplinar**. 1ª ed. São Paulo: Manole, 2005.

CHANDRA R. K. Nutrition and the immune system from birth to old age. **European Journal of Clinical Nutrition**, v. 56(3), p. S73-76, 2002.

CHAO T. C.; VAN ALTEN P.J.; WALTER R.J. Steroid sex hormones and macrophage function: modulation of reactive oxygen intermediates and nitrite release. **American Journal of Reproductive Immunology**, v. 32, p. 43–52. 1994.

CHOI, C. et al. Supressive effects of genistein on oxidative stress and NF-kB activation in RAW 264.7 macrophages. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry** , v. 67, p. 1916-1922, 2003.

CLAPAUCH, R et al. Fitoestrogênios: Posicionamento do Departamento de Endocrinologia Feminina da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM). **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 46 (6), p. 669-695, 2002.

CLARKSON T. B., et al. The potential of soybean phytoestrogens for postmenopausal hormone replacement therapy. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 217, p. 365-8, 1998.

COHEN, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**,. v. 420, p. 885–891, 2002.

COMALADA, M. et al. Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: Analysis of the structure–activity relationship, **Biochemical Pharmacology**, v. 72 , p. 1010–1021, 2006 .

COOKE, P. S.; SELVARAJ, V.; YELLAYI, S. Genistein, estrogen receptor and acquired immune response. **Journal of Nutrition**, v. 136, p. 704-708, 2006.

COTRAN, R. S; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Patologia básica**. 5. ed. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1994.

COTRONEO, M. S. et al. Sex steroid receptor regulation by genistein in the prepubertal rat uterus. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 173, p. 135-145, 2001.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1 (3), p. 241-256, 2009.

DANTAS, J. A. et al. **Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá**, Estado do Paraná, 2005.

DAS, S.; ROSAZZA, J. P. N. Microbial and enzymatic transformations of flavonoids, **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 499-508, 2006.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N.. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**. Curitiba. v. 5, p. 33-40, 2004.

DELOIA, J. et al. Effects of exogenous estrogen on uterine leukocyte recruitment. **Fertil Steril**, v. 77(3), p. 548-554, 2002.

DEMMIG-ADAMS. B.; MCCAULEY. Breast cancer, estrogen, soy genistein, and other dietary factors. Towards an understanding of their mechanistic interactions. **Journal: Nutrition & Food Science**, v. 35, p. 35-42, 2005.

DIA, V. P.; BERHOW, M. A.; MEJIA G. E. Bowman-Birk inhibitor and genistein among soy compounds that synergistically inhibit nitric oxide and prostaglandin E2 pathways in lipopolysaccharide-induced Macrophages. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 11707–11717, 2008.

DIEZ-PEREZ, A. Selective estrogen receptor modulators. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50 (4), p. 720-734, 2006.

EIDINGER, D.; GARRET, T. Studies of regulatory effects of the sex hormones on antibody formation and stem cell differentiation. **Journal of Experimental Medicine**, v. 136, p. 1098-1116, 1972.

FABIANI, R. et al. Production of hydrogen peroxide is responsible for the induction of apoptosis by hydroxytyrosol on HL60 cells. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 53, p. 887-896, 2009.

FADOK, V.A. et al. Particle digestibility is required for induction of the phosphatidylserine recognition mechanism used by murine macrophages to phagocytose apoptotic cells. **The Journal of Immunology**, v. 151, p. 4274 - 4285, 1993.

FERRANTE, A.W. Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation. **Internal Medicine**, v. 262(4), p. 408-14, 2007.

FERRARI, R. et al. Isoflavonas de Soja – Uma breve Revisão. **Publicatio UEPG – Biological and Health Sciences**, 2001.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.43, p. 61-68, 1997.

FERREIRA, R.A.S. Dosiê soja. **Nutrição Brasil**. Rio de Janeiro: v.1, p. 177-186, 2002.

FORTES, E. M.; et al. Ingestão Excessiva de Fitoestrógenos e Telarca Precoce. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 51(3), p.500-503, 2007.

FRAZIER-JESSEN, M. R.; KOVACS, E. J. Estrogen modulation of JE/monocyte chemoattractant protein-1 mRNA expression in murine macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 154, p. 1838-1845, 1995.

FRISCHER H, AHMAD T. Consequences of erythrocytic glutathione reductase deficiency. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 109, p. 583-588, 1987.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **The Journal of Experimental Biology**, v. 201, p. 1203-1209, 1998.

