

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

**EFEITO DO RESVERATROL NA CAPACIDADE FAGOCÍTICA E NA PRODUÇÃO DE
ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO DE MACRÓFAGOS
PERITONEAIS DE RATOS MACHOS E DE FÊMEAS (DIESTRO E PROESTRO)**

JOSIMAR MARIANO BORILLE

Ponta Grossa

2011

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

**EFEITO DO RESVERATROL NA CAPACIDADE FAGOCÍTICA E NA PRODUÇÃO DE
ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO DE MACRÓFAGOS
PERITONEAIS DE RATOS MACHOS E DE FÊMEAS (DIESTRO E PROESTRO)**

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)

Ponta Grossa

2011

B734e Borille, Josimar Mariano
Efeito do Resveratrol na capacidade fagocítica e na produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio de macrófagos peritoneais de ratos machos e de fêmeas (Diestro e Proestro) / Josimar Mariano Borille. Ponta Grossa, 2011.
112 f.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas – área de concentração Biologia Evolutiva), Universidade Estadual de Ponta Grossa e Universidade Estadual do Centro - Oeste.

Orientadora: Profa. Dra. Carla Cristine Kanunfre

1. Macrófagos. 2. Resveratrol. 3. 17 β -Estradiol. 4. Dimorfismo sexual. 5. Antioxidantes. I. Kanunfre, Carla Cristine. II. T.

CDD: 575



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. 05/2011

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 **JOSIMAR MARIANO BORILLE**.

Aos vinte e nove 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) **JOSIMAR MARIANO BORILLE**, 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 Rosemari Otton e Dr. Jose Rosa Gomes. 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 do Resveratrol 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)

correções em geral

Alteração de Título: sim ☒ não ☐

Novo título: Efeito do resveratrol na capacidade fagocítica e na produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em macrófagos peritoneais de ratos: Estudo comparativo entre machos e fêmeas.

Prof^a Dr^a Carla Cristine Kanunfre

Prof^a Dr^a Rosemari Otton

Prof. Dr. Jose Rosa Gomes

*“A mente que se abre a uma nova idéia, jamais
voltará ao seu tamanho original” – Albert*

Einstein

Dedicatória

*Aos meus pais por sempre me incentivarem na vida acadêmica e ao meu esposo
pelo carinho e compreensão nos momentos de minha ausência.*

Agradecimentos

À Deus primeiramente, por conceder-me o dom da vida e a possibilidade de trilhar caminhos como este e muitos outros , colocando-me ao lado de pessoas especiais e importantes nesta e em outras etapas de minha vida.

Aos meus pais, por terem sido base de minha educação e formação, em especial ao meu pai que foi meu educador e alfabetizador durante os primeiros anos escolares. Tudo que me ensinaram ao longo dos anos é hoje o que sou, e só tenho a agradecer e dizer que amo vocês.

A professora Carla C. Kanunfre, por ter compartilhado comigo seus valiosos conhecimentos científicos, me mostrando os caminhos da ciência e da pesquisa e também por ter sempre uma palavra de carinho e estímulo nas horas difíceis, levarei comigo seu exemplo de dedicação, competência, profissionalismo e amizade. Obrigado!

A Camila Juraszeck pela amizade em todos os momentos do mestrado, afinal com um amigo caminhando ao nosso lado, tudo se torna mais fácil.

A todos os professores do programa de pós-graduação.

Ao professor José Rosa Gomes, pelo auxílio na parte inicial dos experimentos.

A professora Márcia Venâncio Marcon, pelo auxílio em algumas análises.

Ao professor Roberto Artoni, pela sua sempre disposição em ajudar.

A Zoli de Oliveira, querida secretária por estar sempre pronta à ajudar.

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

A Willian e Lucas (Curso de Enfermagem) que participaram de alguns momentos dessa pesquisa.

Aos membros da banca de avaliação, pelas correções e contribuições, sempre bem vindas!

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

LISTA DE FIGURAS DA DISSERTAÇÃO

Figura 1. Estrutura química dos isômeros trans-resveratrol e cis-resveratrol.....	35
Figura 2. Modelo de pontos de regulação por compostos bioativos, como o do resveratrol em macrófagos, interferindo nas vias de sinalização dos fatores de transcrição NF-kB e AP-1.....	41

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

Figura 1. Viabilidade celular dos macrófagos de ratos machos e fêmeas proestro tratados com resveratrol, quercetina e 17 β -estradiol.....	85
Figura 2. Porcentagem de produção de óxido nítrico (NO) basal por macrófagos de ratos machos e fêmeas tratados com resveratrol, quercetina e 17 β -estradiol	86
Figura 3. Porcentagem de produção de óxido nítrico (NO) induzida por LPS por macrófagos de ratos machos e fêmeas tratados com resveratrol, quercetina e 17 β -estradiol.	87
Figura 4. Porcentagem de produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) induzida por LPS por macrófagos de ratos machos e fêmeas, tratados com resveratrol, quercetina e 17 β -estradiol.....	88
Figura 5. Porcentagem de fagocitose à partículas não opsonizadas por	

macrófagos de ratos machos e fêmeas, tratados com resveratrol, quercetina e 17 β -estradiol.....	89
--	----

Figura 6. Porcentagem de fagocitose à partículas opsonizados por macrófagos de ratos machos e fêmeas, tratados com resveratrol, quercetina e 17 β -estradiol	90
---	----

LISTA DE TABELAS DA DISSERTAÇÃO

Tabela 1. Principais atividades biológicas do resveratrol.....	38
Tabela 2. Delineamento experimental em função dos grupos.....	48
Tabela 3. Resumo dos efeitos do resveratrol na funcionalidade de macrófagos de ratos machos, fêmeas em diestro e proestro.....	92

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO

Tabela 1. Peso corporal, parâmetros bioquímicos e hormonais entre ratos machos e fêmeas (diestro e proestro) de 110-130 dias.....	82
Tabela 2. Comparação entre a produção de NO basal e a produção induzida por LPS de macrófagos de ratos machos e fêmeas (diestro e proestro).....	83
Tabela 3. Produção de H ₂ O ₂ induzida por LPS de macrófagos de ratos machos e fêmeas (diestro e proestro).....	84

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO.....	15
2. OBJETIVOS.....	18
2.1 OBJETIVO GERAL.....	18
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
3.1 FILOGENIA DOS MACRÓFAGOS – NOÇÕES GERAIS.....	20
3.2 ONTOGENIA DE MACRÓFAGOS.....	22
3.3 IMUNIDADE E MACRÓFAGOS.....	23
3.3.1 <i>Funções dos macrófagos.....</i>	<i>25</i>
3.3.1.1 <i>Fagocitose.....</i>	<i>27</i>
3.3.1.2 <i>Produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio.....</i>	<i>29</i>
3.4 ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESAS ANTIOXIDANTES.....	31
3.5 RESVERATROL.....	34
3.5.1 <i>A Molécula.....</i>	<i>34</i>
3.5.2 <i>Atividades biológicas.....</i>	<i>35</i>
3.5.3 <i>Biodisponibilidade e toxicidade</i>	<i>38</i>
3.5.4 <i>Efeitos em macrófagos.....</i>	<i>40</i>
3.6 DIMORFISMO SEXUAL NA RESPOSTA IMUNE DE MACRÓFAGOS.....	42
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	47
4.1 REAGENTES.....	47
4.2 ENSAIO BIOLÓGICO.....	47
4.2.1 <i>Delineamento experimental</i>	<i>47</i>
4.2.2 <i>Coleta do sangue, obtenção de soro, e determinação de parâmetros: hormonais (17-B estradiol) e bioquímicos (glicose, colesterol e triglicerídeos).....</i>	<i>49</i>
4.2.3 <i>Obtenção de macrófagos peritoneais.....</i>	<i>50</i>
4.3 AVALIAÇÃO DO EFEITO RESVERATROL, QUERCETINA E ESTRADIOL	

NA VIABILIDADE CELULAR.....	50
4.4 PARÂMETROS AVALIADOS DA FUNCIONALIDADE DE MACRÓFAGOS.....	51
4.4.1 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio por macrófagos.....	51
4.4.1.1 Determinação da produção de NO.....	52
4.4.1.2 Determinação da produção de H_2O_2	53
4.4.2 Ensaio de fagocitose.....	54
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	55
5. RESULTADOS.....	56
5.1 CAPÍTULO I – ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS DO RESVERATROL NA CAPACIDADE FAGOCÍTICA E PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATOS MACHOS E DE FÊMEAS.....	57
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	91
7. CONCLUSÃO.....	95
REFERÊNCIAS.....	97

RESUMO

O resveratrol é uma fitoalexina encontrada em várias plantas, como por exemplo, na uva (*Vitis vinifera*), sintetizado em resposta a injúrias por ataques fúngicos ou mecânicos e ainda pela ação da radiação ultravioleta. Atualmente este composto tem sido alvo de interessantes pesquisas, devido às propriedades que já lhe foram atribuídas, tais como antioxidante, antiinflamatória, antitumoral e mais recentemente fitoestrogênica. Sua ação antioxidante já é bem conhecida e lhe é conferida por sua capacidade de captar radicais livres produzidos pelas células ou mesmo interferir em vias de sinalização que culminam na produção de radicais livres ou de sua detoxificação através de enzimas antioxidantes. Além disso, é sabido que o resveratrol apresenta atividade fitoestrogênica, por ser uma molécula similar ao hormônio estrogênio. A ingestão de compostos bioativos pela dieta é importante, pois estes exercem efeitos moduladores em geral, inclusive sobre as respostas imunes. Os macrófagos são células do sistema imune que fazem parte do sistema mononuclear fagocitário, que constitui a primeira linha de defesa frente a agentes infecciosos. Diversos autores já relataram que os macrófagos expressam receptores para estrogênio e, por conseguinte, são reguladas por este hormônio. Assim este estudo teve por objetivo investigar o efeito de resveratrol na funcionalidade de macrófagos peritoneais de ratos, fazendo um estudo comparativo entre machos e fêmeas. Os macrófagos foram obtidos por laparotomia mediana da cavidade peritoneal de ratos *Wistar* distribuídos em três grupos: 1) machos, 2) fêmeas em diestro e 3) fêmeas em proestro, sendo as fêmeas previamente identificadas quanto a fase do ciclo estral por análise de microscopia do material vaginal. Os macrófagos em meio de cultura RPMI 1640 suplementado com soro fetal bovino (10%) foram semeados em placas de cultivo e incubados em estufa de atmosfera úmida com 5% de CO₂ por 2 horas. Após completa adesão, as células foram tratadas pelo período de 24 horas com resveratrol 5 e 10 µM, quercetina 5 e 10 µM (controle de atividade antioxidante) e 17β-estradiol 0,01 e 10 nM (controle de atividade estrogênica). Na sequência avaliou-se a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, bem como a capacidade fagocítica dos macrófagos tratados. O resveratrol nas concentrações de 5 e 10 µM inibiu significativamente a produção de óxido nítrico (NO) avaliada utilizando-se o reagente de Griess e a produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) determinada pelo emprego do reagente *xylene orange*. Todavia o resveratrol não alterou a capacidade fagocítica dos macrófagos às partículas de zimosan opsonizadas e não opsonizadas que foi avaliada por microscopia óptica. A inibição da produção de NO e H₂O₂ pelo resveratrol foi similar entre os grupos. Esse efeito inibitório na produção de NO e H₂O₂ foi também observado para a quercetina. Já os tratamentos com 17β-estradiol reduziram a produção de NO e H₂O₂ induzida por LPS apenas dos macrófagos de ratos machos. Comparado com a quercetina e com o 17β-estradiol, o resveratrol demonstrou ter efeito antioxidante mais acentuado do que fitoestrogênico. De fato, os efeitos imunossupressores do resveratrol, observados neste estudo, corroboram com o descrito potencial antioxidante e antiinflamatório deste composto. Todavia observou-se que o efeito do resveratrol pode ser diferente entre os grupos, sendo que machos e fêmeas em diestro respondem de maneira similares aos tratamentos com resveratrol, que por sua vez diferem da resposta das fêmeas em proestro, inferindo-se assim a existência de uma pré-modulação pelo 17β-estradiol a qual esses grupos estavam expostos. Entretanto outros estudos se fazem necessários para comprovar esta observação.

Palavras-chaves: Macrófagos, Resveratrol, 17β-Estradiol, Dimorfismo Sexual, Antioxidantes

ABSTRACT

Resveratrol is a phytoalexin found in several plants, like grapes (*Vitis vinifera*), synthesized in response to injury, attack by fungus, mechanical action and also by ultraviolet radiation. Currently this bioactive compound has been the subject of interesting research, due to some properties that have already been assigned such as antioxidant and phytoestrogen. Its antioxidant activity is well known and is conferred by its ability to capture free radicals produced by cells or to interfere with signaling pathways of free radical production and detoxification. Furthermore, it is known that resveratrol exhibits characteristics of phytoestrogens, being molecularly similar to oestrogen. The intake of bioactive compounds in the diet is important because they exert effects on immune responses. Macrophages are cells in our immune system that are constituents of the mononuclear phagocytic system, which is our first line of defense against infectious agents. Several authors have reported that these cells express receptors for oestrogen hormones, and are regulated by these. So this study aimed to investigate the effect of resveratrol on the functionality of rat's peritoneal macrophages, making a comparative study between males and females. Macrophages were obtained median laparotomy from the peritoneal cavity of Wistar rats divided into 3 groups (males, females in diestrus and proestrus females). Macrophages in culture medium RPMI 1640 supplemented with fetal calf serum (10%) were seeded in culture plates and incubated in an incubator with humid atmosphere of 5% CO₂ for 2 hours. After complete adhesion, the cells were treated for a period of 24 hours with 5 and 10 µM resveratrol, quercetin 5 and 10 µM (control of antioxidant activity) and 17β-estradiol 0.01 nM and 10 nM (control of estrogenic activity). Afterwards the production of reactive oxygen and nitrogen were evaluated as well as the phagocytic capacity of macrophages treated. Resveratrol 10 µM significantly inhibited the: production of nitric oxide (NO) measured using the Griess reagent and production hydrogen peroxide (H₂O₂) determined by use of reagent *xylene orange*. However the resveratrol didn't change the phagocytic capacity under opsonized and nonopsonized particles assessed by optical microscopy. The inhibition of NO and H₂O₂ production by resveratrol was homogeneous among the groups. This inhibitory effect on NO production and H₂O₂ was also observed for quercetin. The treatment with 17β-estradiol reduced production of NO and H₂O₂ induced by LPS only for macrophages in rats males. The immunosuppressive effects of resveratrol corroborate the described anti-inflammatory and antioxidant potential of this phenolic compound. Resveratrol in this study, compared to 17β-estradiol and quercetin, shown to have antioxidant effects stronger than phytoestrogens. It was observed yet that its effect may vary between groups, and males and females in diestrus respond similarly to treatment with resveratrol and females in proestrus, the answer is different, thereby displaying a pre-modulation by 17β-estradiol which these groups were exposed. However, in future, these results will need to be confirmed.

Key - words: Macrophages, Resveratrol, 17β-Estradiol, Sexual Dimorphism, Antioxidants

1. INTRODUÇÃO

A função do sistema imune é a de defesa do corpo contra agentes invasivos, sendo esse regulado por inúmeros fatores, como por exemplo, a dieta. De fato, estudos demonstram que a alimentação tem direta implicação na funcionalidade das células do sistema imune (CHANDRA, 2002). Estudos epidemiológicos mostram que o aumento do consumo de alimentos de origem vegetal influencia positivamente a saúde, enquanto estudos *in vitro* e *in vivo* em modelo animal elucidam os mecanismos pelos quais compostos bioativos, presentes nos alimentos de fonte vegetal, atuam na manutenção da saúde e na redução do risco de doenças (BASTOS; ROGERO; ARÊAS, 2009).

Dentre os diferentes componentes de nossa dieta estão os compostos fenólicos. Estes compostos bioativos representam um grande grupo de constituintes de plantas com diferentes estruturas químicas e que, por sua vez, podem modular as respostas imunes celulares (MEDEIROS; MAITELLI; NINCE, 2007). Um importante composto fenólico presente em plantas é o resveratrol.

O resveratrol é um dos principais compostos fenólicos encontrado na uva (*Vitis vinifera*). Muitas são as propriedades que vem sendo atribuídas a esse composto, tais como antioxidante, antiinflamatória, antitumoral e antifúngica e recentemente fitoestrogênica (RATNA; SIMONELLI, 2002). Dentre essas, destacam-se a capacidade antioxidante, que lhe é conferida por inibir a produção de radicais livres nas células ou captar os radicais livres já produzidos (ARCE et al., 1998).

Os biocompostos que apresentam estrutura semelhante aos estrogênios, como é o caso do resveratrol, atualmente têm sido muito pesquisados, não somente

por suas ações estrogênicas, pois têm sido empregados na terapia de reposição hormonal da menopausa, mas também por suas outras aplicações terapêuticas como a de fator de proteção às doenças inflamatórias e doenças cardiovasculares, devido em grande parte a sua propriedade antioxidante (CLAPAUCH et al., 2002).

Células do sistema imunitário, como os macrófagos, constituem a primeira linha de defesa do organismo, sendo componentes da linhagem fagocítica mononuclear. Entre as diversas funções realizadas pelos macrófagos, podemos citar a fagocitose e a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERO e ERN, respectivamente). Nos processos inflamatórios como na defesa frente às infecções, os macrófagos produzem radicais livres (RL) a fim de destruir agentes patogênicos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008). Os macrófagos podem ser regulados por inúmeros fatores, e como já foi demonstrado que macrófagos expressam receptores para hormônios esteroidais, estes estão envolvidos na regulação da resposta imune (MANIKANDAN et al., 2009).

As evidências de que os esteróides sexuais têm efeito imunomodulador são encontradas na literatura desde a década de 80 (BUKOVSKY et al., 1993) sendo comprovado que estes podem regular o número de células do sistema imune, as produções de citocinas e mediadores inflamatórios, bem como aspectos da diferenciação celular (MEDEIROS; MAITELLI; NINCE, 2007). De fato, estudos clínicos e experimentais, com humanos e animais, têm demonstrado que o dimorfismo sexual produz respostas imunológicas diferentes, sendo que fêmeas apresentam uma resposta imune humoral e celular mais efetiva (GAILLARD; SPINED, 1998; BOUMAN et al., 2005) e uma maior resistência a infecções bacterianas e virais quando comparada aos machos (MILLER; HUNT, 1996), todavia

apresentam maior incidência de doenças auto-imunes (GAILLARD; SPINEDI, 1998; BOUMAN et al., 2005). Assim, enquanto os estrogênios parecem estimular as respostas imunes, os androgênios mostram uma tendência contrária (CUTOLO et al., 2004).

Crohon et al. (1999) demonstraram que a resposta imune de macrófagos segue o dimorfismo sexual. Face ao exposto nossa hipótese foi: “Compostos bioativos, como o resveratrol com ampla ação biológica, podem modular a resposta imune de macrófagos com efeitos que podem diferir entre os sexos, devido a sua propriedade estrogênica”.

