

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
ÁREA DE CIÊNCIAS NUTRICIONAIS

***EFEITO DO SUCO DE LARANJA E DA GLICOSIL HESPERIDINA SOBRE O
SISTEMA IMUNE INATO DE CAMUNDONGOS***

ALUNA: GRACE KELLY ZANOTTI SIMÕES DOURADO
ORIENTADORA: PROF.^a Dr.^a THAIS BORGES CÉSAR

ARARAQUARA

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS E NUTRIÇÃO
ÁREA DE CIÊNCIAS NUTRICIONAIS

***EFEITO DO SUCO DE LARANJA E DA GLICOSIL HESPERIDINA SOBRE O
SISTEMA IMUNE INATO DE CAMUNDONGOS***

ALUNA: GRACE KELLY ZANOTTI SIMÕES DOURADO

ORIENTADORA: PROF.^a Dr.^a THAIS BORGES CÉSAR

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Nutricionais.

ARARAQUARA

2009

DEDICO

A Deus, por ter me guiado em Seus caminhos desde sempre, por Sua generosidade e pela conquista deste trabalho.

A minha mãe, pelo exemplo de ser humano “quase perfeito”, pelo apoio, orações, amor e carinho dispensados nos momentos de alegria e de dificuldades.

Ao meu pai, pelo amor e por acreditar em mim e me oferecer a oportunidade de ser uma pessoa melhor e uma profissional capacitada.

Ao Felipe, pelo amor compartilhado, paciência e alegria que me trouxe durante a execução deste trabalho.

A Prof.^a Dr.^a Thais Borges César pelo acolhimento, amizade e exemplo de excelência profissional.

A Lívia Carolina de Abreu Ribeiro pelo companheirismo, apoio profissional e mais do que tudo pela amizade.

AGRADECIMENTOS

- A Prof.^a Dr.^a Thais Borges César pela orientação, disposição, incentivo e por dividir seus conhecimentos comigo. Muito obrigada.
- A Prof.^a Dr.^a Iracilda Zeppone Carlos, pela oportunidade de trabalhar em seu laboratório, pelos ensaios imunológicos concedidos e discutidos, pela amizade e alegria contagiante que dispensa a todos ao seu redor.
- A Prof. Dr.^a Telma Maria Braga Costa, pela simpatia e gentileza de aceitar meu convite para participar da avaliação e compor a banca deste trabalho. Muito obrigada.
- Ao Prof.^o Dr. João Bosco por acreditar em mim no momento em que mais precisei.
- A Prof. Dr.^a Célia Maria de Sylos, pelas correções e sugestões neste trabalho. Muito obrigada.
- A todos os amigos que conquistei no Laboratório de Imunologia Clínica da FCFar durante a realização deste trabalho, especialmente a Lívia, Lucas, Marcela, Camila, Djamile, Danielle, a técnica Marisa Placeres, ao Professor Rubens e a todos os estagiários. Obrigado pelo auxílio das técnicas aprendidas. Vocês conseguiram tornar as minhas dificuldades mais fáceis e divertidas, serei eternamente grata a todos vocês.
- Aos meus amigos de sempre (Léa, Tata, Fran, Pati, Dar, Anelise, Maria Fernanda, Tattienne...) por torcerem pela realização e conclusão deste trabalho.

- A minha família de verdade que mesmo longe, torce por mim desde o início, especialmente a minha Tia Sirene e a minha prima-irmã Milene Boni.
- A família (república) que formei em Araraquara, especialmente a Luaninha, Renatinha, Vânia, Jaquinha e Paula. Vocês ficarão em meu coração pra sempre.
- A todos os amigos do Laboratório de Nutrição e Metabolismo Aplicados ao Exercício da UFSCar - SP, especialmente a Fernanda de Oliveira Duarte e Marcela Sene-Fiorese, por terem acreditado no meu potencial e por me orientarem no começo deste longo caminho.
- Aos amigos da Pós-Graduação, especialmente a Ana Cristina Araújo, Tina Camossa, Ju Chioda, Taciana Pretti, Fer Mattara, Julio Vinueza e Caio Aragon pela amizade, apoio e consideração.
- À Lila e ao primo Richard Vieira pela acomodação e hospitalidade em São Paulo-SP, nos períodos de Congresso. Muito obrigada.
- À seção de pós-graduação, especialmente a Cláudia Lúcia Molina, Laura Rosim e Sônia Ornellas pela atenção dispensada.
- Ao CNPq pela bolsa concedida.
- À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP - Araraquara - SP.
- A Empresa Citrosuco S/A (Grupo Fisher), Matão - SP, Brasil, pela doação do suco de laranja para a realização deste trabalho.
- A Empresa Hayashibara Company Ltd. - Japão, pela doação da α -glicosil hesperidina para a realização deste trabalho, especialmente a Daniela Gomes pelo apoio e atenção.