FUENTE, M. Changes with ageing in several leukocyte functions of male and female rats. **The journal Biogerontology**, v. 5(6), p. 389-384, 2004.

GAILLARD, R. C.; SPINEDI, E. Sex and stress steroids interactions and the immune system: evidence for a neuroendocrine-immunological sexual dimorphism. **Domestic Animal Endocrinology**, v 15(5), p. 345-352, 1998.

GALLACHER, S. J et al. Neutrophil bactericidal function in diabetes mellitus: evidence for association with blood glucose control. **Diabetes Medicine**, v. 12, p. 916-920, 1995.

GALLEANO M, PUNTARULO S. Role of antioxidants on the erythrocytes resistance to lipid peroxidation after acute iron overload in rats. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1271(2-3), p. 321-326, 1995.

GARCIA, J. A. V.; DAOUD, R. Efeitos dos antioxidantes fenólicos na prática desportiva. **Fitness & Performance Journal**, v. 1 , p.21-27, 2002.

GARTNER, L.P.; HIATT, J.L. **Color Textbook of Histology**, Philadelphia, p. 58-69, 1997.

GILBERT HF, MCLEAN VM. Molecular and cellular aspects of thiol-disulfide exchange. **Advances in Enzymology & Related Areas of Molecular Biology**, v. 63, p. 69-172, 1990.

GREENBERG, S.; CHANG, P.; SILVERSTEIN, S. C. Tyrosine phosphorylation is required for Fc receptor mediated phagocytosis in mouse macrophages. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 177, p. 529–534, 1993.

GRISCAVAGE, J. M.; WILK, S.;IGNARRO, L. J. Inhibitors of the proteasome pathway interfere with induction of nitric oxide synthase in macrophages by blocking activation of transcription factor NF-kappa B. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, p. 3308–3312, 1996.

GROSSMAN C. J. Regulation of the immune system by sex steroids. 20. **Endocrine Reviews**, v. 5(3), p. 435-55, 1984.

GROSSMAN C. J.; ROSSELE G. A.; MENDENHALL C. L. Sex steroid regulation of autoimmunity. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 40(4-6), p. 649-59, 1994.

GYORKI, D.; LINDEMAN, G. Macrophages, more than just scavengers. **Anz Journal of Surgery**; v. 78, p. 432–436, 2008.

HÄMÄLÄINEN, M. et al. Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-kB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-kB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. **Mediators of Inflammation**, v. 2007; p. 45673, 2007.

HAMILTON, H. B.; HAMILTON, R. S.; MESTLER, G. E. Duration of life and causes of death in domestic cats: influence of sex, gonadectomy, and inbreeding. **Journal of Gerontology**, v. 24, p. 427- 437, 1969.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals reactive species and toxicology. **Journal of the Society for Free Radical Biology and Medicine**, p. 544-616, 1999.

HAN, K. K. et al. Efeitos dos Fitoestrogênios sobre Alguns Parâmetros Clínicos e Laboratoriais no Climatério. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 24 (8), p. 547-552, 2002.

HATSUMI T. & YAMAMURO Y. Downregulation of Estrogen Receptor Gene Expression by Exogenous 17 β -Estradiol in the Mammary Glands of Lactating Mice. **Experimental Biology and Medicine**, v. 231, p. 311-316, 2006.

HAVSTEIN, H. B. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 96, p. 67-202, 2002.

HAYASHI, T. et al. Physiological concentrations of 17 β -estradiol inhibit the synthesis of nitric oxide synthase in macrophages via a receptor-mediated system, **Journal of Cardiovascular Pharmacology**, v. 31, p. 292– 298, 1998.

HEBBEL RP. Erythrocyte antioxidants and membrane vulnerability. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 107, p. 401-4, 1986.

HERSHKO C. Mechanism of iron toxicity and its possible role in red cell membrane damage. **Seminars in Hematology**, v. 26, p. 277-85, 1989.

HESPANHOL, M.R.; MANTOVANI, B.. Phagocytosis by macrophages mediated by receptors for denatured proteins - dependence on tyrosine protein kinases. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 3, 2002.

HO, K.; LIAO, J. K. Nonnuclear actions of estrogen. **Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology**, v. 262, p. 6969-6975, 2002.

HSIEH, Y. C., et al. Downregulation of migration inhibitory factor is critical for estrogen-mediated attenuation of lung tissue damage following trauma-hemorrhage. **American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 292, p.1227–1232, 2007.

JAIN, SK. et al. Progesterone, but not 17 β -estradiol, increases TNF- α secretion in U937 monocytes. **Cytokine**, v. 26(3), p. 102-5, 2004.