Este trabalho foi realizado em parceria e cooperação com o trabalho de Camila Juraszeck. Qualquer semelhança entre ambos foi de comum acordo entre as autoras e a orientadora Prof^a Carla Cristine Kanunfre.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o efeito do resveratrol na capacidade fagocítica e na produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio em macrófagos peritoneais de ratos machos e de fêmeas em diestro e proestro.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Classificar as fêmeas de ratos quanto à fase do ciclo estral, em diestro ou proestro;
- Caracterizar ratos machos e fêmeas (em diferentes fases do ciclo estral) quanto à variação do peso corporal, parâmetros bioquímicos (glicose, colesterol e triglicerídeos) e concentração de 17β -estradiol sérica;
- Avaliar o efeito dos compostos resveratrol e quercetina (5 e 10 μM) e 17β -estradiol (0,01 ηM e 10 ηM) na viabilidade dos macrófagos de ratos machos e fêmeas, na presença e ausência de lipopolissacarídeos (LPS);
- Avaliar o efeito do resveratrol na capacidade fagocítica de macrófagos de ratos machos e de fêmeas em diferentes fases do ciclo estral;

- Avaliar o efeito do resveratrol na produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (peróxido de hidrogênio e óxido nítrico, respectivamente) por macrófagos de ratos machos e em fêmeas em diferentes fases do ciclo estral.
- Relacionar os efeitos do resveratrol nos macrófagos de ratos machos e de fêmeas (diestro e proestro) em função dos diferentes níveis hormonais.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 FILOGENIA DOS MACRÓFAGOS – NOÇÕES GERAIS

Ao longo da evolução, os animais multicelulares têm sido infectados por microrganismos e assim desenvolveram uma série de respostas que constituíram seus sistemas de defesas. Tais sistemas de defesa provavelmente iniciaram-se com os organismos unicelulares, com o aproveitamento de peptídeos tóxicos para impedir a invasão de micróbios, sendo que esse tipo de resposta ainda pode ser observado em eucariotos simples e em outros animais (TRAVIS, 2009).

Assim a imunidade propriamente dita tem sua origem nos eucariotos primitivos, como a ameba, que necessitava discriminar o que seria alimento e o que seriam outras amebas. É provável assim que em certo momento da evolução tenha existido um receptor de superfície específico nas amebas que atuou para reconhecer o alimento que poderia ser englobado e garantir sua sobrevivência (JANEWAY et al., 2002).

O fato de que todos os vertebrados e muitos invertebrados possuem populações de células fagocíticas, que tem muito em comum com as amebas, nos leva a acreditar que as amebas possam ter ocupado a cavidade celômica dos organismos multicelulares primordiais, atuando como células de defesa, uma forte evidência de que essas células seriam as prováveis ancestrais dos macrófagos (JANEWAY et al., 2002).

Nos invertebrados como poríferos, cnidários e platelmintos, que não possuem sistema circulatório definido, há células fagocíticas percorrendo o corpo atuando na defesa do hospedeiro, bem como nas funções de nutrição e excreção. Já nos celomados que possuem sistema circulatório, como anelídeos (coelomócitos), artrópodes e moluscos (hemócitos), as células fagocíticas migram pelo sistema circulatório, todavia tornam-se mais especializadas (leucócitos) e acredita-se que tenham originado uma infinidade de tipos celulares específicos na reatividade imune (CARVALHO; COLLARES-BUZZATO, 2005).

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 unidos mecanicamente, eles se tornam necróticos em 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 às células fagocitárias (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Nos moluscos, as células fagocíticas, além de ingerirem partículas e microorganismos, são responsáveis pelo 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).

Os macrófagos foram primeiramente descritos por Elie Metchnikoff, no início do século XIX. Esse 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/monócitos e polimorfonucleares (CARVALHO; COLLARES-BUZZATO, 2005).

3.2 ONTOGENIA DOS MACRÓFAGOS

Quanto à origem dos macrófagos, esta se dá ainda na vida embrionária no saco vitelínico. No 2º mês de gestação no homem e no 7º dia no camundongo, observam-se células hematopoéticas diferenciadas, entre elas os fagócitos mononucleares. No 3º mês de gestação no homem e no 10º dia em camundongos, as células sanguíneas se formam no fígado e no baço. Posteriormente as células hematopoéticas colonizam a medula óssea, onde residem durante toda a vida adulta dos mamíferos (CARVALHO; COLLARES-BUZZATO, 2005).

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 (CFU-GM). Estas células originam os pró-monócitos. Os pró-monócitos,

por sua vez, dão origem aos monócitos, que saem da medula óssea e ganham a circulação sanguínea (NELSON; JOW, 1990; NEVEU, 1986).

Os monócitos permanecem na circulação por cerca de 1-3 dias (NELSON; JOW, 1990; NEVEU, 1986), e 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).

3.3 IMUNIDADE E MACRÓFAGOS

As respostas da imunidade natural e adquirida são componentes de um sistema integrado de defesas do hospedeiro no qual, numerosas células e moléculas funcionam cooperativamente. Esse sistema é conhecido por sistema imune, e essas duas respostas envolvem tipos celulares e mecanismos distintos (PUKA et al., 2005).

A imunidade natural ou inata está presente desde quando o indivíduo nasce. É o mecanismo de defesa que existe antes mesmo da exposição à qualquer substância estranha (SEADI, 1998). Seus mecanismos são rápidos e reagem do mesmo modo a infecções repetidas. As células e as moléculas da imunidade inata identificam classes comuns de patógenos e as destroem com mecanismos que se conservaram ao longo do processo evolutivo e são continuamente úteis (PARHAM, 2001).

São componentes da imunidade inata: (1) barreiras físicas e químicas, tais como epitélios e substâncias antimicrobianas produzidas nas superfícies epiteliais; (2) células fagocíticas como neutrófilos e macrófagos e células matadoras naturais (NK- Natural Killer); (3) proteínas do sangue, incluindo os membros do sistema complemento e outros mediadores da inflamação; e (4) citocinas que regulam e coordenam muitas atividades das células da imunidade inata (MEDZHITOV; JANEWAY, 1997).

A resposta imune inata não só exerce uma função protetora importante, como também serve para iniciar e regular a subsequente resposta imune adquirida. Assim a imunidade adquirida desenvolve-se como uma resposta a infecção e se adapta a ela, cuja principal característica é o desenvolvimento da memória imunológica. As características que definem a imunidade adquirida são: 1) a grande especificidade para distintas macromoléculas; 2) a capacidade de “lembrar” e responder mais vigorosamente as repetidas exposições ao mesmo microrganismo e 3) os linfócitos e seus produtos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Os macrófagos são células fagocitárias que desempenham papéis importantes na imunidade inata e adaptativa. Quando ativados por produtos microbianos fagocitam e destroem microorganismos, secretam citocinas pró-inflamatórias e apresentam antígenos aos linfócitos T-auxiliares (JANEWAY et al., 2002).

O macrófago é uma célula que se encontra presente em todos os tecidos do organismo, pertencente à linhagem fagocítica mononuclear, que inclui os monócitos sanguíneos, os fagócitos residentes nos tecidos ou fixados à camada endotelial de

capilares sanguíneos e os fagócitos “perambulantes” – pulmonares e peritoneais (ROITT; BROSTOFF; MALE, 1999).

Macrófagos ao contrário dos neutrófilos, não são terminalmente diferenciados e podem sofrer divisão celular no sítio inflamatório. Sendo assim, estas células são dominantes nos estágios mais tardios da resposta imunológica natural (PUKA et al., 2005)

3.3.1 Funções dos macrófagos:

Os macrófagos estão envolvidos no processo fisiológico direto da destruição de agentes invasores. Quando ativados por produtos microbianos fagocitam e destroem microrganismos, secretam citocinas pró-inflamatórias e apresentam antígenos aos linfócitos T-auxiliares (DIA; BERHOW; MEJIA, 2008).

Geralmente macrófagos ativados são um pouco maiores que os não ativados (residentes), principalmente devido ao aumento do volume citoplasmático (STITES; TERR, 1992). Também apresentam atividade metabólica, motilidade e atividade fagocítica rapidamente 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, modificam-se propriedades como a taxa de endocitose e a fusão de lisossomos com vacúolos endocíticos (VENKATA-REDY; GANGADHARAN, 1992).

Os macrófagos podem ser ativados por diversos mecanismos como o contato direto com: 1) microorganismos ou partículas inertes; 2) lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos; 3) produtos do próprio tecido danificado e 4) com componentes protéicos do sistema complemento ou da coagulação sanguínea, bem como por certas citocinas que podem ser secretadas por linfócitos que estejam ao redor (STITES; TERR, 1992).

O LPS é um glicolípido 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 1 (IL-1), IL-6, IL-8 e IL-12. Em resposta ao LPS, os macrófagos secretam uma ampla variedade de outros mediadores de resposta biológica, incluindo fator ativador de plaquetas, prostaglandinas, enzimas e RL, como o óxido nítrico (RAETZ, 1990; COHEN, 2002).

Além de funcionarem como células fagocíticas e apresentadoras de antígenos, os macrófagos secretam uma variedade muito grande de substâncias que exercem influência acentuada sobre outras células e estrutura dos tecidos, particularmente no processo inflamatório. Entre essas substâncias existe um número enorme de produtos como enzimas lisossômicas, collagenases, elastases, lisozima, fatores de complemento, como C2, C3, C4, C5 e o fator B, interferon gama (INF- γ), prostaglandinas e leucotrienes. Algumas dessas substâncias são secretadas continuamente, enquanto outras somente são secretadas após ativação (DIAS DA

SILVA; MOTTA, 2003). Nos processos inflamatórios como na defesa frente às infecções os macrófagos produzem RL a fim de destruir agentes patogênicos (GARCIA, 2000). Durante a fagocitose essa produção torna-se mais intensa.

3.3.1.1 Fagocitose

A fagocitose pode ser definida como um processo ativo de englobamento de partículas grandes ($>0,5\ \mu\text{m}$ de diâmetro) dependente de energia. A destruição dos microrganismos ocorre em vesículas formadas na fagocitose, e dessa maneira, os mecanismos de destruição, que poderiam causar lesão, são isolados do restante da célula (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

A fagocitose pode ser dividida em duas fases: inicialmente ocorre a aderência da partícula e em seguida a ingestão ou interiorização da mesma. Usualmente a partícula a ser fagocitada situa-se entre duas saliências da superfície celular ou pseudópodes e, pela fusão desses, penetra do citoplasma, ficando envolvida por parte da membrana celular que se separa e passa a envolver a partícula fagocitada, constituindo o fagossomo (DIAS DA SILVA; MOTA, 2003).

A primeira etapa da fagocitose envolve o reconhecimento do micróbio pelo fagócito, através de receptores específicos que reconhecem os micróbios. Alguns desses receptores são receptores de reconhecimento de padrão, incluindo lectinas tipo C e receptores *scavengers* (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 de manose é uma proteína também encontrada na superfície principalmente de macrófagos e células dendríticas, cujas funções incluem liberação de hidrolases extracelular, internalização de patógeno e captura de antígenos (endocitose e fagocitose) (GORDON, 2003).

Os macrófagos também apresentam receptores que reconhecem certas proteínas do hospedeiro que revestem micróbios. Tais proteínas são chamadas de opsoninas, e incluem anticorpos e proteínas do sistema complemento. Assim o revestimento de um microorganismo com moléculas que favorecem sua destruição pelos fagócitos é conhecido como opsonização. As principais opsoninas são: imunoglobulina G (IgG), frações C3b e C3bi do sistema do complemento e fibronectina. Os patógenos revestidos de anticorpos são reconhecidos por células efetoras acessórias através de receptores para a porção Fc. Receptores específicos para as proteínas opsonisadoras estão presentes na parede dos macrófagos, que se ligam ao complexo opsonina-bactéria. Algumas bactérias, como a *E. coli* e *Pseudomonas* são fagocitadas independente de serem opsonizadas, pois se ligam diretamente a receptores nos macrófagos (GORDON, 2003).

Diversos receptores que reconhecem microrganismos, tais como os Toll- like receptor (TLRs), 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 microrganismos ingeridos (BARTON; MEDZHITOV, 2003).

Quando os microrganismos são fagocitados, estes são destruídos pela fusão de lisossomos com os fagossomas e pela produção de moléculas microbicidas, que

pode ocorrer tanto através de mecanismos oxidativos, oxigênio ou nitrogênio dependentes (nos quais reativos intermediários de oxigênio e de nitrogênio são produzidos), quanto não oxidativos (hidrolases ácidas, lisozimas e proteínas catiônicas). Os produtos de oxigênio produzidos pelos macrófagos incluem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o ânion superóxido (O_2^-) e o radical hidroxila ($OH^\cdot$) enquanto os produtos de nitrogênio incluem principalmente o óxido nítrico (NO) (PIEMONTE, 2000; GODOY, 2002).

3.3.1.2 *Produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio*

A produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) pelos macrófagos ocorre principalmente durante o processo de fagocitose. Quando a fagocitose ocorre, os macrófagos englobam grandes partículas como bactérias, leveduras, células tumorais e células senescentes e, para eliminar essas partículas ingeridas, eles produzem espécies derivadas do oxigênio e nitrogênio (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Este mecanismo pelo qual as ERO são produzidas é denominado de explosão respiratória (*burst* respiratório) e incluem a formação de O_2^- , $OH^\cdot$ e outros radicais e não radicais que são agentes oxidantes e/ou facilmente conduzidos a radicais, como o H_2O_2 . Eles são muito instáveis, pois possuem de um ou mais elétrons desemparelhados, os quais podem formar espécies altamente reativas (CADENAS; CADENAS, 2002).

A geração de RL ocorre principalmente através do sistema da NADPH-oxidase, que é uma enzima de múltiplas subunidades que são reunidas nos fagócitos ativados, principalmente na membrana fagolisossômica. Esta enzima é induzida e ativada por muitos estímulos, incluindo o IFN- γ , LPS e os sinais do TLR. A função dessa enzima é reduzir o oxigênio molecular em ERO, tais como os radicais 'O_2^- , com a forma reduzida do fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo (NADPH) agindo como um cofator. O 'O_2^- é enzimaticamente dismutado em H_2O_2 pela enzima superóxido dismutase (SOD) (YAMAGUCHI; KANEDA, 1988; JOHANSSON et al., 1995; PARK et al., 1992; PARK ; BABIOR, 1992; BABIOR, 1992; SEGAL; ABO, 1993).

Os produtos do *burst* respiratório tanto 'O_2^- quanto o H_2O_2 destroem os patógenos fagocitados ou presentes no meio extracelular. A intensidade do *burst* respiratório em macrófagos depende de onde e como eles são obtidos. Macrófagos residentes, que não entraram em contato com nenhum tipo de estímulo, são pouco ativos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999).

Dentre as ERN, 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 não ativados, mas pode ser induzida em resposta a 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. Nos fagolisossomos, o NO pode combinar-se com 'O_2^- e H_2O_2 gerados para produzir radicais de peroxinitrito (ONOO^-) que podem eliminar microrganismos (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). A iNOS é expressa e continuamente ativa durante inflamações, onde está envolvida na 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 por exemplo, LPS (MONCADA et al., 1994).

Nesse sentido, a ativação dos macrófagos lhes permite, entre outras funções, destruir microrganismos, principalmente devido à produção de ERO e ERN (WOOD; AUSTYN, 1993). No entanto, os produtos microbicidas destas células não distinguem entre tecidos próprios e microrganismos, sendo assim, se esses produtos entram no ambiente extracelular em grande quantidade, eles são capazes de causar lesão tecidual e um quadro clínico denominado estresse oxidativo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997)

3. 4 ESTRESSE OXIDATIVO E DEFESAS ANTIOXIDANTES

ERO e ERN ao reagirem com macromoléculas como lipídios, proteínas e DNA geram efeitos nocivos ao organismo através de reações de oxidação induzidas pelos RL que dá-se o nome de estresse oxidativo (CADENAS; CADENAS, 2002). Este pode resultar do excesso na produção oxidante ou da depleção das defesas antioxidantes. O estresse oxidativo pode ser benéfico nos casos de infecção, quando

ocorre produção de RL por células fagocitárias, como os macrófagos, para destruir microrganismos invasores (LEITE; SARNI, 2003).

Uma das consequências da produção excessiva de RL na célula é a peroxidação lipídica. Segundo, Frankel, Waterhouse e Kinsella (1993) algumas das consequências potenciais da peroxidação dos lipídios são: a interrupção das funções relacionadas com a membrana (receptores, enzimas, permeabilidade); as modificações das lipoproteínas de baixa densidade (LDL), intensificando a aterogênese; as alterações funcionais das plaquetas; as modificações na funcionalidade dos macrófagos; alteração da cascata do ácido araquidônico; polimerização protéica; precursores da aterogênese e mutação do DNA.

Todavia, além de seu efeito citotóxico, os RL atuam como mensageiros das vias de sinalização intracelular das células inflamatórias. O fator nuclear *kappa* B (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. A ativação do NF- κ B, por exemplo, é induzida pelo H₂O₂ e bloqueada por vários antioxidantes, incluindo a vitamina E (LEITE; SARNI, 2003).

A produção contínua de RL durante os processos metabólicos e funcionais (como acontece para macrófagos) leva ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidante que tem por função impedir ou amenizar danos ao organismo (SIES; STAHL, 1995).

Em nosso organismo existem sistemas especializados de defesas antioxidantes. Os antioxidantes são agentes responsáveis pela inibição e/ou redução das lesões causadas pelos RL nas células. A ação antioxidante nas células pode ser promovida por sistemas enzimáticos endógenos e não enzimáticos endógenos e exógenos. Estes constituem as denominadas defesas antioxidantes do organismo (SIES; STAHL, 1995).

Os sistemas enzimáticos endógenos incluem enzimas como a SOD, catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPX) entre outras. Tais enzimas encontram-se no interior das células, onde é utilizado o oxigênio e agem especificamente contra ERO (CADENAS; CADENAS, 2002). A SOD elimina o $\cdot\text{O}_2$ produzindo H_2O_2 , sobre o qual atua a CAT e a GPX, decompondo-se em oxigênio e água (SIES; CADENAS, 1985; GARCÍA, 2000). A SOD também previne a conversão do NO em suas formas oxidativas (LEITE; SARNI, 2003).

Pelo fato de que no estresse oxidativo há uma eficiência parcial do sistema antioxidante endógeno do organismo humano, torna-se necessária a contribuição de antioxidantes exógenos, que são obtidos através da dieta (PIETTA; SIMONETTI; MAURI, 1998). Os alimentos, principalmente as frutas, verduras e legumes, contêm agentes antioxidantes, como as vitaminas C, E e A, a clorofilina, a coenzima Q, os compostos fenólicos, os flavonóides, os carotenóides, a curcumina e outros que são capazes de restringir a propagação das reações em cadeia e as lesões induzidas pelos RL (STAVRIC, 1994; FOTSIS et al., 1997; POOL-ZOBEL et al., 1997).

3.5 RESVERATROL

3.5.1 A molécula

O resveratrol foi descoberto e isolado em 1940, e desde então vem ganhando destaque em pesquisas e número de citações. Trabalhos com este composto vêm crescendo em grandes proporções nas últimas décadas (BAUR et al., 2006).

O resveratrol foi primeiramente isolado de raízes da planta *Polygonum cuspidatum* (Kojo kon) utilizada amplamente na medicina popular no oriente, sua ocorrência também é vista em algumas árvores incluindo o eucalipto, em algumas flores como o *Veratrum grandiflorum* e *Veratrum formosanum*, em amendoins, amoras e também está presente em uvas (*Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*) (PERVAIZ, 2003). Na uva o resveratrol é sintetizado na casca como resposta ao estresse causado por ataque fúngico, dano mecânico ou por irradiação de luz ultravioleta (ARCE et. al., 1998). O precursor do resveratrol é o aminoácido fenilalanina e a enzima estilbeno sintetase catalisa a conversão deste em resveratrol (JEANDET et al., 2002).

O resveratrol é um composto fenólico que pertence à classe dos estilbenos. A estrutura da molécula consiste em dois anéis fenólicos unidos por uma ligação dupla que permite orientações *cis* (cis-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) e *trans* (trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) (Figura 1). O isômero trans-resveratrol é convertido para cis-resveratrol em presença da luz visível (SAUTTER, et al., 2005).

A maioria dos efeitos do resveratrol tem sido atribuída a sua isoforma trans, considerada mais estável e encontrada em maiores quantidades. O *trans-resveratrol*

também é a forma comercialmente disponível e é relativamente mais estável se for protegido de pH alto e luz (SOLEAS et al.,1997). A isoforma *cis* é considerada biologicamente menos ativa, embora estudos comparativos já demonstraram efeitos semelhantes dessas duas isoformas (ORALLO, 2006).

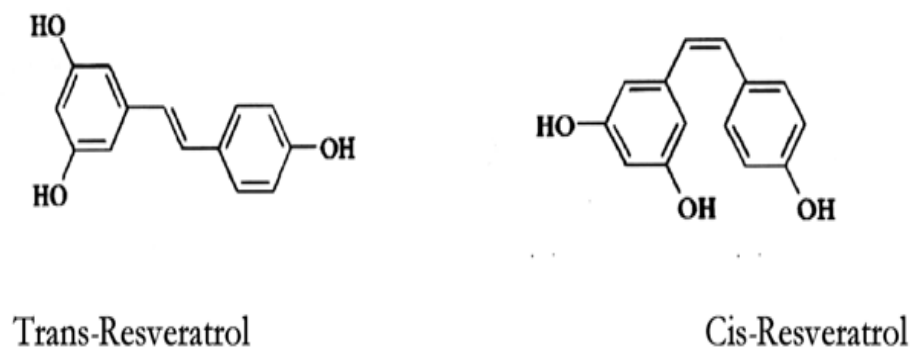


Figura 1 - Estrutura química dos isômeros *trans-resveratrol* e *cis-resveratrol*

Fonte: SAUTTER et al. (2005)

3.5.2 Atividades biológicas

O uso medicinal do vinho pelo homem tem sido uma prática que data mais de 2.000 anos. Importantes civilizações do mundo ocidental como os egípcios, os gregos e os romanos, e do mundo oriental como os hindus, fizeram uso do vinho tinto como um remédio para o corpo e para a alma. Médicos eminentes da antiguidade como Hipócrates, Galeno e Celsius exaltavam as propriedades medicinais do vinho e adiantaram uma interpretação razoavelmente correta dos seus mecanismos de ação (JOHNSON, 1989).

Estudos epidemiológicos sobre a dieta do Mediterrâneo sugerem que o moderado consumo de vinho é benéfico para a saúde. Dos componentes derivados do vinho, um grupo de maior interesse são os polifenóis (SAN JUAN, 2002). Um desses compostos é o resveratrol, que contribui com potencial antioxidante e desenvolve um papel importante na prevenção de doenças inflamatórias e cardiovasculares em humanos. Dados da literatura mostram que o resveratrol é capaz de impedir os danos gerados pelos ERO por agir de acordo com um mecanismo chamado *scavenger*, onde ocorre a captura direta dos RL (LEONARD et al., 2003; SOARES, 2001). O resveratrol também é capaz de aumentar a atividade de enzimas envolvidas no estresse oxidativo como a SOD, CAT e GPX de forma dose dependente (MOKNI et al., 2007).

Frankel, Waterhouse e Kinsella (1993) foram os primeiros a estudar a capacidade antioxidante do resveratrol, tendo verificado que o resveratrol protege as LDL humanas da oxidação catalisada pelo cobre. Desde então, vários estudos demonstraram, que a atividade antioxidante direta do resveratrol se deve essencialmente à sua capacidade em quelar o cobre e à sua atividade captadora de RL como já mencionado (BELGUENDOUZ et al., 1997; FREMONT et al., 2000; ZOU et al., 2000) e concluíram que o resveratrol pode prevenir o desenvolvimento da aterosclerose.

In vitro, o resveratrol parece ser capaz de induzir o relaxamento vascular por mecanismos dependentes e independentes de NO e ainda inibir muitas das reações celulares associadas à aterosclerose e inflamações tais como a expressão endotelial de moléculas de adesão e liberação de citocinas pelos leucócitos polimorfonucleares (DA LUZ; COIMBRA, 2001).

Conforme Subbaramaiah et al. (1998), a atividade antiinflamatória do resveratrol é explicada pela inibição da transcrição e atividade das ciclooxygenases (COX-1 e COX-2), inibindo também a síntese de tromboxinas, portanto atuando como anticoagulante (PACE-ASCIK, 1996; ZBIKOWSKA et al., 1999).

Outros autores relataram que o resveratrol pode também atuar de modo similar ao estrogênio e substituir parcialmente este, nos tratamentos pós-menopausa (RATNA; SIMONELLI, 2002). Estudos de Gehm et al. (1997) avaliaram a capacidade do resveratrol atuar como fitoestrógeno e obtiveram resultados satisfatórios, concluindo que este tem ações estrogênicas. Outros estudos com o mesmo propósito confirmaram esse resultado (CALABRESE, 1999).

Lu e Serrero (1999) demonstraram que o resveratrol pode atuar como um agonista parcial ao receptor de estrogênio (RE), no entanto na presença de estrogênio este atua como antagonista, levando a inibição do crescimento de células de câncer de mama.

Baur et al. (2006) ao estudarem cobaias submetidas a uma dieta hipercalórica, que posteriormente receberam doses de resveratrol relataram que os animais apresentaram maior sobrevida quando comparado aos que não receberam, apresentando menor dano hepático e menor risco de desenvolvimento de doenças cardiovasculares. Assim puderam concluir, que os animais que recebiam a dieta gordurosa e recebiam resveratrol apresentaram uma longevidade e qualidade de vida semelhante àqueles que seguiram uma dieta normal e balanceada. As principais atividades biológicas do resveratrol estão demonstradas na Tabela 1.

Tabela 1: Principais atividades biológicas do resveratrol.

Atividade Biológica	Mecanismo	Referência
ANTIOXIDANTE	1. <i>capturar RL</i>	BELGUENDOUZ et al.(1997) FAUCONNEAU
	2. <i>quelar cobre</i>	et al. (1997)
	3. <i>aumentar expressão das enzimas CAT, SOD e GPX</i>	FREMONT et al. (2000)
		ZOU et al. (2000); SOARES et al.(2001)
ANTIINFLAMÁTORIA		MOKNI et al. (2007)
	1. <i>inibir da COX e a lipoxigenase</i>	ARRICHI et al. (1982)
	2. <i>regular negativamente a expressão do TNF-α, NO, proteína C reativa, INF-γ, IL-pró-inflamatórias</i>	PINTO; GARCIA- BARRADO; MACÍAS (1999)
		HARIKUMAR; AGGARWAL (2008)
ESTROGÊNICA	1. <i>ativar ou não receptores do estrogênio – agonista ou antagonista</i>	GEHM et al. (1997)
		CALABRESE (1999)
		RATNA; SIMONELLI (2002)

3.5.3 Biodisponibilidade e toxicidade

Yu et al. (2002) relataram que o resveratrol apresenta uma baixa biodisponibilidade, seus metabólitos são o resveratrol sulfato e resveratrol glucoronídeo.

Outros autores também relatam que as concentrações de resveratrol não conjugado na corrente circulatória e tecidos após sua ingestão são relativamente baixas, menos que 2 μ M no plasma (GESCHER; STEWARD, 2003; PIGNATELLI et al., 2006).

Estudos como o de Goldberg et al. (2003) verificaram a eficiência de absorção do trans-resveratrol, bem como, dos fenólicos catequina e quercetina e descobriram que a concentração desses produtos, livres ou conjugados, quando administrados

oralmente para indivíduos saudáveis atingiram pico máximo em 30 minutos após o consumo. Concluindo que a absorção do resveratrol foi mais eficiente do que a da catequina, sendo esta mais eficiente do que a quercetina.

Vitaglione et al. (2005) demonstraram que o metabólito mais importante no soro humano é o resveratrol glucoronídeo. O resveratrol pode ser absorvido pelo intestino delgado, assim como são outros flavonóides (FREMONT, 2000). Após a absorção o resveratrol é metabolizado por enzimas no fígado, possui meia-vida plasmática de 8-14 minutos e a excreção é feita pela urina (WALLE et al., 2004).

Um estudo sobre a biodisponibilidade do resveratrol foi realizado com humanos que receberam o mesmo marcado com ^{14}C , por via oral (25 mg) ou intravenosa (0,2 mg). Ao mensurarem as taxas de absorção os pesquisadores obtiveram aproximadamente 70%, ou seja, evidenciaram uma alta absorção do resveratrol. No entanto após 1 hora de administração via oral a concentração máxima observada no plasma foi de 22 nM e na administração intravenosa em cerca de 36 – 45 nM (WALLE et al., 2004)

Carrol et al. (2002) trataram ratos com 20 mg/kg via oral de resveratrol e após 10 minutos da administração a concentração encontrada no cérebro foi de 0,46 nM, considerando-se por conseguinte a densidade do tecido cerebral 1,04 g/mL. Assim os autores concluíram que por ser o resveratrol lipossolúvel, consegue facilmente atravessar a barreira hematoencefálica e chegar ao cérebro.

Crowel et al. (2004) testando a toxicidade do resveratrol em ratos administrando de 0,3 a 3 g/kg/dia, ou seja, doses equivalentes a 21,7 – 210 g/dia em um humano de 70 kg durante 4 semanas. Dos 40 ratos utilizados, apenas 2 morreram após receberem as doses. Em humanos relatos mostram também que nenhum efeito

adverso foi observado após o consumo de 5 g/70kg em uma única dose em pesquisa realizada com 104 pacientes (BOOCOCK et al., 2007).

3.5.4 Efeito em macrófagos

Estudos com macrófagos tanto de linhagem celular quanto os obtidos de animais demonstram que resveratrol exerce efeito antioxidante. Leiro et al. (2002 e 2004), demonstraram que a produção de ERO e ERN é inibida nestas células quando tratadas com resveratrol em diferentes concentrações. Especificamente Leiro et al.,(2004) demonstraram claramente que o resveratrol nas concentrações de 1, 10 e 100µM diminuem a produção de H₂O₂ por macrófagos peritoneais de camundongos.

Azevedo et al. (2001) também descrevem a capacidade do resveratrol em agir capturando RL em cultura de macrófagos, bem como Chan et al. (2000), comprovaram esse achado confirmando a atuação do resveratrol como composto antioxidante também para células de cultura.

Zhen-Hua Ma et al. (2006) em estudos com macrófagos demonstraram que o resveratrol é capaz de inibir a produção de NO pela redução da expressão de iNOS quando estas células estão ativadas com LPS.

Em estudos *in vitro*, o resveratrol inibe a secreção de citocinas próinflamatórias pelos macrófagos, conferindo proteção específica contra o desenvolvimento de aterosclerose e outras doenças inflamatórias (DA LUZ; COIMBRA, 2001; LEIRO et al., 2004).

Todas as ações do resveratrol em macrófagos ocorrem por meio de alvos moleculares específicos, em especial através da inibição de vias importantes da resposta inflamatória, por exemplo, a ativação da via de sinalização do NF- κ B (CANCELLO; CLÉMENT, 2006).

A ativação da via de sinalização do NF- κ B ocorre pela ligação de um ligante em um receptor de superfície celular, como o receptor para o TNF- α (TNF-R) e o TLR-4 que por sua vez pode ser ativado por LPS (CANCELLO; CLÉMENT, 2006; BAUD et al., 2009).

Bastos, Rogero e Arêas (2009) propõe alguns pontos de regulação por compostos bioativos, como o resveratrol nas vias de sinalização de macrófagos, como mostrado na Figura 2.

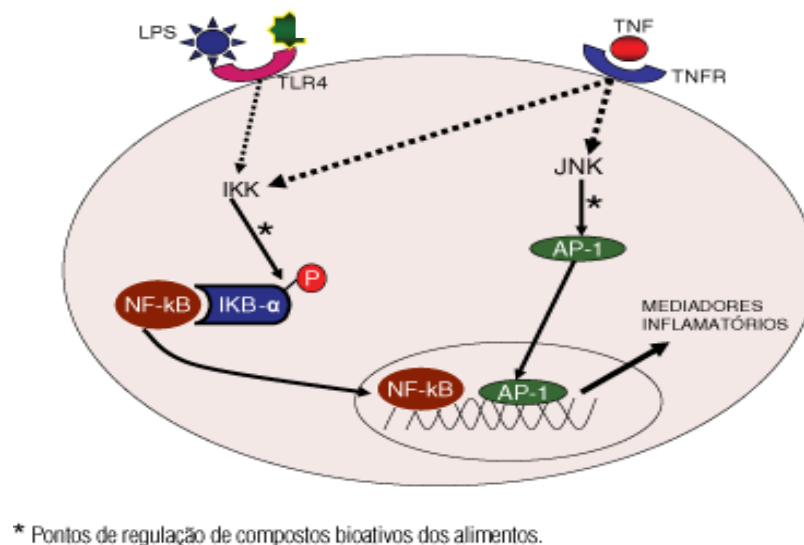


Figura 2. Modelo de pontos de regulação por compostos bioativos, como o do resveratrol em macrófagos, interferindo nas vias de sinalização dos fatores de transcrição NF- κ B e AP-1. A presença de lipopolissacarídeos (LPS) estimula a via de sinalização do fator de transcrição denominado fator nuclear kappa B (NF- κ B), enquanto a presença de TNF- α estimula tanto a via de sinalização do NF- κ B quanto da proteína-1 ativadora (AP-1). A ativação dessas vias resulta no aumento da expressão de genes que codificam para proteínas envolvidas na resposta inflamatória.

Fonte: Adaptado de BASTOS; ROGERO; ARÊAS (2009).

O resveratrol também inibe *in vitro* a expressão gênica das enzimas COX-2 e iNOS e das moléculas de adesão de superfície celular, como a molécula-1 de adesão intercelular (ICAM-1), molécula-1 de adesão de leucócitos endotelial (ELAM-1) e molécula-1 de adesão celular vascular (VCAM-1). Uma vez que os genes que codificam para essas proteínas são regulados pelo fator de transcrição NF- κ B. Sendo assim o efeito antiinflamatório do resveratrol é decorrente da sua ação supracitada sobre a via de sinalização do NF- κ B (RAHMAN; BISWAS; KIRKHAM, 2006; AGGARWAL; SHISHODIA, 2006).

3.6 DIMORFISMO SEXUAL NA RESPOSTA IMUNE DE MACRÓFAGOS

Respostas imunes mediadas por células diferenciam-se não somente quanto aos organismos de que fazem parte, seus componentes e mecanismos que são desencadeados, mas também quanto à presença de substâncias que as podem regular. Os hormônios sexuais são exemplos de substâncias imunomoduladoras que promovem respostas imunes diferenciadas entre os sexos e, por conseguinte, são responsáveis pelo dimorfismo sexual da resposta imune mediada pelos macrófagos.

De fato, muitos estudos clínicos e experimentais, com humanos e animais, têm demonstrado a existência de dimorfismo sexual das respostas imunológicas (TALAL, 1992; ANSAR-AHMED; PENHALE; TALAL, 1985). Acredita-se que a presença dos estrogênios estimule as respostas imunes, enquanto que os androgênios mostram uma tendência contrária, pois está bem estabelecido que fêmeas apresentam uma resposta imune humoral e celular mais efetiva (GAILLARD; SPINEDI, 1998; BOUMAN et al., 2005) e uma maior resistência a infecções bacterianas e virais

quando comparada aos machos (MILLER; HUNT, 1996). Todavia fêmeas apresentam maior incidência das doenças auto-imunes tais como lúpus eritematoso (GAILLARD; SPINEDI, 1998; BOUMAN et al., 2005).

Nesse sentido, não existem dúvidas de que os esteróides sexuais modulam as respostas imunes (GROSSMAN; ROSSELE; MENDENHALL, 1994). Em se tratando especificamente dos hormônios sexuais femininos, sabe-se que o estrogênio e a progesterona têm sido associados, respectivamente, com auto-imunidade e imunossupressão (CUTOLO et al., 2004).

Em 1969 foi demonstrado primeiramente que o estrogênio aumenta a atividade fagocítica de macrófagos de camundongos e na década de 80 demonstrou-se que o estrogênio aumenta o número de granulócitos humanos (células progenitoras de macrófagos) (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).

Observações de que em animais castrados e em mulheres após a menopausa, com baixos níveis de estrogênios, a resposta imune é atenuada e predispõem o organismo à invasão microbiana e infecção, vem de encontro com tal idéia (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 e moléculas de adesão

intracelular ICAM-1) e hiperresponsividade das células do organismo a estas citocinas em consequência do aumento no número de receptores e co-fatores facilitadores da ação das citocinas (KELLER et al., 2001; VERTHELYI; KLINMAN, 2000).

De fato, não resta dúvida de que as diferentes respostas imunes dependentes do sexo são atribuídas à influência de estrógenos, progesteronas e andrógenos, embora ainda têm-se pouca informação sobre os mecanismos de ação específicos desses esteróides em células do sistema imunológico. Mesmo a ação estrogênica *per se* sobre as células do sistema imune ainda não está bem esclarecida, pois apesar das descrições de seu efeito positivo do estrogênio sobre a resposta imune existem evidências sugerindo que baixas doses do hormônio estimulam a resposta mediada por células, enquanto altas doses exercem efeito oposto (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 em atividade, sendo estes dependentes da ativação celular (MEDEIROS; MAITELLI; NINCE, 2007).

De fato RE têm sido relatados em células do sistema imune 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, como os moduladores seletivos do receptor de estrogênio (SERMs). Muitos compostos de diversos grupos químicos podem ativar o RE, e hoje mais de setenta moléculas já foram descritas como pertencentes ao grupo dos SERMs, dentre as quais incluem-se os fitoestrogênios (DIEZ-PERES, 2006).

A ligação do hormônio ou dos SERMS com o RE pode conduzir a respostas celulares distintas que ocorrem por diferentes vias de sinalização, a gênômica e a não gênômica (SIMONCINI et al, 2002). Quanto à via de sinalização gênômica, 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 SERMs, 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).

Em macrófagos já foi demonstrado que ER são expressos (MANIKANDAN et al., 2009). Assim quando macrófagos estão presentes em ambientes com baixos ou altos níveis de estrógenos, estes podem responder de forma distinta quanto a sua funcionalidade, caracterizando diferenças importantes entre os sexos.

Também pela similaridade da molécula do resveratrol com o estrogênio, é importante destacar que este pode se ligar aos RE e exercer efeito imunomodulador, via esses receptores (NARENDRA et al., 2007). Como já descrito na literatura, o estrogênio é um hormônio que está envolvido na regulação da resposta imune (GAILLARD; SPINED, 1998; MILLER; HUNT, 1996; BOUMAN et al., 2005) podendo regular o número de células do sistema imune, a produção de citocinas e mediadores

inflamatórios, bem como aspectos da diferenciação celular (MEDEIROS; MAITELLI; NINCE, 2007).

Assim, as diferenças nas respostas imunológicas não estão concentradas apenas na estrutura em o que nasce já com o indivíduo (células e produtos celulares da imunidade inata) e o que ele adquire ao longo da vida (produtos da imunidade adquirida), mas também se relaciona ao ambiente no qual onde está inserido o sistema imune bem como suas células. De fato o resveratrol já tem seus efeitos antioxidantes e antiinflamatórios bem esclarecidos, no entanto, no que diz respeito ao dimorfismo sexual decorrente da regulação por hormônios esteroidais sua ação ainda não está bem compreendida.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 REAGENTES

Os reagentes resveratrol, quercetina, estradiol, lipopolissacarídeo (LPS), Zimosan e MTT foram obtidos da Sigma-Aldrich Chemical (São Diego, EUA). O dimetilsulfóxido (DMSO) foi adquirido da Biotec (São Paulo, SP, BR). O meio de cultura RPMI 1640, soro fetal bovino (SFB) e penicilina e estreptomicina foram adquiridos da Vitrocell (Campinas, BR). Os reagentes para determinação da glicose, colesterol e triglicerídeos foram adquiridos da KOVALENT (São Gonçalo, RJ, BR).

4.2 ENSAIO BIOLÓGICO

4.2.1 Delineamento experimental

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 2 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) ciclo estral.