JAMES, S.L. Role of nitric oxide in parasitic infections. **Microbiology Reviews**, v. 59, n. 4, p. 533-547, 1995.

JANEWAY, C. A. et al. **Imunologia: o sistema immune na saúde e na doença**. 5ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

JOHANSSON, A. et al. Different subcellular localization of cytochrome c and the dormant NADPH-oxidase in neutrophils and macrophages: effect on the production of reactive oxygen species during phagocytosis. **Immunology and Cell Biology**, v. 161, p. 61-71, 1995.

KARNOVSKI, M. L.; LAZDINS, J.K. Biochemical criteria for activated macrophages. **Journal of Immunology**, v. 121, n. 3, p. 809-813, 1978.

KELLER. E. T; ZHANG J; YAO. Z. The impact of chronic estrogen deprivation on immunologic parameters in the ovariectomized rhesus monkey (*Macaca mulatta*) model of menopause. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 50(1), p. 41-55, 2001.

KIM, H. K. et al. Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure–activity relationships. **Biochemical Pharmacology**, v. 58, p. 759-765, 1999.

KIM, Y. K. et al. Differential regulation of protein tyrosine kinase on free radical production, granule enzyme release, and cytokine synthesis by activated murine peritoneal macrophages. **Biochemical Pharmacology**, v. 61, p. 87–96, 2001.

KLEBANOFF, S. J. Oxygen metabolites from phagocytes In: Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates. **Raven Press**, p. 541-588, 1992.

KNIGHT, D.C.; EDEN, J. A. A review of the clinical effects of phytoestrogens. **Obstetrics & Gynecology**, v. 87, p. 897-904, 1996.

KONDO, H. et al. BE-14384 substances, new specific estrogen- receptor binding inhibitors. Production, isolation, structure determination and biological properties. **The Journal of Antibiotics**, v. 43, p. 1533-42, 1990.

KOSTELAC, D.; RECHKEMMER, G.; BRIVIBA, K . Phytoestrogens modulate binding response of estrogen receptors α and β to the estrogen response element. **The Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7632-7635, 2003.

KUBES, P.; KUROSE, L.; GRANGER, D.N. NO donors prevent integrin-induced leukocyte adhesion but not P-selectin-dependent rolling in postischemic venules. **American Journal of Physiology**, v. 267, p. 931, 1994.

KUDOU, S. et al .Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* MERRIL). **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 55(9), p. 2227-2233, 1991.

KUIPER G. G. J. M., et al. A Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . **Endocrinology**, v. 138, p. 863–870, 1997.

KUIPER, G.G.J.M, et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . **Endocrinology**, v. 139, n. 10, p. 4252-4263, 1998.

KUNDU, J. K., SURH, Y. J., Molecular basis of chemoprevention by resveratrol: NF- κ B and AP-1 as potential targets. **Mutation Research**, v. 555, p. 65–80, 2004.

KURZER MS. Hormonal effects of soy isoflavones: studies in premenopausal and postmenopausal women. **Journal of Nutrition**, v. 130, p. 660-1, 2000.

LAMPE, J.W. Is equol the key to the efficacy of soy foods? **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 89 (suppl), p. 1664–1667, 2009.

LAWTON, T.J. Massive macrophage lipid accumulation presenting as hepatoesplenomegaly and lymphadenopathy associated with long-term total parenteral nutrition therapy for short bowel syndrome. **Human Pathology**, v. 29(6), p. 651-5, 1998.

LEITE, H. P.; SARNI, R. S. Radicais livres, antioxidantes e nutrição. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 18, n. 2, p. 87-94, 2003.

LIGGINS, J. et al. Daidzein and genistein content of fruits and nuts. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v.11, p. 326-31, 2000.

LIMA, L. R. P.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J. Efeitos do flavonóide quercetina e dos corantes bixina e norbixina sobre parâmetros sanguíneos de coelhos. **Revista de Nutrição**, v. 16(3), p. 305-314, 2003.

MA, Z. et al. Effect of resveratrol on peritoneal macrophages in rats with severe acute pancreatitis. **Inflammation Research**, v. 54: p. 522–527, 2005.

MACMICKING, J. Recognizing macrophage activation and host defense. **Cell Host & Microbes**, v. 5, p. 405-407, 2009.

MCGILVRAY, I. D. et al. Nonopsonic monocyte/macrophage phagocytosis of Plasmodium falciparum-parasitized erythrocytes: a role for CD36 in malarial clearance. **Bloodjournal**, 2010.