Tabela 2: Delineamento experimental em função dos grupos.

GRUPO	SEXO	CICLO ESTRAL	Nº (ANIMAIS)
G1	Macho		12
G2	Fêmea	Diestro (baixa concentração plasmática de estradiol)	11
G3	Fêmea	Proestro (alta concentração plasmática de estradiol)	14

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 (MATTARAIA et al., 2009). A outra caixa, foi mantida afastada dos machos, no laboratório ao lado, 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 de luz por

comparação com imagens de laminário fornecido por Marcondes, Bianchi, Tanno, (2002).

A partir da formação dos grupos, os animais foram pesados em balança, para determinação de possível 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.

4.2.2 Coleta do sangue, obtenção de soro, e determinação de parâmetros hormonais (17- β estradiol) e bioquímicos (glicose, colesterol e triglicerídeos).

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 *eppendorf* 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.

4.2.3 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, 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 e novamente centrifugados. Todas as centrifugações foram realizadas a 200 g, durante 8 minutos.

Após a última lavagem, os macrófagos foram ressuspensos 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 Tripan. 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 DO EFEITO RESVERATROL, QUERCETINA E ESTRADIOL NA VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi avaliada de maneira indireta através da determinação da atividade das desidrogenases mitocondriais empregando o ensaio de redução do MTT. 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 CO₂ a 5%, para a adesão celular pelo período de 4 horas. Posteriormente os macrófagos foram tratados com: resveratrol (10 µM), quercetina controle de atividade antioxidante (10 µM) e 17β-estradiol controle de atividade estrogênica (10 nM), na presença ou ausência de LPS (10 µg/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* (5 mg/mL) em meio RPMI com 10% de SFB conforme descrito por MOSMANN et al. (1983). As células foram deixadas na estufa novamente por 30 minutos, e o sobrenadante novamente foi desprezado e então 200µL de DMSO foram adicionados ao precipitado formado (formazan), resultado da redução do MTT.

A amostra foi homogeneizada e o 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 PARÂMETROS AVALIADOS DA FUNCIONALIDADE DE MACRÓFAGOS

4.4.1 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio por macrófagos

Para avaliação do efeito do resveratrol sobre a produção de ERO e ERN por macrófagos de ratos machos e fêmeas em diestro e proestro, 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 e $10 \mu\text{M}$) não citotóxicas de resveratrol (BIANCHINI; VAINIO, 2003). Estes tratamentos foram comparados com os controles de atividade antioxidante, a quercetina (5 e $10 \mu\text{M}$) e o controle de atividade estrogênica, o 17β -estradiol em concentrações fisiológicas (0,01 e 10 nM) (YOU et al., 2003), além do controle do veículo, o DMSO na concentração de (0,5%), solvente empregado para solubilização do resveratrol, quercetina e estradiol. 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 NO e H_2O_2 .

4.4.1.1 Determinação da produção de NO:

A produção basal de NO e a induzida por LPS foi determinada de maneira indireta através da dosagem 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). A porcentagem de produção foi calculada, utilizando a seguinte fórmula: (valor de NO produzido x 100) / valor médio produzido pelo controle. Na apresentação dos gráficos os valores produzidos pelo controle foram considerados como sendo 100% para comparar com valores obtidos nos tratamentos. As porcentagens de inibição de produção de NO de cada tratamento foram calculadas pelas diferenças em relação ao controle.

4.4.1.2 Determinação da produção de H_2O_2 :

A determinação da produção de H_2O_2 foi realizada por espectrofotometria usando a técnica de *Xylenol 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 se adicionou 200 μL de solução de cor que continha 1mL do reagente 1 (25 mM de sulfato de amônio ferroso e 2,5M de Ácido Sulfúrico) e 100 mL do reagente 2 (100 mM de sorbitol e 125 μM de *Xylenol 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 expressos 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. A porcentagem de produção foi calculada utilizando a seguinte fórmula: (valor de H_2O_2 produzido x 100) / valor

médio produzido pelo controle. Na apresentação dos gráficos os valores produzidos pelo controle foram considerados como sendo 100% para comparar com os valores obtidos nos tratamentos. As porcentagens de inibição de produção de H_2O_2 de cada tratamento foram calculadas pelas diferenças em relação ao controle.

4.4.2 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 $37^\circ C$ em estufa com atmosfera úmida e 5% com CO_2 por 4 horas, para completa adesão celular. Após este período de incubação, os macrófagos foram tratados com: resveratrol (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 de meio fresco de cultivo acrescidos com uma suspensão de Zimosan opsonizados 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 de luz, 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.

Cumprido 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 com o soro 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 foram obtidas por teste de variância ANOVA – *One Way* 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 em forma de artigo científico:

Capítulo I

ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS DO RESVERATROL NA CAPACIDADE FAGOCÍTICA E PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATOS MACHOS E DE FÊMEAS

ESTUDO COMPARATIVO DOS EFEITOS DO RESVERATROL NA CAPACIDADE FAGOCÍTICA E PRODUÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS DE RATOS MACHOS E DE FÊMEAS

BORILLE, J. M. ¹; JURASZECK, C. ²; KANUNFRE, C.C. ³

RESUMO

O resveratrol é uma fitoalexina encontrada em várias plantas, como por exemplo, na *Vitis vinífera* (uva). Este composto fenólico pertence à classe dos estilbenos e tem sido alvo de interessantes pesquisas, devido a sua ação antioxidante, antiinflamatória e fitoestrogênica. **OBJETIVOS:** Este estudo teve por objetivo investigar o efeito do resveratrol na capacidade fagocítica e na produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio de macrófagos peritoneais de ratos machos e fêmeas. **METODOLOGIA:** Os macrófagos, obtidos de ratos *Wistar* distribuídos em três grupos, machos, fêmeas em diestro e fêmeas em proestro, foram tratados com resveratrol 5 e 10 μ M, quercetina 5 e 10 μ M (controle de atividade antioxidante), e 17 β -estradiol 0,01 e 10nM (controle de atividade estrogênica) pelo período de 24 horas. **RESULTADOS:** O resveratrol 5 e 10 μ M inibiu significativamente a produção de óxido nítrico (NO) e a produção peróxido de hidrogênio (H₂O₂). A capacidade fagocítica à partículas de zimosan opsonizadas e não opsonizadas não foi alterada em função do tratamento com resveratrol. Esse efeito inibitório na produção de NO e H₂O₂ foi também observado para a quercetina quando empregada na concentração de 10 μ M. Os tratamentos com 17 β -estradiol reduziram a produção de NO e H₂O₂ induzida por LPS apenas nos macrófagos de ratos machos. **DISCUSSÃO:** Os efeitos imunossupressores do resveratrol corroboram com o descrito potencial antioxidante e antiinflamatório, que pode ser devido a captura de radicais livres, a regulação da expressão de enzimas antioxidantes, a inibição da expressão de iNOS, ou diretamente sobre a via de sinalização que culminam na ativação de fatores de transcrição pró-inflamatórios como o NF-kB e AP-1. **CONCLUSÃO:** Neste trabalho, comparado aos controles, quercetina e ao 17 β -estradiol, o resveratrol demonstrou ter efeito antioxidante mais acentuado do que fitoestrogênico. No entanto observou-se efeito diferencial de resposta do resveratrol entre os grupos, sendo que machos e fêmeas em diestro respondem similarmente aos tratamentos com resveratrol diferindo de fêmeas em proestro. Entretanto estes resultados precisam ser confirmados através de outros experimentos.

Palavras - chaves: Macrófagos, Resveratrol, 17 β -Estradiol, Dimorfismo Sexual, Antioxidantes

ABSTRACT

Resveratrol is a phytoalexin found in several plants, like in *Vitis vinifera* (grape). This phenolic compound belongs to the class of stilbenes has been the subject of interesting research, due to its action antioxidant, antiinflammatory and phytoestrogen. **OBJECTIVES:** This study aimed to investigate the effect of resveratrol on the phagocytic capacity and production of species reactive oxygen and nitrogen in macrophages peritoneal macrophages of rats males and females. **METHODS:** The macrophages, obtained from Wistar rats, divided into 3 groups, males, females in diestrus and proestrus females, were treated with resveratrol 5 and 10 μ M, quercetin 5 and 10 μ M as control of antioxidant activity and 17 β -estradiol 0.01 and 10 η M as control of estrogenic activity for a 24 hours period. **RESULTS:** Resveratrol 5 and 10 μ M significantly inhibited the production of nitric oxide (NO) and the production of hydrogen peroxide (H₂O₂). The phagocytic capacity under zimosan opsonized and nonopsonized particles didn't change by the 10 μ M resveratrol treatment. This inhibitory effect on NO and H₂O₂ productions were also observed for quercetin. The 17 β -estradiol, in the other hand, significantly reduced the H₂O₂ production just in male macrophages. **DISCUSSION:** The immunosuppressive effects of resveratrol corroborate the described anti-inflammatory and antioxidant potential which may be due to capture of free radicals, or reducing the expression of enzymes of detoxified (antioxidant enzymes), or by inhibiting iNOS expression, or yet directly on the route of signaling transcription factors NF-kB and AP-1 involved in the inflammatory processes. **CONCLUSION:** In this study, compared as two controls quercetin and 17 β -estradiol, resveratrol shown to have antioxidant effects stronger than phytoestrogens. However it was observed that its effect may vary between groups, males and females in diestrus respond similarly to treatment with resveratrol and females in proestrus the answer is different. In addition this results will need to be confirmed.

Key - words: Macrophages, Resveratrol, 17 β -Estradiol, Sexual Dimorphism, Antioxidants

INTRODUÇÃO

Os macrófagos, células do sistema imune que constituem uma das primeiras linhas de defesa do nosso organismo, expressam inúmeros receptores, dentre os quais destacamos os receptores de estrogênios (RE) (SUBRAMANIAN et al., 1998; FRAZIER-JESSEN; KOVACS, 1995; MANIKANDAN et al., 2009).

A presença de RE em macrófagos indica que este hormônio exerce efeito imunomodulador (GROSSMAN; ROSSELE; MENDENHALL, 1994). Estudos mostram que os estrogênios estão envolvidos na regulação positiva da resposta imune, enquanto que os androgênios exercem efeitos opostos (GAILLARD; SPINED, 1998; BOUMAN et al., 2005). De fato, a resposta imune é mais eficiente em fêmeas do que em machos (BOUMAN et al., 2005) estando o dimorfismo sexual da resposta imune claramente evidenciado (ANSAR-AHMED; PENHALE; TALAL, 1985; TALAL, 1992) e atualmente bem estabelecido (CUTOLO et al., 2004).

Neste sentido, componentes da dieta com estrutura química semelhante aos estrogênios, denominados fitoestrogênios (FE) (KNIGHT; EDEN, 1996) podem se ligar aos RE dos macrófagos e modular sua função.

Um importante grupo constituinte da dieta são os compostos fenólicos, dentre eles o resveratrol. O resveratrol é encontrado em diversas plantas, como por exemplo, na *Vitis vinifera* (uvas), estando presente em vinhos tintos, nas concentrações aproximadas entre 1,5 – 7 mg/L (BERTELLI, 1998).

O resveratrol apresenta atividade antioxidante bem descrita que tem sido atribuída à captura de radicais livres (RL), a redução da expressão de enzimas detoxificadoras/antioxidantes e a inibição da atividade de algumas enzimas como

a lipoxigenase (ARRICHI et al., 1982; PINTO; GARCÍA-BARRADO; MACÍAS, 1999). Tendo assim, um importante papel protetor a doenças cardiovasculares, bem como regulador de níveis de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (FRANKEL; WATERHOUSE; KINSELLA, 1993).

Conforme descrito por Subbramaiah et al. (1998) o resveratrol apresenta ainda atividade antiinflamatória, explicada pela inibição da transcrição e atividade da ciclooxigenase (COX-1 e COX-2) gerada pelo composto, que inibe também a síntese de tromboxinas, portanto atuando como anticoagulante (PACE-ASCIAK, 1996; ZBIKOWSKA et al., 1999).

A similaridade química do resveratrol ao 17 β -estradiol pode conferir ao composto a atividade estrogênica, visto que esse pode se ligar aos RE (BARRY et al., 2004; NARENDRA et al., 2007) e atuar ainda em substituição ao estrogênio nos tratamentos pós-menopausa (RATNA; SIMONELLI, 2002).

Em resumo, o resveratrol apresenta muitas propriedades biológicas, dentre elas destacamos a antioxidante (MOKNI et al., 2007), a antiinflamatório (HARIKUMAR; AGGARWAL, 2008) e a estrogênica (RATNA; SIMONELLI, 2002), sendo que sua atividade imunomoduladora pode ser conferida por qualquer uma de suas propriedades.

Face ao exposto objetivou-se neste estudo investigar o efeito do resveratrol na capacidade fagocítica e produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio de macrófagos peritoneais de ratos, fazendo um estudo comparativo entre machos e fêmeas em diferentes fases do ciclo estral, pois até o momento estudos do composto relacionados ao dimorfismo sexual da resposta imune ainda não estão foram descritos.

MATERIAL E MÉTODOS

REAGENTES

Resveratrol, quercetina, 17 β -estradiol, lipopolissacarídeo (LPS), Zimosan e MTT foram obtidos da Sigma-Aldrich Chemical (São Diego, EUA). O dimetilsulfóxido (DMSO) foi adquirido da Biotec (São Paulo, BR). O meio de cultura RPMI 1640, soro fetal bovino (SFB), penicilina e estreptomicina foram adquiridos da Vitrocell (Campinas, BR). Os reagentes para determinação da glicose, colesterol e triglicerídeos foram adquiridos da KOVALENT (São Gonçalo, BR).

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Animais

Foram utilizados 36 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), com previa aprovação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UEPG, registrado sob número 03511/2010. 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.

Determinação dos grupos

Os animais foram divididos em 3 grupos, de acordo com o sexo e a fase ciclo estral. A fase do ciclo estral das fêmeas foi determinada através da avaliação do material vaginal no dia do sacrifício dos animais, cerca de 3 horas antes do início

dos experimentos. O material vaginal coletado foi estendido sobre lâminas, corado e posteriormente avaliado por microscopia de luz e comparado ao laminário já estabelecido por Marcondes, Bianchi, Tanno (2002).

Determinação do peso corporal.

Nos dias dos experimentos, os animais em jejum de 14 horas, foram pesados em balança analítica digital da marca Marte AS 200c e então sacrificados por decapitação.

Coleta do sangue e obtenção do soro

Após a decapitação dos animais realizou-se a coleta de sangue e obtenção soro (por centrifugação) para posteriores análises bioquímicas e hormonais. Os parâmetros bioquímicos avaliados foram: glicemia e lipídemia de jejum, determinados através de métodos espectrofotométricos utilizando-se sistemas enzimáticos. Os parâmetros hormonais dosados foram às concentrações séricas de 17 β -estradiol através de quimiluminescência.

Obtenção de macrófagos

A obtenção de macrófagos foi realizada por laparotomia mediana, conforme descrito por Sampaio (2000). Esses foram centrifugados e ressuspensos em meio de cultura RPMI1640 suplementados com 2 mM de bicarbonato de sódio e 10 % de soro fetal bovino. As células foram contadas em câmara de Neubauer através da técnica de exclusão por Azul de Tripán e a concentração ajustada em 4×10^6 células/mL.

ENSAIOS BIOLÓGICOS - PARÂMETROS AVALIADOS

Viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada de maneira indireta através da determinação da atividade das desidrogenases mitocondriais empregando o ensaio de redução do MTT. Os macrófagos foram semeados em placas de cultura de 96 poços na concentração de 2×10^5 cel./poço e foram incubadas em estufa de CO₂ a 5% em atmosfera úmida por 4 horas. Posteriormente os macrófagos foram tratados com: resveratrol (10 µM), quercetina como controle antioxidante (10 µM) e 17β-estradiol como controle estrogênico (10 nM), na presença ou ausência de LPS (10µg / mL) e incubadas novamente por mais 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 por espectrofotometria conforme descrito por Mosmann et al. (1983).

Funcionalidade de macrófagos

Da funcionalidade de macrófagos avaliou-se a capacidade fagocítica e a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN). As células foram semeadas em placas de 24 ou 96 poços na concentração adequada para cada experimento.

Produção de ERO e ERN

Para os ensaios de produção de ERO e ERN os macrófagos foram semeados em placas de 96 poços na concentração de 4×10^5 células/poço. Após o cultivo de 4 horas, as células foram tratadas com meio de cultivo fresco acrescidos de duas

diferentes concentrações de resveratrol (5 μM e 10 μM) (BIANCHINI E VAINIO, 2003) 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) (YOU et al., 2003), 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 24 horas os sobrenadantes das culturas foram colhidos para a determinação da produção de óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2).

Determinação de NO

A produção basal de NO e a induzida por LPS foi determinada através da concentração de nitrito (NO_2) no sobrenadante do cultivo de células tratadas, utilizando-se reagente de Griess e posteriormente avaliadas por espectrofotometria (SAMPAIO, 2000). Os resultados obtidos foram transformados em porcentagem de produção, utilizando a seguinte fórmula: (valor de NO produzido x 100 / valor médio produzido pelo controle). Na apresentação dos gráficos os valores produzidos pelo controle foram considerados como sendo 100%. As porcentagens de inibição de produção de NO de cada tratamento foram calculadas pelas diferenças em relação ao controle.

Determinação de H_2O_2

A determinação da produção de H_2O_2 foi realizada por espectrofotometria usando a técnica de *Xylenol Orange*, conforme descrito por Fabiani (2009). Os resultados obtidos foram transformados em porcentagem de produção, utilizando a seguinte fórmula: (valor de NO produzido x 100) / valor médio produzido pelo controle. Na

apresentação dos gráficos os valores produzidos pelo controle foram considerados como sendo 100%. As porcentagens de inibição de produção de H_2O_2 de cada tratamento foram calculadas pelas diferenças em relação ao controle.

Capacidade Fagocítica

Para o ensaio de fagocitose foram semeados sobre as lamínulas de vidro 2×10^5 macrófagos em placas de 24 poços. Após o período de incubação (4 horas), os macrófagos foram tratados com meio de cultivo fresco acrescidos de resveratrol (5 μ M e 10 μ M) quercetina (5 μ M e 10 μ M), 17β -estradiol (0,01 e 10 η M) e DMSO na concentração final de (0,5%) pelo período de 2 horas. A avaliação da capacidade fagocítica foi realizada pelo acréscimo de uma suspensão de Zimosan opsonizadas com soro de rato normal e não opsonizadas, 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 de luz, conforme descrito por Sampaio (2000), onde um total de 100 células por tratamento foi contado, sendo a porcentagem de células determinada pelo número de macrófagos que fagocitaram 3 ou mais partículas de Zimosan.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média. Utilizando o programa PRISMA Graph Pad 5.01, as comparações foram obtidas por teste de variância ANOVA – *One Way*. As diferenças entre os grupos foram

avaliadas pelo pós-teste de Tukey e na comparação de dois grupos isolados empregou-se o teste t.

RESULTADOS

VARIAÇÃO DO PESO CORPORAL, PARÂMETROS BIOQUÍMICOS E HORMONAIS

Conforme podemos observar na Tabela 1, em relação à variação de peso corporal, os machos apresentaram maior média de peso corporal quando comparados às fêmeas em diestro e em proestro.

Quanto aos parâmetros bioquímicos avaliados (Tabela 1) todos se encontraram dentro dos padrões de normalidade, ou seja, valores de referências para ratos sem distinção entre os sexos. Todavia, a concentração sérica de 17β -estradiol variou entre os sexos, sendo que as fêmeas em proestro apresentaram concentração sérica de 17β -estradiol maior em relação às fêmeas em diestro, que por sua vez apresentaram médias de 17β -estradiol igualmente superiores em relação aos machos, resultados que se refletem na média dos grupos conforme demonstrado na Tabela 1.

EFEITO DO RESVERATROL, QUERCETINA E 17β -ESTRADIOL NA VIABILIDADE CELULAR

O tratamento dos macrófagos obtidos de ratos machos e de fêmeas em proestro com resveratrol ou quercetina ($10\mu\text{M}$) ou 17β -estradiol (10nM) não

alterou a viabilidade celular, determinada pela avaliação da atividade das desidrogenases mitocondriais dos macrófagos, tanto na presença como ausência de LPS (Figura 1). Entretanto, observou-se um aumento significativo da atividade das desidrogenases mitocondriais em todos os grupos.

EFEITO DO RESVERATROL SOBRE A PRODUÇÃO DE NO BASAL E INDUZIDO POR LPS

A produção de NO basal e induzida por LPS foi, respectivamente, mensurada no sobrenadante da cultura de macrófagos residentes (não ativados) e ativados por LPS após 24 horas de incubação com os diferentes tratamentos (Figuras 2 e 3).

Conforme observado na Figura 2A o resveratrol nas concentrações de 5 e 10 μ M reduziu significativamente a produção de NO basal de macrófagos de ratos machos em relação ao controle. Efeito similar de redução significativa também foi observado nos tratamentos com quercetina.

A produção de NO basal de macrófagos de fêmeas em diestro (baixa concentração de 17β -estradiol) e em proestro (alta concentração de 17β -estradiol), apresentou perfil de redução semelhante ao encontrado para os machos em relação aos tratamentos com resveratrol e quercetina (Figura 2, B e C).

Quando comparadas as produções de NO basal de macrófagos de fêmeas em diestro com as de fêmeas em proestro (Figura 2, B e C), observa-se que os tratamentos com resveratrol nas concentrações de 5 e 10 μ M, bem como, com quercetina 10 μ M, reduziram significativamente a produção de NO basal, todavia

as reduções observadas para fêmeas em diestro (39% e 41%, 37%, respectivamente) foram maiores que as observadas para fêmeas em proestro (29% e 35%, 34%, respectivamente).

Em relação ao tratamento com 17β -estradiol, em ambas as concentrações utilizadas, observou-se que em todos os grupos não houveram diferenças significativas de redução da produção de NO basal em relação ao controle (Figura 2, A, B e C).

Comparando o efeito inibitório do resveratrol na produção basal de NO, através do emprego do *teste t*, entre os grupos, observamos que apenas os tratamentos com concentração de 10 μ M diferiram significativamente entre os grupos. A resposta de machos difere das de fêmeas em proestro ($p < 0,05$) mas não das fêmeas em diestro, essas por sua vez diferem de fêmeas em proestro ($p < 0,05$).

Na Figura 3, gráficos A, B e C, estão representados os resultados da produção de NO de macrófagos ativados, ou seja, a produção de NO induzida pela presença de LPS. Conforme observado o tratamento com resveratrol na concentração de 10 μ M reduziu a produção de NO em 17%, 26% e 40 % para machos, para fêmeas em diestro e para fêmeas em proestro, respectivamente (Figura 3, A, B e C). Os tratamentos com quercetina na mesma concentração que o resveratrol (10 μ M) reduziram a produção de NO em 15%, 31% e 21% de machos, de fêmeas em diestro e de fêmeas em proestro, respectivamente.

Nos tratamentos com o 17β -estradiol, nas duas concentrações utilizadas, observou-se redução na produção de NO, diferente significativamente em relação ao controle, apenas no grupo dos machos.

Ao compararmos o efeito inibitório do resveratrol na produção de NO induzida por LPS, através do emprego do teste *t*, entre os grupos, observamos que apenas os tratamentos com concentração de 10 μ M diferem significativamente entre os grupos. A resposta em machos difere das de fêmeas em proestro ($p < 0,05$) nas não das fêmeas em diestro, essas por sua vez diferem de fêmeas em proestro ($p < 0,05$).

EFEITO DO RESVERATROL SOBRE A PRODUÇÃO DE PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO

Não foi possível detectar a produção basal de H_2O_2 por macrófagos de ratos de ambos os sexos. Mesmo quando foram ativados por LPS, os macrófagos de ratos machos, de fêmeas em diestro e de fêmeas em proestro (Figura 4 A, B e C) produziram baixas concentrações de H_2O_2 com valores entre 3 e 6 μ M por 4×10^5 células.

Os tratamentos dos macrófagos com resveratrol nas concentrações de 5 e 10 μ M reduziram as produções de H_2O_2 de todos os grupos, diferindo significativamente em relação ao controle. Na maior concentração empregada, o resveratrol (10 μ M) reduziu a produção de H_2O_2 em 31% para machos, 47% para fêmeas em diestro e 51% para fêmeas em proestro, observando-se que a maior porcentagem de redução da produção de H_2O_2 foi detectada em as fêmeas.

A quercetina na concentração de 10 μ M reduziu significativamente a produção de H_2O_2 de machos e de fêmeas em diestro, em 26% e 37%,

respectivamente, todavia não alterou a produção de H_2O_2 em fêmeas em proestro.

Em relação aos tratamentos com 17β -estradiol 10 nM as porcentagens de redução da produção de H_2O_2 encontradas para machos, para fêmeas em diestro e para fêmeas em proestro foram de 29%, 25%, 16%, respectivamente, sendo os tratamentos dos macrófagos obtidos de machos e de fêmeas em diestro diferentes significativamente do controle.

A produção de H_2O_2 quando comparada entre os grupos através do teste t foi apenas diferente significativamente nos tratamentos com resveratrol $10 \text{ }\mu\text{M}$. Neste sentido, a produção de H_2O_2 de macrófagos de machos difere das de fêmeas em diestro ($p < 0,05$) e das de fêmeas em proestro ($p < 0,05$).

EFEITOS DO RESVERATROL SOBRE A CAPACIDADE FAGOCÍTICA

Uma das principais características de macrófagos é a fagocitose. O efeito do resveratrol foi testado nos macrófagos desafiados a fagocitar partículas opsonizadas e não opsonizadas com Zimosan.

Nossos resultados mostram que o resveratrol e a quercetina, nas concentrações de 5 e $10 \text{ }\mu\text{M}$, e o 17β -estradiol ($0,01$ e 10 nM) não alteram significativamente a capacidade fagocítica de macrófagos de machos e de fêmeas, tanto quando esses foram desafiados a fagocitar partículas de Zimosan opsonizadas (Figura 5, A, B e C) quanto não opsonizadas (Figura 6, A, B e C). Cumpre ressaltar que apenas o tratamento com resveratrol na concentração de $5 \text{ }\mu\text{M}$ para fêmeas em diestro foi diferente significativamente em relação ao controle. Conforme observado na Figura 5B o resveratrol aumentou a capacidade

fagocítica dos macrófagos a partículas não opsonizadas, entretanto este efeito não foi observado, quando os macrófagos foram desafiados a fagocitar partículas opsonizadas (Figura 6B).

DISCUSSÃO

Neste estudo investigamos o efeito do resveratrol na funcionalidade de macrófagos isolados de ratos machos e de fêmeas em duas diferentes fases do ciclo estral, diestro (baixa concentração sérica de 17β -estradiol) e proestro (alta concentração sérica de 17β -estradiol).

Nossos resultados em relação à determinação do peso corporal dos animais e dos parâmetros bioquímicos séricos dos diferentes grupos foram satisfatórios (Tabela 1), visto que todos os animais utilizados nesta pesquisa encontravam-se dentro dos valores de referências citados por Dantas et al. (2006). Neste estudo os autores relataram que ratos machos de 90 dias da linhagem Wistar apresentaram peso corporal entre 200 e 220 gramas, peso um pouco abaixo do por nós encontrado, todavia ressalta-se que os animais utilizados neste estudo apresentavam 110 - 130 dias de vida. Ainda de acordo com Dantas et al. (2006) a glicemia ($n=64$) de jejum dos animais correspondeu a 108 mg/dL, sendo o valores médios encontrados para concentração sérica de triglicerídeos ($n=38$) de 82 mg/dL e para colesterol total ($n=51$) de 87mg/dL. Nossos resultados corroboram os valores citados, todavia algumas variações observadas podem ser atribuídas a fatores como faixa etária, ambiente, características genéticas, entre outros.

Os resultados bioquímicos encontrados nos permitiram realizar os ensaios biológicos seguramente, pois é sabido que alterações bioquímicas podem interferir na resposta imune. Aksnes, Eide e Nordstrand (1996) e Perez Jaffe-LA et al. (1998) relataram que o excesso de lipídeos provoca aumento da capacidade fagocítica de macrófagos alveolares e aumento de infecção pulmonar em animais. Os mesmos pesquisadores ainda descreveram que, com o aumento da disponibilidade de triglicerídeos, os macrófagos tendem a fagocitá-los em detrimento a fagocitose de bactérias, além disso, sabe-se que aumentos dos níveis de glicose circulante inibem a atividade de monócitos e que pacientes com hiperglicemia apresentam respostas imunes alteradas em relação a adesão leucocitária, a quimiotaxia e a fagocitose (VALERIUS et al., 1982; GALLACHER et al., 1995; MUCHOVA et al., 1999).

A dosagem de 17β -estradiol no soro dos animais confirmou o delineamento dos grupos, realizado previamente através da avaliação do material vaginal. Assim os experimentos foram realizados com macrófagos de animais com níveis hormonais distintos e bem característicos para cada grupo (Tabela 1). Em um estudo realizado por Marcondes et al. (2001) com fêmeas de ratos da linhagem Wistar, as fêmeas em proestro apresentaram concentração sérica de 17β -estradiol de aproximadamente 30 pg/mL, enquanto fêmeas em diestro apresentaram valor aproximado de 10 pg/mL. Resultados similares foram os encontrados nesta pesquisa.

A avaliação da viabilidade celular confirmou que os tratamentos com resveratrol (5 e 10 μ M), quercetina (5 e 10 μ M) e 17β -estradiol (0,01 e 10 nM) foram seguros para os ensaios biológicos de avaliação da capacidade fagocítica e produção de ERO e ERN (Figura 1). De fato, Bi et al. (2005) em um estudo de

investigação dos efeitos inibitórios do resveratrol da produção de NO em micróglias empregado nas concentrações de 0,01 e 10 µg/mL (~ 44 µM), também observaram que o resveratrol não foi citotóxico, pois os autores não verificaram diminuição da viabilidade celular.

É importante destacar que, compostos fenólicos podem levar a um aumento do metabolismo e provavelmente esse efeito explica os fenômenos observados na Figura 1, onde os tratamentos aumentaram a atividade das desidrogenases mitocondriais dos macrófagos que, por sua vez, reflete aumento de metabolismo celular (HANSEN, 1989 et al.; SHEARMAN; HAWTIN; TAILOR,1995). O efeito de aumento da atividade das desidrogenases mitocondriais foi observado tanto nos macrófagos cultivados na ausência de LPS (macrófagos residentes) quando na presença (macrófagos ativados). Entretanto, quando os macrófagos foram ativados por LPS (Figura 1, C e D) verificamos uma maior atividade de desidrogenases mitocondriais. Essa resposta diferenciada deve-se ao fato do LPS é potente ativador de macrófagos, alterando não somente a regulação gênica, mas o metabolismo celular (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Uma resposta diferencial entre macrófagos residentes (não ativados) e ativados por LPS também foi observada quando investigamos o efeito dos tratamentos sobre a produção de NO e de H₂O₂ de macrófagos peritoneais de ratos. De fato, nos diferentes tratamentos a produção basal de NO, determinada a partir de macrófagos residentes, é menor do que quando estes são ativados com LPS (Tabela 2). Em relação à produção de H₂O₂, nem sequer foi detectada produção basal, sendo somente detectada produção de H₂O₂ nos tratamentos de macrófagos ativados por LPS (Tabela 3). Todavia essas respostas eram

esperadas, pois como mencionado acima, o LPS é um potente ativador de macrófagos, induzindo a produção efetiva de uma variedade de substâncias como a produção de ERO e ERN, parâmetros funcionais de macrófagos ativados.

Em nosso estudo o resveratrol inibiu tanto a produção basal de NO como a induzida por LPS em ambos os grupos (Figuras 2 e 3). De fato, os efeitos inibitórios do resveratrol na produção de NO já foram relatados na literatura e podem ocorrer por diferentes mecanismos (BELGUENDOUZ et al., 1997; AZEVEDO, 2001; CHAN et al., 2000; PAVELKOVÁ et al., 2008).

Um dos mecanismos propostos para redução da produção de NO pelo resveratrol é a propriedade do composto de capturar radicais livres na célula (atividade *scavenger*). Chan et al. (2000) demonstraram que o resveratrol é um potente captador de radicais livres em células em cultura e Pavelková et al. (2008), em um estudo sobre a influência de compostos fenólicos, como o resveratrol e a quercetina, sobre a produção de ERO em células RAW 264.7 estimuladas com PMA, demonstraram que a captura de radicais livres ocorria de maneira dose dependente.

Neste sentido, acreditamos que essa propriedade do resveratrol seja, em grande parte, a responsável pela a redução da produção de NO, em especial na produção basal (Figura 2), ou seja, a produção de NO avaliada em macrófagos não ativados (residentes). Cumpre ressaltar que devido a essa propriedade de captura de radicais livres, o resveratrol tem sido citado por muitos autores como antioxidante (BELGUENDOUZ et al., 1997).

Já o efeito inibitório da produção de NO em macrófagos ativados por LPS (Figura 3), que segundo Tsai et al. (1999) apresentam aumento de produção de

NO devido a um aumento da expressão da iNOS, o resveratrol pode ser responsável por essa inibição via outro mecanismo, o da inibição de fatores de transcrição envolvidos na resposta inflamatória, como por exemplo o NF- κ B (AZEVEDO, 2001).

Cumprе ressaltar que dentre os mecanismos moleculares envolvidos no desencadeamento da resposta imune de macrófagos, 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 nesta resposta, incluindo iNOS (FERRANTE, 2007). O LPS atua na ativação dos macrófagos por meio desta via de sinalização, que é ativada pela ligação deste às proteínas CD14 e TLR4 que estão presentes na membrana plasmática da célula. Tal ligação gera como consequência a ativação de moléculas envolvidas na transdução de sinal que permitem a liberação e a translocação do NF- κ B do citossol para o núcleo, o qual promove a ativação de genes que codificam para proteínas envolvidas na resposta imune inflamatória (BAUD; KARIN, 2009).

Neste sentido é importante salientar também que o aumento da produção de NO por macrófagos ativados é responsável por desencadear progressivas respostas inflamatórias, ou seja, o NO apresenta importante papel na iniciação e efetivação da resposta imune (ZENG et al., 2002; ZHOU; CHEN, 2002). Assim quando um composto é capaz de reduzir a produção de NO esse pode ser denominado de antiinflamatório.

Sabe-se que o resveratrol atua na via de sinalização do NF- κ B, por sua vez inibindo-a (KUNDU; SURH, 2004; LASTRA; VILLEGAS, 2005). De fato, Zhen-Hua Ma et al. (2006) em seu trabalho demonstraram que o resveratrol pode reduzir a expressão da iNOS e conseqüentemente reduzir a produção de NO em

macrófagos ativados com LPS. Segundo Kawada et al. (1998) este efeito do resveratrol ocorre de maneira dose-dependente, e Tsai et al. (1999), relataram que a atividade do NF- κ B como fator de transcrição foi inibida pelo resveratrol e que essa inibição resulta da não translocação do fator de transcrição (NF κ B) para o núcleo.

Alguns estudos têm mostrado que o resveratrol também é capaz de ligar e ativar outros fatores de transcrição como o receptor ativado por proliferadores de peroxissomas (PPAR) isoformas α e γ , sugerindo que este exerce papel antiinflamatório também via este receptor (INOUE et al., 2003). A ação antiinflamatória do resveratrol via mecanismo dependente de PPAR foi investigado por Donnelly et al.(2004) usando o PPAR α agonista (WY-14643) e um específico PPAR α antagonista (GW-466471). Todavia o agonista WY-14643 foi menos eficaz do que o resveratrol na inibição de secreção.

Constatamos também que o resveratrol e a quercetina (tratamento usado com controle antioxidante) apresentaram um perfil bastante semelhante de redução da produção de NO tanto a basal como a induzida por LPS. Já nos tratamentos com 17 β -estradiol, a redução da produção de NO foi bem menos acentuada, o que nos permite inferir que o resveratrol apresentaria baixo efeito estrogênico, já que relata-se que o efeito do estradiol seria de aumentar a resposta imune, ou seja, um imunomodulador positivo (GROSSMAN; ROSSELE; MENDENHALL, 1994).

Todavia há que se considerar que até o momento o efeito do 17 β -estradiol *per se* na funcionalidade de macrófagos ainda não está claro, pois estudos neste sentido apresentam-se controversos. Para Cutolo et al. (2004), estrogênios parecem estimular as respostas imunes. Entretanto para Medeiros, Maitelli e

Nince (2007) estes parecem tanto estimular como inibir os processos inflamatórios. Em outro estudo foi observado que o 17β -estradiol na presença de LPS inibe a produção de NO e expressão de iNOS em macrófagos ativados (HAYASHI et al., 1998; SAVITA, 1998). Cabe ressaltar ainda que, o mecanismo molecular de inibição ou estimulação pelo 17β -estradiol está pouco esclarecido.

Há que se considerar também que ao utilizarmos células de animais (*in vitro*) estando estas programadas biologicamente por condições fisiológicas próprias do organismo, tais como a regulação prévia por hormônios esteroidais, as respostas imunes frente à desafios (os tratamentos realizados, por exemplo) podem estar pré-moduladas. Assim neste estudo ao trabalharmos com machos e fêmeas em diferentes fases do ciclo estral, podemos inferir que os macrófagos peritoneais dos animais podem responder de maneiras distintas, exibindo funcionalidade e metabolismo diferenciado, sendo o dimorfismo na resposta imune, bem relatado na literatura, um dos principais focos deste nosso estudo.

Neste sentido, é importante comentar o fato de que em fêmeas em diestro o resveratrol reduziu significativamente a produção basal de NO e essa redução foi maior do que a encontrada para fêmeas em proestro (Figura 2), conforme mostrou teste t ($p < 0,05$). Contrariamente na produção de NO induzida por LPS (Figura 3), as fêmeas em diestro tiveram suas produções de NO reduzidas significativamente, mas em menor proporção que em fêmeas em proestro ($p < 0,05$).

Estes resultados ainda precisam ser melhores estudados, pois são conflitantes, contudo levantaram a questão de que a pré-modulação com diferentes concentrações de estrogênio poderia interferir diferencialmente na resposta imune de macrófagos dependente de seu estado de ativação.

Portanto seria provável que em um microambiente onde haja baixas concentrações de 17β -estradiol (machos e fêmeas em diestro) os efeitos do resveratrol e da quercetina possam ser mais acentuados pela ausência do efeito imunomodulador positivo do estradiol. Tal situação justificaria os resultados obtidos nos tratamentos de macrófagos residentes com resveratrol, ou seja, observados na produção basal de NO (Figura 2). Já nos tratamentos dos macrófagos ativados por LPS o resveratrol além da sua atividade antioxidante, também poderia apresentar atividade estrogênica fraca, mas que não poderia ser desprezada (Figura 3).

Há que se levar em consideração que segundo Alarid, Bakopoulos e Solodin (1999) e Cotroneo et al. (2001) as células em resposta ao estrogênio pode apresentar *downregulation* da expressão dos receptores de estrogênio (RE), sem mesmo ocorrer alteração do RNAm, e sim através de rápida proteólise, que pode ser um evento inicial (resposta a curto prazo) da ação estrogênica. O *downregulation* de RE em glândulas mamárias de ratos em resposta ao estradiol foi observada tanto para a isoforma α quanto para β (HATSUMI; YAMAMURO, 2005). Por conseguinte, em fêmeas em diestro, que apresentam baixa concentração sérica de 17β -estradiol, os macrófagos estariam expressando maior número RE e o resveratrol poderia exercer ação estrogênica pela ligação com estes receptores, ação essa que seria menos efetiva em fêmeas em proestro que estariam expressando menor número de RE.