MARCONDES, F. K. et al. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze test. **Physiology & Behavior**, v. 74, p. 435– 440, 2001.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Influência do ciclo estral sobre a sensibilidade da resposta cronotrópica à norepinefrina em ratas submetidas a estresse agudo. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, n. 1, 2002

MARCINKIEWICZ, J. Nitric oxide and antimicrobial activity of reactive oxygen intermediates. **Immunopharmacology**, v. 37, p. 35-41, 1997.

MASCOLO N, BORRELI F, CAPSSO R, CAPASSO F, CARLO GG, IZZO AA, *et al.* Natural Products and cardiovascular disturbances. **Phytotherapy Research**, v. 12, p. 121-23, 1998.

MAOZ, H. The effect of estradiol on human myelomonocytic cells. **Reproductive of Immunology**, v. 2, p. 325-335, 1985.

MAYER, B.; HEMMENS, B. Biosynthesis and action of nitric oxide in mammalian cells. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 22, p. 477-481, 1997.

MAYES, P. A. Biologic oxidation. In Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW (eds): **Harper's biochemistry**. San Mateo, Appleton & Lange, p. 105-11, 1990.

MEDEIROS S. F.; OLIVEIRA V. N.; YAMAMOTO, M. M. W. Epidemiologia clínica do climatério. **Reprodução & Climatério**; v. 18(1), p. 79-86, 2003

MEDEIROS, S. F.; MAITELLI, A; NINCE, A. P. B. Efeitos da terapia hormonal na menopausa sobre o sistema imune. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetria**, v. 29(11), p. 593-601, 2007.

MEDZHITOV, R., PRESTON-HURLBURT, P.; JANEWAY C. A. Jr . A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity **Nature**, 1997.

MEISSNER, W. A.; DIAMDOPOULOS, G. T. H. **Pathology**, CV Mosby Company, St. Louis, v. 674, 1977.

MEISTER, A.; ANDERSON, M. E. Glutathione. **The Annual Review of Biochemistry**, v. 52, p.711-760, 1983.

MESSINGHAM, K. A.; HEINRICH, S. A.; KOVACS, E. J. Estrogen restores cellular immunity in injured male mice via suppression of interleukin-6 production. **Journal Leukocyte Biology**, v. 70, p. 887–895, 2001.

MILLER, L.; HUNT, J. S. Sex steroid hormones and macrophage function. **Life Sciences**. v. 59(1), p. 1-14, 1996.

MOHAN, P. F.; JACOBSON M.S. Inhibition of macrophage superoxide generation by dehydroepiandrosterone. **American Journal of the Medical Sciences**, v. 306, p. 10-15, 1993.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. **Pharmacological Reviews**, v. 43, p. 109-142, 1994.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunology**, v. 65, p. 55–63. 1983.

MUCHOVA, J.; LIPTAKOVA, A.; ORSZAGHOVA, Z. Antioxidant systems in polymorphonuclear leucocytes of type 2 diabetes mellitus. **Diabetes Medicine**, v. 16, p. 74-78, 1999.

MUROTA, K.; TERAOKA, J. Antioxidative flavonoid quercetin : implication of its intestinal absorption and metabolism. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 417, p. 12-17, 2003.

MURPHY, A. et al. Estradiol Regulates Expression of Estrogen Receptor ER α 46 in Human Macrophages. **Plos One**, v. 4(5), p. 1-11, 2009.

NAKAYA, M.; TACHIBANA, H.; YAMADA, J. Isoflavone genistein and daidzein up-regulate LPS-induced inducible nitric oxide synthase activity through estrogen receptor pathway in RAW264.7 cells. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, p. 108-114, 2005.

NALBANDIAN, G.; KOVATS, S. Understanding sex biases in immunity: effects of estrogen on the differentiation and function of antigen-presenting cells. **Immunology Research**, v. 31(2), p. 91-106, 2005.

NATHAN, C.F. Regulation of macrophages oxidative metabolism and antiparasitic activity. **Mononuclear phagocytes. Characteristics, physiology and function**. Boston: Martinus Nijhoff, p. 411-420, 1985.

NELSON, D.J.; JOW, F. Whole-cell currents in macrophage: Human monocytes derived macrophages. **The Journal of Membrane Biology**, v. 117, p. 29-44, 1990.

NEVEU, P. J. The mononuclear phagocyte system. **Bulletin de l'Institut Pasteur**, v. 84, p. 23-66, 1986.