Em relação à produção de H_2O_2 , não foi possível detectá-la na ausência de LPS, provavelmente porque em macrófagos não ativados, a NADPH-oxidase está inativa e encontra-se na parte citosólica da célula, (MACMICKING, 2009), mas em estado ativado, o complexo NADPH-oxidase é transferido para a

membrana plasmática, onde se liga ao citocromo b558 formando NADPH oxidase ativa (MA et al., 2005; SEGAL; ABO, 1993; BABIOR, 1992).

De fato, quando o LPS se liga aos receptores da superfície de macrófagos, há um aumento no consumo de oxigênio, resultante da ativação do complexo enzimático NADPH oxidase, que catalisa a redução do oxigênio a superóxido. Em seguida o superóxido pode ser convertido a H_2O_2 pela ação da superóxido dismutase (SOD) (KLEBANOFF, 1992; BEUTLER, 2004).

Neste estudo, os tratamentos de macrófagos ativados com resveratrol nas concentrações de 5 e 10 μM reduziram a produção de H_2O_2 em todos os grupos testados (Figura 4). Leiro et al. (2004) também demonstraram que o resveratrol nas concentrações de 1, 10 e 100 μM diminuem a produção de H_2O_2 de macrófagos peritoneais de camundongos.

Este efeito inibitório do resveratrol na produção de H_2O_2 pode ser tanto explicado pela atividade seqüestrante de ERO do composto, anteriormente mencionada (BELGUENDOUZ et al., 1997) como pelo aumento da expressão de enzimas antioxidantes (FREMONT et al., 1999) ou ainda pela inibição de enzimas como a NADPH oxidase (HAVSTEEN, 2002; MUROTA; TERAOKA, 2003; DAS; ROSAZZA, 2006). De fato, Pincemail et al. (1987) mostraram em seus estudos que compostos fenólicos são capazes de reduzir a produção de ERO via inibição da NADPH oxidase em fagócitos de humanos ativados.

Interessantemente neste estudo observamos que em fêmeas em diestro e em machos os tratamentos com 17 β -estradiol (tratamento utilizado como controle de atividade estrogênica) também reduziram produção de H_2O_2 . Estudos de Chao, Van Alten e Walter (1994) revelam que o estrogênio regula negativamente e de maneira dose dependente produção de ERO de macrófagos de ratos.

De fato, ao analisarmos estatisticamente as produções de H_2O_2 por macrófagos já no controle dos diferentes grupos (Tabela 3) verificamos que machos e fêmeas em proestro diferiram significativamente entre si, com médias de produção de 4,53 e 3,27 μM por 4×10^5 células, respectivamente, mas não em relação a fêmeas em diestro cuja média de produção no controle foi de 4,20 μM por 4×10^5 células.

Comparando o efeito do resveratrol na diminuição da produção de H_2O_2 entre os grupos observamos que esse foi mais acentuado no grupo das fêmeas em diestro e dos machos, o que reforça a hipótese de que em ambientes com concentrações baixas de estradiol o resveratrol pode atuar de forma mais acentuada, que poderia ser explicado pela sua ação antioxidante e estrogênica (MOKNI et al., 2007; RATNA; SIMONELLI, 2002).

Em nosso estudo o resveratrol não alterou a capacidade fagocítica dos macrófagos em todos os grupos testados, muito embora já tenha sido relatado que a fagocitose possa ser inibida ou aumentada por compostos com capacidade antioxidante, (TAUBER; FAY JR; MARLETTA, 1984; POMAK et al., 2005).

Entretanto cumpre ressaltar que o efeito do resveratrol na fagocitose é controverso, pois Leiro et al. (2002) observaram redução significativa na capacidade fagocítica de macrófagos de ratos machos utilizando resveratrol nas concentrações de 10, 50 e 100 μM e contrariamente Vetvickan e Vancikova (2010) utilizaram resveratrol nas concentrações de 50 e 100 μg e observaram aumento na capacidade fagocítica de macrófagos peritoneais de ratos.

Em resumo, nesse artigo ficou evidente a já conhecida ação antioxidante e antiinflamatória do resveratrol, bem como da quercetina, pois estes reduziram a produção de H_2O_2 e NO em todos os grupos. Todavia as respostas dos diferentes

grupos em relação ao tratamento com resveratrol parecem estar pré-modulada pelas diferentes concentrações de 17β -estradiol a que os animais estavam expostos. Neste contexto, em que machos e fêmeas em diestro respondem similarmente aos tratamentos enquanto que fêmeas em proestro as respostas são diferenciadas, o resveratrol poderia estar atuando também como fitoestrógeno nos grupos onde as concentrações de 17β -estradiol são menores (machos e fêmeas em diestro). Todavia, ainda são necessários mais estudos para compreender o papel antioxidante, antiinflamatório e estrogênico do resveratrol em macrófagos peritoneais de ratos.

As referências deste capítulo encontram-se listadas no final deste trabalho.

Tabela 1. Peso corporal, parâmetros bioquímicos e hormonais de ratos machos e fêmeas (diestro e proestro) de 110-130 dias

Grupos	Peso (g)	17 β -estradiol (pg/mL)	Glicose (mg/dL)	Colesterol (mg/dL)	Triglicerídeos (mg/dL)
Machos (n=12)	271,7 $\pm$ 8,11 ^a	5,82 $\pm$ 0,29 ^b	102,7 $\pm$ 5,76 ^a	100,5 $\pm$ 10,43 ^a	63,0 $\pm$ 4,87 ^a
Diestro (n=11)	193,0 $\pm$ 3,14 ^b	11,11 $\pm$ 4,20 ^b	113,0 $\pm$ 7,49 ^a	106,2 $\pm$ 5,69 ^a	77,73 $\pm$ 6,27 ^a
Proestro (n=14)	192,2 $\pm$ 3,63 ^b	25,01 $\pm$ 5,57 ^a	112,5 $\pm$ 7,01 ^a	88,50 $\pm$ 3,00 ^a	64,07 $\pm$ 5,83 ^a

Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média e a diferença entre os grupos foi obtida por análise de variância ANOVA. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo dos machos, definidas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 2. Comparação entre a produção de NO basal e a produção induzida por LPS de macrófagos de ratos machos e fêmeas (diestro e proestro)

Grupos	Produção de NO BASAL ($\mu\text{M} / 4 \times 10^5$ células)	Produção de NO INDUZIDA por LPS ($\mu\text{M} / 4 \times 10^5$ células)
Macho	$9,37 \pm 0,87$	$28,48 \pm 1,05^a$
Diestro	$17,33 \pm 2,74$	$25,00 \pm 1,66^b$
Proestro	$8,11 \pm 0,80$	$24,17 \pm 0,96^c$

Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média e a diferença entre os grupos foi definida por análise de variância ANOVA. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre a produção de NO basal e a produção induzida por LPS dentro de cada grupo, definidas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). N = 4 correspondente ao número de experimentos. Animais ≥ 9 por grupo.

Tabela 3. Produção de H_2O_2 induzida por LPS de macrófagos de ratos machos e fêmeas (diestro e proestro).

Grupos	Produção de H_2O_2 (LPS) (μM / 4×10^5 células)
Macho	$4,53 \pm 0,26^a$
Diestro	$4,20 \pm 0,32^b$
Proestro	$3,27 \pm 0,25^b$

Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média e a diferença entre os grupos foi definida por análise de variância ANOVA. Letras diferentes indicam diferença estatisticamente significativa entre na produção de H_2O_2 por machos em relação aos grupos das fêmeas, definidas pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). N= 4 correspondente ao número de experimentos. Animais ≥ 9 por grupo.

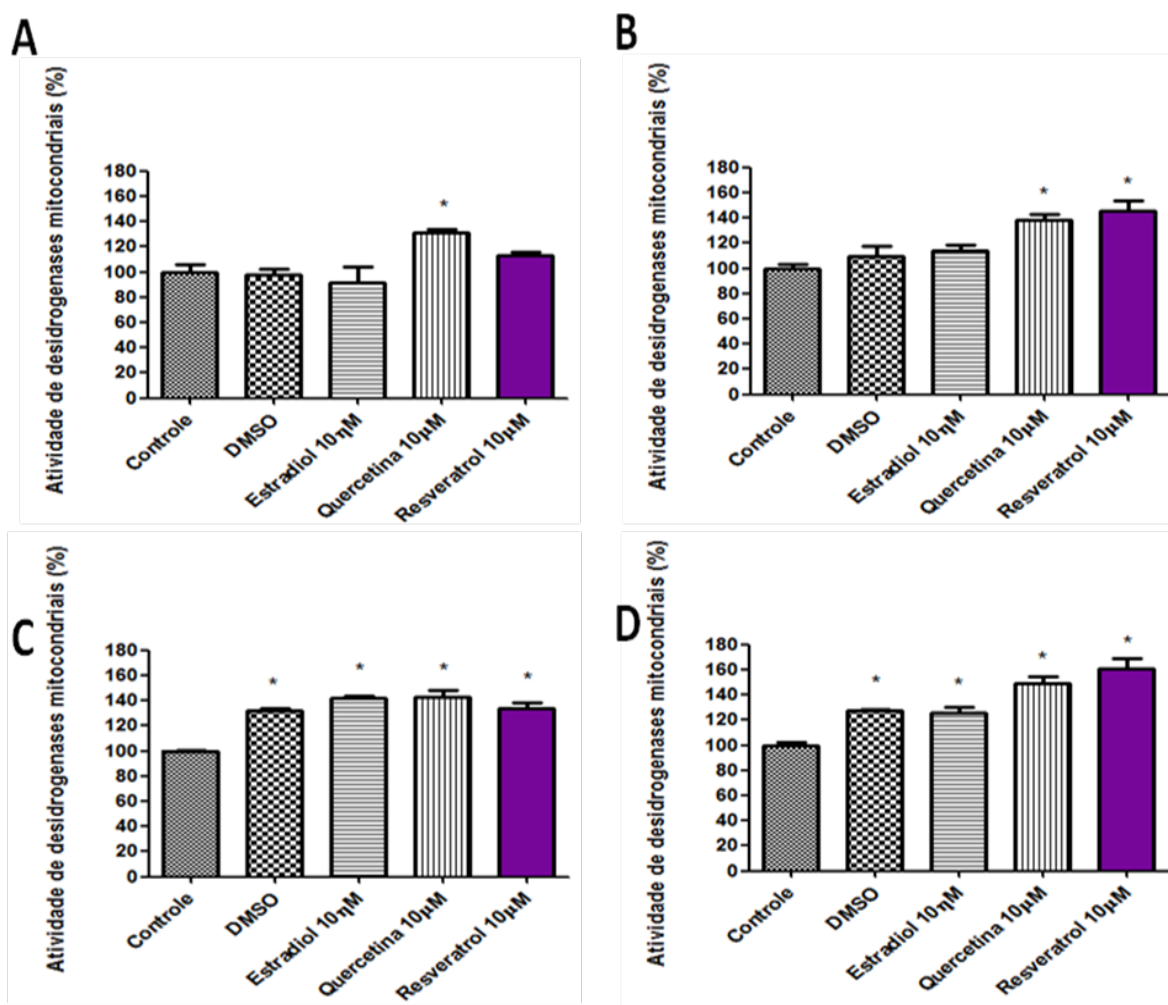


Figura 1 - Viabilidade celular dos macrófagos de ratos machos e fêmeas em proestro tratados com resveratrol, quercetina e 17 β -estradiol. Os macrófagos foram semeados em placas de cultura de 96 poços na concentração de 4×10^5 cel/100 μ l e a viabilidade celular realizada pela redução do MTT conforme descrito em materiais e métodos. Em A e B machos e fêmeas em proestro, respectivamente, cultivados na ausência de LPS, e em C e D, machos e fêmeas em proestro, respectivamente, cultivados na presença de LPS. Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média. N=4 determinações.

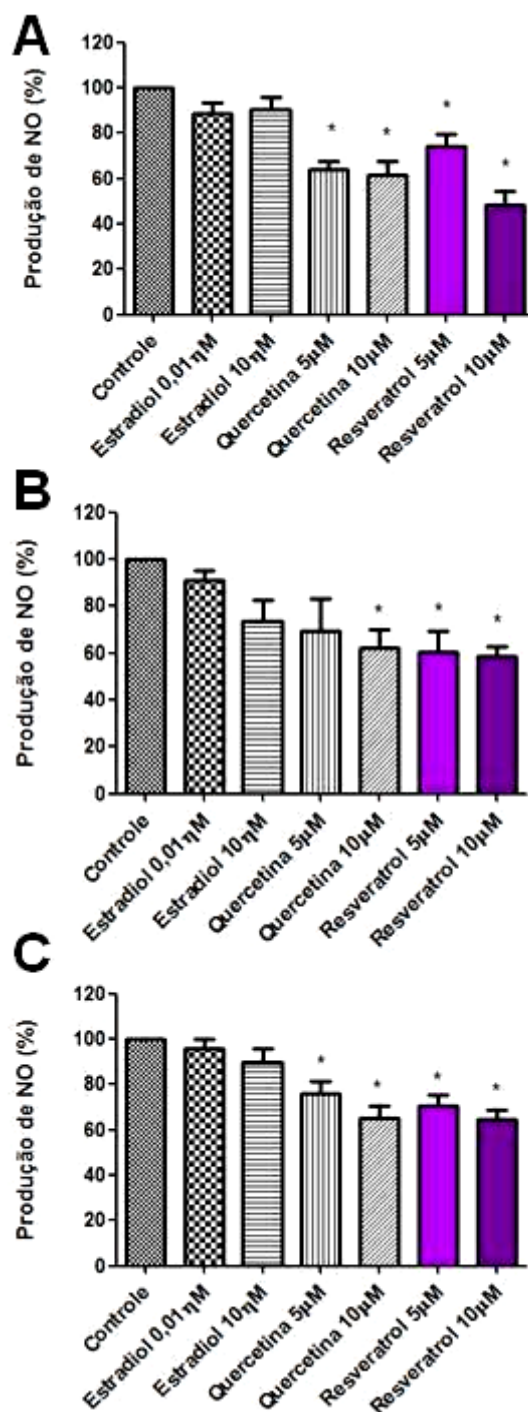


Figura 2. Porcentagem de produção basal de NO por macrófagos de ratos machos e fêmeas tratados com resveratrol, quercetina e 17 β -estradiol. Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média. * Indica quais grupos obtiveram diferença significativa na produção de NO em relação ao controle, 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. Animais ≥ 9 por grupo.

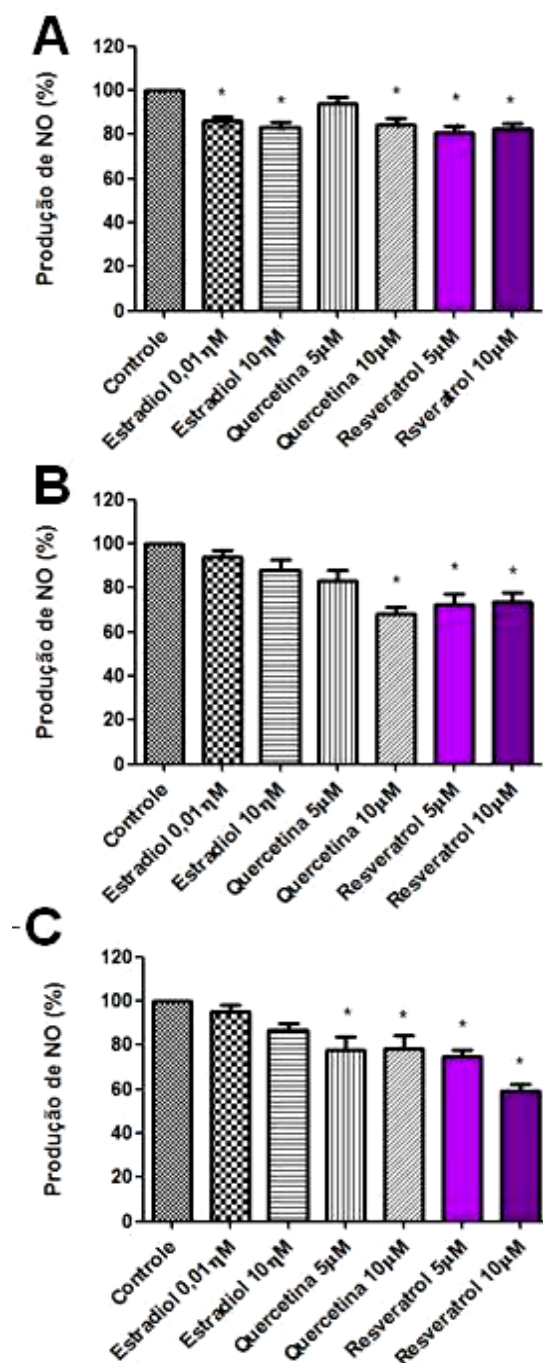


Figura 3. Porcentagem de produção de NO induzida por LPS por macrófagos de ratos machos e fêmeas tratados com resveratrol, quercetina e 17β-estradiol. Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média. * Indica quais grupos obtiveram diferença significativa na produção de NO em relação ao controle, definidos pela análise de variância ANOVA e pelo pós-teste de Tukey, onde $p < 0,05$. A) Machos B) Fêmeas em diestro e C) Fêmeas em proestro. N=3 correspondente ao número de experimentos. Animais ≥ 9 por grupo.

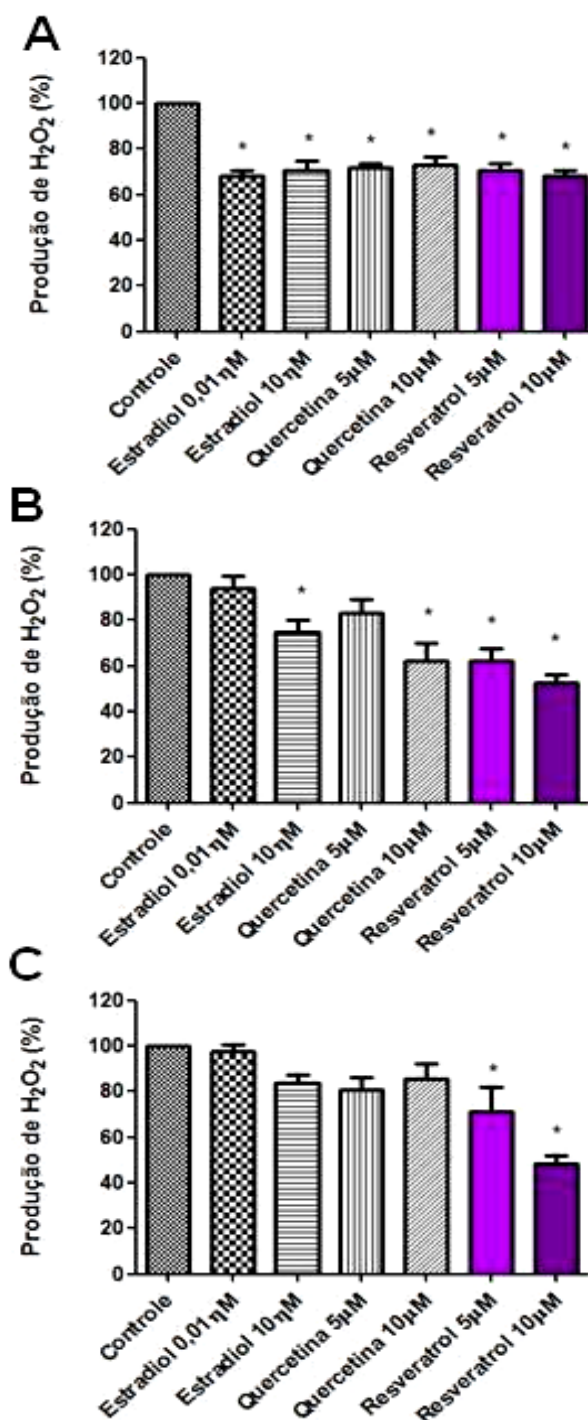


Figura 4. Porcentagem de produção de H_2O_2 induzida por LPS por macrófagos de ratos machos e fêmeas, tratados com resveratrol, quercetina e 17 β -estradiol. Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média. * Indica quais grupos obtiveram diferença significativa na produção de H_2O_2 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 e C) Fêmeas em proestro. N=4 correspondente ao número de experimentos. Animais ≥ 9 por grupo.