NORTHERN, A. L.; RUTTER, S. M.; PETERSON, C. M. Cyclic Changes in the Concentrations of Peripheral Blood Immune Cells During the Normal Menstrual Cycle. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 207, p. 81-88, 1994.

OLIVEIRA, V. M. ; ALDRIGHI, J. M.; RINALDI, J. F. Quimioprevenção do câncer de mama. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.52, n.6, p. 453-459, 2006.

OLSEN, N. J.; KOVACS, W. J. Gonadal steroids and immunity. **Endocrine Reviews**, v. 17(4), p. 369-84, 1996.

PARK, J. W.; BABIOR, B. M. The translocation of respiratory burst oxidase components from cytosol to plasma membrane is regulated by guanine nucleotides and diacylglycerol. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 167, n. 28, p. 19901-19906, 1992.

PARK, J. et al. The cytosolic components of the respiratory burst oxidase exist as a Mr 240.000 complex that acquires a membrane binding site during activation of the oxidase in a cell-free system. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 24, p. 17327-17332, 1992.

PERRY, D. L. et al. Dietary soy protein containing isoflavonoids does not adversely affect the reproductive tract of male cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*). **Journal of Nutrition**, v. 137(6), p.1390-4, 2007.

PIMENTEL, C. V. M. B.; FRANCKI, V.; GOLLÜCKE, A. P. B. **Alimentos Funcionais: Introdução As Principais Substâncias Bioativas Em Alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 2005.

PINCEMAIL, J. *Ginkgo biloba* extract inhibits oxygen species production generated by phorbol myristate acetate stimulated human leukocytes. **Experientia**, v. 43, p. 181-4, 1987.

PRABHALA, R. H. et al. Regulation by human uterine cells of PBMC proliferation: influence of the phase of the menstrual cycle and menopause. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 40(1), p. 25-45, 1998.

QUINN, M.T.; AMMONS, M. C.; DELEO, F.R. The expanding role of NADPH oxidases in health and disease: no longer just agents of death and destruction. **Clinical Science**, v. 111(1), p. 1-20, 2006.

PRINCE, R.C.; GUNSON, D.E. Rising interest in nitric oxide synthase. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 18, p. 35-36, 1993.

RAETZ, C. R. Biochemistry of endotoxins. **The Annual Review of Biochemistry**, v. 59, p. 129– 170, 1990.

ROCHE E; ALVIRA DR. Alteraciones del ADN inducidas por el estrés oxidativo. **Medicina Clinica**, v. 106, p. 144-153, 1996.

ROSS, D.; MOLDEUS, P. Antioxidant defense systems and oxidative stress. *In* Vigo-Pelfrey C (ed): **Membrane lipid oxidation**. 1th ed. Boca Raton, CRC Press, 151-70, 1991.

RUFER, C. E., & KULLING, S. E. Antioxidant activity of isoflavones and their major metabolites using different in vitro assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54(8), p. 2926–2931, 2006.

SADOWSKA-KROWICKA, H. et al. Genistein and gut inflammation: Role of nitric oxide. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.217, p. 351–357, 1998.

SAKAI, T.; KOGISO, M. Soy isoflavones and immunity. **Journal of Investigative Medicine**, v. 55, p.167-173, 2008.

SAMPAIO, C. S. **Influências do veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre a funcionalidade e o metabolismo de glicose e glutamina de macrófagos**. São Paulo, 2000. 95 f. Dissertação (Mestrado em farmacologia) – Universidade de São Paulo, 2000.

SANTANGELO, C. et al. Polyphenols, intracellular signaling and inflammation. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, v. 43, p. 394- 405, 2007.

SAVITA, U. R. Sex steroid hormones modulate the activation of murine peritoneal macrophages: receptor mediated modulation, **Comparative Biochemistry Physiology**, v. 119, p. 199–204, 1998.

SEGAL, A. W.; ABO, A. The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. **Trends in Biochemical Sciences**. Kidlington, v. 18, p. 43-47, 1993.

SHAN, X.; AW, T. Y, JONES, D. P. Glutathione-dependent protection against oxidative injury. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 47, p. 61-71, 1990.

SHEPHERD, V.L. Fucoseterminated glycoconjugates are recognized by pinocytosis receptors on macrophages. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 78, n. 2, p. 1019-1022, 1981.

SIMONCINI, T.; GENAZZANI, A. R.; LIAO, J. K. **Nongenomic mechanisms of endothelial nitric oxide synthase activation by the selective estrogen receptor modulator raloxifene**, v. 105, p.1368-1373, 2002.

SONG, J.Y. et al. Induction of secretory and tumoricidal activities in peritoneal macrophages by ginsan. **International Immunopharmacology**, v. 2, p. 857-865, 2002.

STAHL, P.D. et al. Mannose-specific oligosaccharide recognition by mononuclear phagocytes. **Biology of the Cell**, v. 51, p. 215-218, 1984.

SETCHELL K. D. et al. Dietary estrogens – a probable cause of infertility and liver disease in captive cheetahs. **Gastroenterology**, v. 93, p. 225-33, 1987.

STITES, D.P.; TERR, A.I. **Imunologia**, Editora Prentice/Hall do Brasil Ltda, Rio de Janeiro, 1992.

SUZUKI T, et al. Estrogenmediated activation of non-genomic pathway improves macrophages cytokine production following trauma-hemorrhage. **Journal of Cellular Physiology** , v. 214, p. 662–672, 2008.

TALAL, N. **Encyclopedia of Immunology**, I. M. Roitt and P. J. Delves (Eds), 1369-1371, Academic Press, New York, 1992.

THAM, D. M. Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological and mechanistic evidence. **Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 83(7), p. 2223-2235, 1998

TRAVIS, J. On the Origin of The Immune System. **Science** , v. 324, 2009.

VALERIUS, N. H.; EFF, C.; HANSEN, N. E. Neutrophil and lymphocyte function in patients with diabetes mellitus. **Acta Medicine Scandinavica**, v. 211, p. 463-7, 1982.

VALSSECCHI, A.E. et al. Genistein, a natural phytoestrogen from soy, relieves neuropathic pain following chronic constriction sciatic nerve injury in mice: anti-inflammatory and antioxidant activity. **Journal of Neurochemistry**, v. 107, p. 230-240, 2008.

VEGETO, E. et al. Regulation of the lipopolysaccharide signal transduction pathway by 17 β -estradiol in macrophage cells. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 91, p. 59–66, 2004.

VENKATA-REDDY, M.; GANGADHARAM, P.R.J. Heat shock treatment of macrophages causes increased released superoxide anion. **Infection and Immunity**, v. 60, p. 2386-2390, 1992.

VERNON-ROBERTS, B. The effects of steroid hormones on macrophage activity **International Review of Cytology**, v. 25, p. 131-159, 1969.

VERTHELYI, D; KLINMAN, D.M. Sex hormone levels correlate with 30. The activity of cytokine-secreting cells in vivo. **Immunology**, v.100 (3), p. 384-90, 2000.

VOGEL, V. Effects of tamoxifen vs raloxifene on the risk of developing invasive breast cancer and other disease outcomes. **Jama Express**, v. 295, p. 2727-41, 2006.

WEI, H. et al. Isoflavone genistein inhibits the initiation and promotion of two-stage skin carcinogenesis in mice. **Carcinogenesis**, v. 19, 1509- 14,1998.

WILLOUGHBY, D. S. ; WATSON, D. W. Host-paradites relationships among group a streptococci II. Influence of sex on the susceptibility os inbred mice toward streptococcal infection.**The Journal of Bacteriology**, v. 87, p. 1457-1461,1964.

WOOD, K.J., AUSTYN, J.M. **Principles of celular and molecular immunology.** Oxford University press Inc, New York, 1993.

YAMAGUCHI, T.; KANEDA, M.; **Presence of cytochrome b-558 in guineapig alveolar macropahges-subcelular localization and relationship with NADPH oxidase**, v. 933, p. 450-459, 1988.

YASUI, T. et al. Changes in serum cytokine concentrations during the menopausal transition. **Maturitas**, v 56(4),p. 396-403, 2007.

YEB, L.; CHANB, M.Y.; LEUNG, L.K .The soy isoflavone genistein induces estrogen synthesis in an extragonadal pathway. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 302, p. 73-80, 2009.

YIHAI, C.; RENHAI, C.; EBBA, B. Antiangiogenic mechanisms of diet-derived polyphenols. **The Journal of Nutritional Biochemistry** , v. 13, p. 380-390, 2002.

YOU H. J.,KIM J. Y. & JEONG, H. G. 17b-Estradiol increases inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.303, p.1129–1134, 2003.

ZHUANG, J.C.; WOGAN, G.N. Growth and viability of macrophages continuously stimulated to produced nitric oxide. **Proceedings of the National Academy of Sciences**,v. 94, p.11875-11880, 1997.