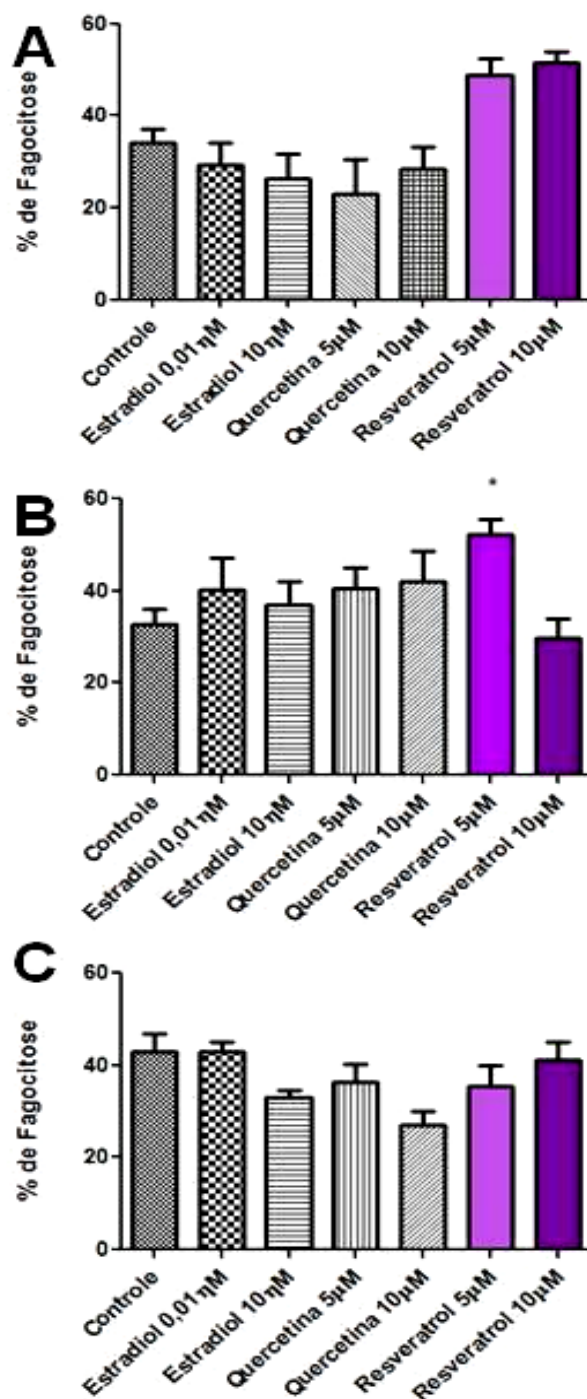


Figura 5. Porcentagem de fagocitose à partículas não opsonizadas por macrófagos de ratos machos e fêmeas, tratados com resveratrol, quercetina e 17β -estradiol. Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média. * Indica quais grupos obtiveram diferença significativa na porcentagem de fagocitose 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=2 correspondente ao número de experimentos. Animais ≥ 9 por grupo.

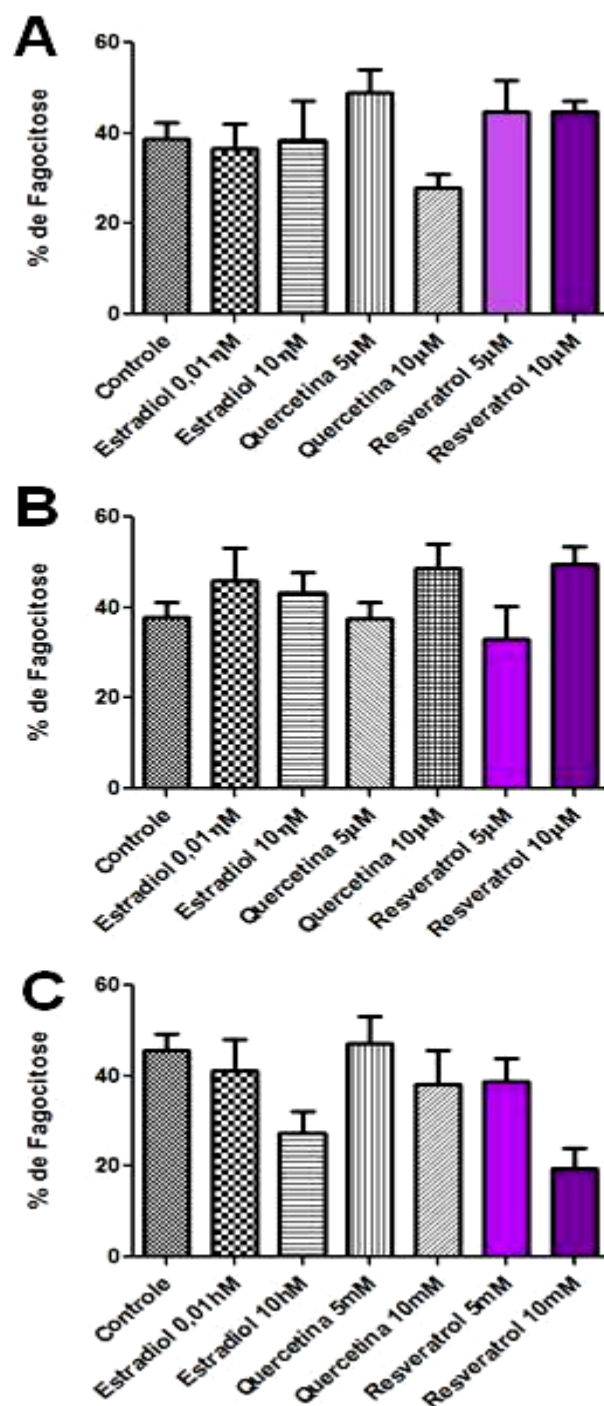


Figura 6. Porcentagem de fagocitose à partículas opsonizados por macrófagos de ratos machos e fêmeas, tratados com resveratrol, quercetina e 17 β -estradiol. Os resultados são expressos como média $\pm$ erro padrão da média. A) Machos, B) Fêmeas em diestro e C) Fêmeas em proestro. N= 2 corresponde ao número de experimentos. Animais $\geq$ 9 por grupo.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Desde que o resveratrol foi isolado em 1940, o número de citações e trabalhos com este composto tem crescido em grandes proporções (BAUR et al., 2006), especialmente devido ao interesse pelas suas propriedades farmacológicas que resultam em inúmeros benefícios à saúde (FRANKEL; WATERHOUSE; KINSELLA, 1993, AZEVEDO et al., 2001).

Todavia a discriminação de uma atividade biológica específica, dentre todas conferidas ao resveratrol, é uma limitação dos estudos, porque algumas destas atividades poderiam ser confundidas ou não completamente diferenciadas uma da outras. Neste sentido, por exemplo, existe um número muito pequeno de artigos discriminando claramente a propriedade fitoestrogênica do resveratrol na regulação hormonal conferida aos esteróides e um número ainda menor de artigos que o relacionam ao dimorfismo sexual observado na resposta imune. Por outro lado o efeito antioxidante e antiinflamatório do resveratrol sobre as células do sistema imune, e em especial macrófagos são mais descritas (ZOU et al., 2000; SOARES et al., 2001; MOKNI et al., 2007; HARIKUMAR; AGGARWAL, 2008; PINTO; GARCIA-BARRADO; MACIAS, 1999).

Um efeito modulador negativo do resveratrol sobre a funcionalidade de macrófagos obtidos de machos e de fêmeas em diferentes fases do ciclo estral foi evidenciado neste trabalho, conforme resumidamente está mostrado na Tabela 3 abaixo.

Tabela 3. Resumo dos efeitos do resveratrol na funcionalidade de macrófagos de ratos machos, fêmeas em diestro e proestro.

Grupos/Funcionalidade	Machos (baixa concentração sérica de estradiol)	Fêmeas em diestro (baixa concentração sérica de estradiol)	Fêmeas em proestro (alta concentração sérica de estradiol)
Viabilidade celular	_____	_____	_____
Produção de NO (Basal)	↓↓	↓↓	↓
Produção de NO (induzida por LPS)	↓↓	↓↓	↓↓↓
Produção de H₂O₂ (induzida por LPS)	↓	↓↓↓	↓↓↓
Fagocitose à partículas de Zimosan não opsonizadas	_____	_____	_____
Fagocitose à partículas de Zimosan opsonizadas	_____	_____	_____

Linhas contínuas (____) significam que não houve alteração da funcionalidade dos macrófagos peritoneais de rato dentro do grupo. Setas (↓) indicam diminuição da funcionalidade, sendo que um maior número de setas no grupo expressa a intensidade da diminuição em relação aos demais grupos.

Quanto ao perfil de resposta à exposição ao resveratrol, macrófagos de machos e fêmeas em diestro comportarem-se de maneira similar, diferindo das fêmeas em proestro, sugerindo-se que as variações hormonais do ciclo estral de fêmeas podem refletir em diferentes respostas imunes, evidência pouco discutida na literatura, apesar de já está bem estabelecida entre machos e fêmeas. Nossos resultados ainda são sugestivos de que este efeito pode estar relacionado às concentrações de 17 β estradiol a que os grupo de macrófagos estavam expostos, ou seja, uma resposta pré-modulada pelo estradiol, em virtude, de se tratar-se de ensaios *ex-vivo*. Evidência de difícil

discussão, devido à escassez de trabalhos na literatura, mas que precisam ser esclarecidas.

Esses efeitos inibitórios do resveratrol em relação à produção de NO e H₂O₂ corroboram a propriedade antioxidante deste composto que pode ser devido ou a sua capacidade captura de radicais livres na célula (scavanger) e/ou a sua propriedade de modificar a expressão das enzimas antioxidantes tais como: a SOD, a CAT e a GPX. Entretanto, a inibição da produção de NO, pode também estar relacionada à propriedade antiinflamatória do resveratrol, pois já sabe-se que o resveratrol inibe a expressão de iNOS, por interferir na ativação fatores de transcrição pró-inflamatórios NF- κ B e AP-1. Efeitos que respaldam o seu uso na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares (DCV) e inflamatórias.

Pensando no uso de resveratrol para este fim, cumpre ressaltar que compostos bioativos como o resveratrol, podem ser ingeridos através da dieta e que o consumo de alimentos que o contenha torna-se uma alternativa à manutenção da saúde. Todavia estes devem estar sempre presentes na dieta, ou seja, regularmente, pois compostos bioativos geralmente são metabolizados de forma rápida (LASTRA;VILLEGAS, 2005).

A relação entre consumo de produtos que contém resveratrol com a redução de risco a doenças cardiovasculares já é comprovada (MIYAGI; MIWA; INOUE, 1997; RENAUD, et al. 2004). Todavia diferenças nas respostas de homens e mulheres expostos ao resveratrol não são relatadas, o que, a nosso ver, deveriam ser consideradas, em face da propriedade estrogênica do resveratrol. Ainda cumpre

ressaltar que mesmo em estudos de corte apenas com mulheres, dever-se-ia considerar também a fase do ciclo sexual.

Em resumo, os resultados encontrados neste trabalho são sugestivos de que o resveratrol apresenta um efeito mais acentuado como antioxidante, com perfis de resposta similares ao da quercetina, e não ao do 17β - estradiol. Entretanto, ainda se fazem necessárias mais investigações sobre o papel do resveratrol mediante diferentes níveis de hormônios esteroidais, pois evidência de possível pré-modulação do estrogênio na resposta imune e, por conseguinte, na funcionalidade de macrófagos foram observadas por nosso grupo.

7. CONCLUSÃO

Neste estudo todos os animais utilizados nos experimentos encontraram-se dentro dos padrões de normalidades em relação aos parâmetros bioquímicos analisados (glicose, triglicerídeos e colesterol) bem como hormonais (17 β -estradiol). Cumpre ainda ressaltar que a técnica de esfregaço vaginal demonstrou-se eficiente para classificação das fases do ciclo estral nas fêmeas.

O resveratrol é um composto fenólico com diversas propriedades biológicas, e dentre estas, nos diferentes experimentos realizados neste trabalho, evidenciou-se sua ação antioxidante, sendo esta mais acentuada do que sua ação fitoestrogênica. O perfil de antioxidante do resveratrol foi revelado pois foi similar ao da quercetina, tratamento utilizado como controle de atividade antioxidante, em detrimento ao tratamento com 17 β -estradiol, tratamento utilizado como controle de atividade estrogênica.

Os efeitos do resveratrol sobre os macrófagos obtidos de ratos machos e de fêmeas em diferentes fases do ciclo estral (diestro e proestro) observados permitem-nos concluir que:

- O resveratrol (10 μ M) não é citotóxico, pois não causa morte celular dos macrófagos.
- Nas duas concentrações utilizadas (5 e 10 μ M) o resveratrol inibe a produção de NO e H₂O₂ em todos os grupos testados;

- O resveratrol inibe diferencialmente a produção de NO em macrófago residentes (na ausência de LPS) em relação aos macrófagos ativados (na presença de LPS), pois observou-se que quando os macrófagos não estão ativados e a produção de NO celular é menor e o resveratrol inibe acentuadamente essa produção sendo este efeito de inibição da produção de NO menos efetivo nos macrófagos ativados cuja a produção de NO é maior.
- Nas concentrações de 5 e 10 μM o resveratrol não alterou a capacidade fagocítica dos macrófagos tanto à partículas de Zimosan opsonizadas quanto à não opsonizadas.
- O efeito do resveratrol também é diferenciado de maneira significativa entre machos e fêmeas, sendo que machos e fêmeas em diestro responderam similarmente aos tratamentos com resveratrol que diferem quando comparadas a fêmeas em proestro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

AGGARWAL, B.B.; SHISHODIA, S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. **Biochem. Pharmacol.** v. 71(10): 1397 -1421, 2006.

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. **APMIS**. V. 104(7-8): 515-22, 1996.

ALARID, E. T; BAKOPOULOS, N. & SOLODIN, N. Proteasome-mediated proteolysis of estrogen receptor: a novel component in autologous down-regulation. **Mol. Endoc.** V. 13: 1522-1534, 1999.

ANSAR-AHMED, S.; PENHALE, W.J.; TALAL, N. Sex hormones, immune responses and autoimmune diseases. **Am. J. Pathol.** v. 121: 531-551, 1985.

ARCE, L. et al., M. Determination of trans-Resveratrol and other polyphenols in wines by a continuous flow sample clean-up system followed by capillary electrophoresis separation. **Anal. Chim. Acta**. v. 359: 27-38, 1998.

ARICHI, H. et al. Effects of stilbene components of the roots of on lipid metabolism. **Chem. Pharm. Bull Clinica Chimica Acta J.** v. 30 (5): 1766-1770, 1982.

AZEVEDO, R. B. et al. Regulation of antioxidant enzyme activities in male and female rat macrophages by sex steroids **Braz. J. Med.Bio. Res.** v. 34: 683-687, 2001.

BABIOR, M. B. The respiratory burst oxidase. **Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.** v. 65: 49-95. 1992

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

BARRY, D. et al. Estrogenic effects of resveratrol in breast cancer cells expressing mutant and wild-type estrogen receptors: role of AF-1 and AF-2. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** v. 88 (3): 223-34, 2004.

BARTON, G. M.; MEDZHITOV, R. **Toll-Like Receptor Signaling Pathways.** SCIENCE v. 300, 2003.

BASTOS, D.; ROGERO, M.; ARÊAS, J. Mecanismos de ação de compostos bioativos dos alimentos no contexto de processos inflamatórios relacionados à obesidade. **Arq. bras. Endocrinol. Metab.** v. 53 (5) 2009.

BAUD, V.; KARIN, M. OPINION: is NF-kappa B a good target for cancer therapy? Hopes and pitfalls. **Nat. Rev. Drug. Discov.** v. 8(1): 33-40, 2009.

BAUR, J. A. et al. Resveratrol improves health and survival of mice on a high-calorie diet. **Nature:** London, v. 444: 337-342, 2006.

BELGUENDOUZ, L., et al. A. Resveratrol inhibits metal iondependent and independent peroxidation of porcine low-density lipoproteins. **Biochem. Pharmacol.** v. 53 (9): 1347–1355, 1997.

BERTELLI, A. A. E. Modulatory effect of resveratrol, a natural phytoalexin, on endothelial adhesion molecules and intracellular signal transduction. **Pharmaceut. Biol.** v. 36: 44–52, 1998.

BI, X. L. et al. Resveratrol inhibits nitric oxide and TNF-alpha production by lipopolysaccharide-activated microglia. **Int. Immunopharmacol** v. 5: 185-193, 2005.

BIANCHINI, F., VAINIO, H. Wine and resveratrol: mechanisms of cancer prevention? **Eur. J. Cancer Prev.** v. 12: 417–425, 2003.

BEUTLER, B. Innate immunity: an overview. **Mol. Immunol.** Elmsford, V. 40: 845-859, 2004.

BOUMAN, A. et al. Sex hormones and immune response in humans. **Hum. Reprod. Update** v. 11(4):411- 423, 2005.

BOOCOCK D. J. et al. Phase I dose escalation pharmacokinetic study in healthy volunteers of resveratrol, a potential cancer chemopreventive agent. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.** v. 16(6):1246-1252, 2007.

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

BUKOVISKY A, et al. Cellular localization of luteinizing hormone receptor immunoreactivity in the ovaries of imature, gonadotropin-primed and normal cycling rats. **Biol. Reprod.** v.48: 1367-1382, 1993.

CADENAS, S.; CADENAS, A. M. Flighiting the stranger-antioxidante protection against endotoxin toxicity. **Toxicology.** v. 27: 45-63, 2002.

CALABRESE, G. Nonalcoholic compounds of wine: the phytoestrogen resveratrol and moderate red wine consumption during menopause. **Drugs Exper. Clin. Res**, v.25: 111-114, 1999.

CANCELLO, R.; CLÉMENT, K. Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. **BJOG.**; v. 113(10):1141-7, 2006.

CARROL et. al.; Absolute Quantification of Cerebral Blood Flow With Magnetic Resonance, Reproducibility of the Method, and Comparison With H₂¹⁵O Positron Emission Tomography. **J. Cereb. Blood Flow & Metab.** v. 22: 1149–1156, 2002.

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

CHAN, M. M. et al. Synergy between ethanol and grape polyphenols, quercetin, and resveratrol, in the inhibition of the inducible nitric oxide synthase pathway. **Biochem. Pharmacol.** v. 60: 1539-1548, 2000.

CHANDRA, R. K. Nutrition and the immune system from birth to old age. **Eur. J. Clin. Nutr.** v. 56(3): 73-76, 2002.

CHAO, P. J.; VAN ALTEN ; WALTER, R. J. Steroid sex hormones and macrophage function: regulation of chemiluminescence and phagocytosis. **Am. J. Reprod. Immunol.** v. 32: 43-52 1994.

CLAPAUCH, R. et al. Fitoestrogênios: Posicionamento do Departamento de Endocrinologia Feminina da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM). **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** v. 46 (6):669-695, 2002.

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

COTRONEO, M. S. et al. Sex steroid receptor regulation by genistein in the prepubertal rat uterus. **Mol.Cel. Endo.** v. 173: 135-145. 2001

CROHON J. A. et al. Estrogen and Progesterone Reduce Lipid Accumulation in Human monocyte-Derived Macrophages: A Sex-Specific Effect. **Circulation.** v. 100: 2319-2325, 1999.

CROWELL, J. A. et al. Resveratrol-associated renal toxicity. **Toxicol. Sci.** v. 82: 614–619, 2004.

CUTOLO M. et al. Sex hormones influence on the immune system: basic and clinical aspects in autoimmunity. **Lupus** v. 13(9): 635-638, 2004.

DA LUZ P. L.; COIMBRA, S. R. Alcohol and Atherosclerosis. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro. v.73 (5): 51-55, 2001.

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. **Acta Sci. Health Sci.** v. 28(2):165-170. 2006.

DAS, S.; ROSAZZA, J. P. N. Microbial and Enzymatic Transformation of Flavanoids. **J. Nat. Products.** v.69, p.499-508, 2006.

DIAS DA SILVA, W.; MOTA, I.; **Imunologia Básica e Aplicada.** 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003.

DIA, V. P.; BERHOW, M.; MEJIA, E.G. Bowman-Birk Inhibitor and genistein among Soy Compounds That Synergistically Inhibit Nitric Oxide and Prostaglandin E2 Pathways in lipopolysaccharide-Induced Macrophages. **J. Agric. Food Chem.** v. 56: 11707–11717, 2008.

DIEZ-PEREZ, A. Selective estrogen receptor modulators. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** v. 50 (4): 720-734, 2006.

DONNELLY, L. E. et al., Anti-inflammatory effects of resveratrol in lung epithelial cells: molecular mechanisms. **Am. J. Physiol. Lung. Cell Mol. Physiol.** v. 287: 774–783, 2004.

FABIANI, R. et al. Production of hydrogen peroxide is responsible for the induction of apoptosis by hydroxytyrosol on HL60 cells. **Mols. Nutr. Food Res**, v. 53: 887-896, 2009.

FERRANTE, A. W. Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation. **J. Intern. Med.** V. 262(4): 408-14, 2007.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Ass. Med. Bras.** v. 43(1): 61-8, 1997.

FOTSIS, T. et al. Flavonoids, dietary-derived inhibitors of cell proliferation and *in vitro* angiogenesis. **Cancer Res.** Baltimore, v.57(14): 2916-2921, 1997.

FAUCONNEAU, B. et al. Comparative study of radical scavenger and antioxidant properties of phenolic compounds from *Vitis vinifera* cell cultures using *in vitro* tests. **Life Scie.** v. 61 (21): 2103–2110. 1997.

FRANKEL, E.; WATERHOUSE A; KINSELLA J. Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol. **Lancet** v. 341: 1103–1104, 1993.

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

FREMONT, L. et al. Minireview: Biological effects of resveratrol. **Life Scie.** Elmsford, v. 66 (8): 663-673, 2000.

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

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

GARCÍA, J. A. V. Efeitos Dos Antioxidantes Fenólicos Na Prática Desportiva. **Fit. Perf. J.** Rio de Janeiro v. 1:4-22, 2002.

GEHM, B. D. et al. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. **Proc. Nat. Acad. Sci.** v. 94: 14138–14143, 1997.

GESCHER A. J; STEWARD W. P.; Relationship between mechanisms, bioavailability, and preclinical chemopreventive efficacy of resveratrol: a conundrum. **Cancer Epidemiol. Biomark Prev.** v. 12: 953-957, 1993.

GODOY, L. **Efeito do medicamento Canova na funcionalidade de macrófagos: fagocitose, produção de óxido nítrico. 2002.** Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Paraná, 2002.

GOLDBERG, D. M. et al. Absorption of three wine-related polyphenols in three different matrices by healthy subjects. **Clin. Biochem.** v. 36:79–87, 2003.

GORDON S. Fagócitos mononucleares na defesa imune. In: Roitt I, Brostoff J, Male D. **Imunologia.** 6 ed. São Paulo: Editora Manole Ltda.154-156, 2003.

GROSSMAN, C. J.; ROSSELE, G. A.; MENDENHALL, C. L. Sex steroid regulation of autoimmunity. **J. Steroid Biochem. Mol. Biol.** v. 40(4-6): 649-459, 1994.
GYORKI, D.; LINDEMAN, G. Macrophages, more than just scavengers. **ANZ. J. Surg.** v. 78: 432–436, 2008.

HAYASHI, T. et al., Physiological concentrations of 17 β -estradiol inhibit the synthesis of nitric oxide synthase in macrophages via a receptormediated system. **J. Cardiovasc. Pharmacol.** v.31: 292– 298.1998.

HALIWELL, B. Reactive Species and the Central Nervous System. **J. Neurochem.** v. 59(5): 1609-1623, 1992.

HALIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine. Oxford: **Clarendon Press**, 1999.

HANSEN, M. B. et al. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. **J. Immunol. Methods.** v. 119(2): 203-210, 1989.

HARIKUMAR, K. B; AGGARWAL B. B. Resveratrol: a multitargeted agent for ageassociated chronic diseases. **Cell. Cycle** v. 7(8): 1020-1035, 2008.

HATSUMI, T.; YAMAMURO, Y. Downregulation of estrogen receptor gene expression by exogenous 17 β -estradiol in the mammary glands of lactating mice. **Exp. Biol. Med.** v. 231: 311–316, 2006.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonóides. **Pharma. Therap.** v. 96: 67– 202, 2002.

INOUE, H. et al., Brain protection by resveratrol and fenofibrate against stroke requires peroxisome proliferator-activated receptor- α in mice. **Neurosci. Lett.** v. 352: 203 –206, 2003.

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

JEANDET P. et al. Phytoalexins from the Vitaceae: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity and metabolism. **J. Agricul. Food Chem.** V. 50: 2731-2741, 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. **Cell. Immunol.** v. 161: 61-71, 1995.

JOHNSON, H. **The story of wine**. London: Mitchell-Beazley, 1989.

KAWADA, N. et al. Effect of antioxidants, resveratrol, quercetin, and N-acetylcysteine, on the functions of cultured rat hepatic stellate cells and Kupfer cells. **Hepatology** 1998; v. 27: 1265–74.

KELLER, E. T. et al. The impact of chronic estrogen deprivation on immunologic parameters in the ovariectomized rhesus monkey (*Macaca mulatta*) model of menopause. **J. Reprod. Immunol.** v. 50(1): 41-55, 2001.

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

KNIGHT, D. C.; EDEN, J.A. A review of the clinical effects of phytoestrogens. **Obstet. Gynecol.** v. 87: 897-904, 1996.

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

LASTRA; VILLEGAS. Review Resveratrol as an anti-inflammatory and anti-aging agent: Mechanisms and clinical implications **Mol. Nutr. Food Res.** v. 49: 405 – 430, 2005.

LEIRO, J. et al. Resveratrol modulates rat macrophage functions. **Int. Immunopharmacol.** v. 2: 767–774, 2002.

LEIRO, J. et al. Effects of *cis*-resveratrol on inflammatory murine macrophages: antioxidant activity and down-regulation of inflammatory genes. **J. Leuk. Biol.** v. 75 (6):1156-1165, 2004.

LEITE, H. P.; SARNI, R. S. Radicais livres, antioxidantes e nutrição. **Rev. Bras. Nutr. Clin.** v. 18 (2): 87-94, 2003.

LEONARD S. S. et al. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and effects radical-induced cellular responses. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v. 309(4): 1017-1026, 2003.

LU, R.; SERRERO G.; Resveratrol, a natural product derived from grape, exhibits antiestrogenic activity and inhibits the growth of human breast cancer cells. **J. Cell Physiol.** v. 179: 297–304, 1999.

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

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

MANIKANDAN et al. Estrogen modulates human macrophage apoptosis via differential signaling through estrogen receptor- α and β . **J. Cell. Mol. Med.** v.13: 2317-2329, 2009.

MAOZ, H., The effect of estradiol on human myelomonocytic cells. **Reprod. Immunol.** v. 2: 325-335 ,1985.

MARCONDES, F. K. et al.. Estrous cycle influence the response of female rats in the elevated plus-maze. **Physiol. Behav.** New York. v.74 (4-5):15-20, 2001.

MARCONDES, F. K.; BIANCHI, F. J.; TANNO, A. P. Determinação das fases do ciclo estral em ratas: considerações úteis. **Braz. J. Biol.** v. 62 (4a):609-614, 2002.

MATTARAIA, V. G. M. et al., Efeito macho na indução do estro em ratas Wistar (*Rattus Novergicus*) **Vet. e Zootec.** v. 16 (4): 669-677, 2009.

MEDEIROS, S. F.; MAITELLI, A.; NINCE, A. P. B. Effects of the menopause hormone therapy on immune system. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.** v. 29 (11): 593-601, 2007.

MEDEIROS S. F.; OLIVEIRA V. N.; YAMAMOTO, M. M. W. Epidemiologia clínica do climatério. **Reprod. Clim.** v. 18 (1): 79-86, 2003.

MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. A. Innate immunity: impact on the adaptative immune response. **Curr. Opin. Immunol.** v. 9 (1): 4-9, 1997.

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

MIYAGI, Y.; MIWA, K.; INOUE, H. Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by flavonoids in red wine and grape juice. **Am.J. Cardiol.** v. 80:1627-31, 1997.

MONCADA, S. et al. Nitric Oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology. **Pharm. Rev.** v. 43: 109-142, 1994.

MOKNI et al, Effect off Resveratrol on antioxidant enzyme acitivities in the brain of healthy rat. **Neurochem. Res.**, v. 32: 981-987, 2007.

MUCHOVA, J. et al. Antioxidant systems in polymorphonuclear leucocytes of type 2 diabetes mellitus. **Diab. Med.** v. 16: 74 -78, 1999.

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

MULLER, S. O. Phytoestrogens and Their Human Metabolites Show Distinct Agonistic and Antagonistic Properties on Estrogens Receptor α (ER α) and ER β in Human Cells. **Toxicol. Sci.** v. 80: 14-25, 2004.

MUROTA, K.; TERAQ, J. Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 417: 12–17, 2003.

NARENDRA P. et al. Resveratrol (*trans*-3,5,4_-Trihydroxystilbene) Ameliorates Experimental Allergic Encephalomyelitis, Primarily via Induction of Apoptosis in T Cells Involving Activation of Aryl Hydrocarbon Receptor and Estrogen Receptor. **Mol. Pharm.** v. 06, 2007.

NELSON, D. J.; JOW, F. Whole-cell currents in macrophage: Human monocytes derived macrophages. **J. Membr. Biol.**, v. 117: 29-44, 1990.

NEVEU, P. J. The mononuclear phagocyte system. **Bull. Inst. Pasteur.** v. 84: 24-66, 1986.

OLSEN N. J., KOVACS, W. J. Gonadal steroids and immunity. **Endocr. Rev.** v. 17(4): 369-84, 1996.

ORALLO et al. Comparativie studies of the antioxidant effects off cis and trans Resveratrol **Curr. Med. Chem.** v. 13: 87 – 98, 2006.

PACE- ASCIAK, C. R. Wines and grape juices as modulators of platelet aggregation in healthy hu-man subject. **Clin. Chem. Acta.** v. 246 (1-2): 163-182, 1996.

PARHAM, P. **O Sistema Imune.** Porto Alegre: Artmed, 2001.

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. **J. Biol. Chem.** v. 167 (28) 19901-19906, 1992.

PARK, J. W. 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. **J. Biol. Chem.** v. 267 (24): 17327-17332, 1992.

PAVELKOVÁ, M. ČÍŽ, M. L. et al. The Influence of Wine Polyphenols on Reactive Oxygen and Nitrogen Species Production by Murine Macrophages RAW 264.7 **Physiol. Res.** v. 57: 393-402, 2008

PEREZ-JAFFE LA, et al. Massive macrophage lipid accumulation presenting as hepatoesplenomegaly and lymphadenopaty associated with long-term total parenteral nutrition therapy for short bowel syndrome. **Hum. Pathol.** v. 29(6):651-5. 1998.

PERVAIZ, S. Resveratrol: from grapevines to mammalian biology. **J. Fed. Amer. Soc. Exper. Biol.** Bethesda, v. 17 (14):1975-1985, 2003.

PIEMONTE, M. R. **Alterações estruturais em macrófagos peritoneais de camundongos tratados com medicamento homeopatico Método Canova.** Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal do Paraná, 2000.

PIETTA, P.; SIMONETTI, P.; MAURI, P. Antioxidant activity of selected medicinal plants. **J. Agric. Food Chem.** v. 46 (11): 4487-4490, 1998.

PIGNATELLE, P. et al. Polyphenols synergistically inhibit oxidative stress in subjects given red and white wine. **Atherosclerosis**. v. 188: 77-83, 2006.

PINCEMAIL, J. et al. Ginkgo biloba extract inhibits oxygen species production generated by phorbol myristate acetate stimulated human leukocytes. **Experientia**. v.43: 181-184, 1987.

PINTO, M. C.; GARCÍA-BARRADO, J. A.; MACÍAS, P. Resveratrol is a Potent Inhibitor of the Dioxygenase Activity of Lipoxygenase. **J. Agric. Food Chem.** v. 47; 4842-4846, 1999.

POMAKI, M. et al. Effects of thiolic antioxidants on in vitro mouse peritoneal macrophage functions **Comp. Clin. Path.** v.13: 176–181, 2005.

POOL-ZOBEL, B.L. et al. Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. **Carcin.** New York. v.18 (90): 1847-1850, 1997.

PUKA, J. et al. **Origem e tipos de fagócitos. RUBS. Curitiba**, v.1(1): 25-35, 2005.

RAETZ, C. R. Biochemistry of endotoxins. **Rev. Biochem.** v. 59: 129– 170, 1990.

RAHMAN, I.; BISWAS, S.K.; KIRKHAM, P. A. Regulation of inflammation and redox signaling by dietary polyphenols. **Biochem. Pharmacol.** v. 72(11):1439-52, 2006.

RATNA, W. N.; SIMONELLI J. A. The action of dietary phytochemicals quercetin, catechin, resveratrol and na-ringenin on estrogen-mediated gene expression. **Life Sci.** v. 70: 1577-1589, 2002.

RENAUD, S.C. et al. Moderate wine drinkers have lower hypertension-related mortality: a prospective cohort study in French men. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 80: 621-625, 2004.

ROITT, I.; BROSTOFF, J.; MALE, D. Imunidade aos Protozoários e Vermes. In: _____. **Imunologia**. 5. ed. São Paulo: Manole, 423 p. 28 cm. Cap. 18. ISBN 85-204-0825-7, 1999.

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

SAN JUAN, P. M. F. **Componentes cardioprotectores del vino**. In: CONGRESO INTERNACIONAL ALIMENTACIÓN, NUTRICIÓN Y DIETÉTICA, 5., 2002, Madrid. Disponível em <http://www.nutrition.org/publicaciones/revista_marzo_02/Vcongresso_publicaciones/Conferencias/vino.pdf>.

SAUTTER, C. K. et al. Determinação De Resveratrol Em Sucos De Uva No Brasil. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Campinas, v. 25(3): 437-442, 2005.

SAVITA, U. Sex steroid hormones modulate the activation of murine peritoneal macrophages: receptor mediated modulation. **Comp. Biochem. Physiol.** v.119C:199–204, 1998.

SEADI, C. **Princípios Básicos de Imunologia**. 1ªed., Ulbra, Canoas, 1998.

SEGAL, A. W.; ABO, A. The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. **Trends. Biochem. Sci.** Kidlington, v. 18: 43-47, 1993.

SHEARMAN, M. S.; HAWTIN, S. R.; TAILOR, V. J. The intracellular component of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction is specifically inhibited by β -amyloid peptides. **J. Neurochem.** v. 65: 218-27, 1995.

SHEPHERD, V. L. et al. Fucoseterminated glycoconjugates are recognized by pinocytosis receptors on macrophages. **Proc. Natl. Acad. Sci.** Washington, . 78 (2): 1019-1022, 1981.

SIES, H.; CADENAS, E. Oxidative stress: Damage to intact cells and organs. **Philos Trans. Soc. Lond. Biol. Sci.** v. 311: 617-631, 1985.

SIES, H., STAHL, W. Vitamins E and C, b-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **Am. J. Clin. Nutr.** Bethesda, v.62 (6): 1315-1321, 1995.

SIMONCINI, T. et al. Nongenomic mechanisms of endothelial nitric oxide synthase activation by the selective estrogen receptor modulator raloxifene. **Circulation** v. 105: 1368-1373, 2002.

SOARES, D. G. et al. **Avaliação da Capacidade Antioxidante do Butil hidroxitolueno, Propil galato, Resveratrol, Vitamina C e Vitamina E em Sistemas Biológicos e Químicos.** Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia) Univ. de Caxias do Sul – Inst. de Biotecnologia, 2001.

SOLEAS, G. J. et al. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? **Clin. Biochem.** Toronto, v. 30 (2): 91- 113. 1997.

STAVRIC, B. Antimutagens and anticarcinogens in foods. **Food Chem. Toxicol.** Oxford, v. 32 (1): 79-90, 1994.

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

SUBBARAMAIAH, K. et al. Resveratrol inhi-bits cicloxygenase-2 transcription and activity in phor-bol ester-treated human mammary epithelial cells. **J. Biol. Chem.** v. 273 (34): 21875-21882, 1998.

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

TSAI, S. H., et al. Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NFkappaB in macrophages by resveratrol. **Br. J. Pharmacol.** v.126: 673–680, 1999.

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

TAUBER, A. I.; FAY, J. R.; MARLETTA, M. A. Flavonoid inhibition of the human neutrophil NADPH-oxidase. **Biochem Pharmacol.** v.33:1367–9, 1984 .

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

VENKATA-REDDY, M.; GANGADHARAM, P.R.J. Heat shock treatment of macrophages causes increased released superoxide anion. **Infect. Immunol.** v. 60: 2386-2390, 1992.

VERNON-ROBERTS, B. The effects of steroid hormones on macrophage activity **Int. Rev. Cytol.** v. 25: 13 I-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): 384-90, 2000.

VETVICKAN; VANCIKOVA (2010) Synergistic effects of glucan and Resveratrol **African J. Biochem.** v. 4(4): 105-110, 2010

VITAGLIONE, P. et al. Bioavailability of trans-resveratrol from red wine in humans. **Mol. Nutr. Food Res.** v. 49: 495-504, 2005.

WALEE, T. et al. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. **Drug Metab. Disp.** Baltimore, v. 32 (12): 1377-1382, 2004.

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

ZBIKOWSKA, H. M. et al. T. Response of blood platelets to resvera-trol. **Platelets** (Abingdon), v. 10 (4): 247-252, 1999.

ZHEN-HUA MA et al . Effect of Resveratrol on NF- κ B Activity in Rat Peritoneal Macrophages. **Am. J. Chin. Med.** v. 34 (4): 623–630, 2006.

ZENG, X. H., S.Q. ZHU, X.M. ZHANG, W.J. LUO; S.W. LI. Plasma endothelin and nitric oxide levels in patients with acute pancreatitis. **Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.** v.1: 140–142, 2002.

ZHOU, Z. G.; Y. D. CHEN. Influencing factors of pancreatic microcirculatory impairment in acute pancreatitis. **World J. Gastroenterol.** v.8: 406–412, 2002

ZOU, J. et al. Effects of resveratrol on oxidative modification of human low density lipoprotein. **Chinese Med. J.** Beijing. v.113 (2): 99-102, 2000.

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

YOU, H. J. et al. 17 beta-estradiol increases inducible nitric oxide synthase expression in macrophages. **Biochem Biophys Res Comm.** v. 303, Issue: 4, 1129-1134, 2003.

YU, C. et al. Human, rat and mouse metabolism of resveratrol. **Pharm. Res.** v. 19, 1907–1914, 2002.