*“Deus, não consintas que eu seja o carrasco que sangra as ovelhas,
nem uma ovelha nas mãos dos algozes.*

*Ajuda-me a dizer sempre a verdade na presença dos fortes, e jamais dizer
mentiras para ganhar os aplausos dos fracos.*

Meu Deus, se me deres a fortuna, não me tires a felicidade.

Se me deres a força, não me tires a sensatez.

*Se me for dado prosperar, não permita que eu perca a modéstia, conservando
apenas o orgulho da dignidade.*

*Ajuda-me a apreciar o outro lado das coisas, para não acusar meus
adversários com mais severidade do que a mim mesmo.*

*Não me deixes ser atingido pela ilusão da glória, quando bem sucedido, e nem
pelo desespero, quando derrotado. Lembra-me que a experiência de uma
queda poderá proporcionar uma visão diferente do mundo.*

Ó Deus!

*Faze-me sentir que o perdão demonstra força, e que a vingança é prova de
fraqueza.*

Se me tirares a fortuna, deixe-me a esperança.

Se me faltar à saúde, conforta-me com a graça da fé.

*E quando me ferir a ingratidão e a incompreensão dos meus semelhantes, cria
em minha alma a força da desculpa e do perdão.*

Finalmente Senhor, se eu Te esquecer,

Rogo que nunca Te esqueças de mim”.

(Prece Árabe)

RESUMO

Tem sido mostrado que a hesperidina, um flavonóide encontrado nas frutas cítricas e especialmente no suco de laranja, apresenta atividade anti-inflamatória e imunomodulatória, entre outras. O presente estudo avaliou os efeitos da ingestão do suco de laranja (SL) como fonte natural da hesperidina, da glicosil hesperidina isolada (GH) e da mistura de ambos (SL-GH), sobre o sistema imune inato de camundongos. Para tanto, foram medidos os parâmetros de produção e inibição da produção de óxido nítrico (NO), e de liberação das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α em culturas de macrófagos peritoneais *ex vivo*. Os macrófagos foram obtidos de grupos de animais previamente tratados com GH, SL, SL-GH ou solução salina (SS). Em seguida as células foram tratadas com GH e lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) *in vitro*. Os resultados mostraram que o tratamento com suco de laranja estimulou a produção de NO de forma moderada ($60\mu\text{mol}$ de NO_2^-) pelos macrófagos, aumentou a liberação da citocina IL-10 e diminuiu significativamente a produção de TNF- α . O tratamento com G-hesperidina inibiu completamente a produção de NO em macrófagos mesmo na presença de LPS, aumentou a produção da citocina IL-12 e diminuiu a produção de IL-10. Estes resultados sugerem que a ingestão de suco de laranja é benéfica ao sistema imune, podendo apresentar ação contra possíveis agentes infecciosos. A flavanona G-hesperidina isolada pode ser considerada um composto anti-inflamatório nos casos onde ocorre a intensa liberação de óxido nítrico, tais como as doenças inflamatórias.

Palavras-chave: glicosil hesperidina, suco de laranja, sistema imune, macrófagos, óxido nítrico, citocinas.

ABSTRACT

It has been shown that hesperidin, a flavonoid found in citrus fruits and especially in the orange juice, has anti-inflammatory and immunomodulatory, among others. This study evaluated the effects of ingestion of orange juice (SL) as a natural source of hesperidin, isolated glucosyl hesperidin (GH) and a mixture of both (SL-GH) on the innate immune system of mice. To this end, it was measured the parameters of production and inhibiting the production of nitric oxide (NO), and release of cytokines IL-10, IL-12 and TNF- α in cultures of peritoneal macrophages ex vivo. Macrophages were obtained from groups of animals previously treated with GH, SL, SL-GH or saline solution. Then the cells were treated with GH and bacterial lipopolysaccharide (LPS) in vitro. The results showed that treatment with orange juice stimulated the production of NO in a moderate ($60\mu\text{mol NO}_2^-$) by macrophages, increased the release of cytokine IL-10 and significantly decreased the production of TNF- α . Treatment with G-hesperidin completely inhibited NO production in macrophages, even in the presence of LPS, increased the production of cytokine IL-12 and decreased production of IL-10. These results suggest that ingestion of orange juice is beneficial to the immune system, may bring suit against possible infectious agents. The isolated G-flavanone hesperidin can be considered an anti-inflammatory compound in cases where it occurs intense release of nitric oxide, such as inflammatory diseases

Keywords: *glucosyl hesperidin, orange juice, immune system, macrophages, nitric oxide, cytokines.*

SUMÁRIO

1. Introdução.....	16
2. Revisão da Literatura.....	18
2.1. Suco de Laranja.....	18
2.2. Hesperidina, hesperitina, glicosil hesperidina.....	19
2.3. Absorção e metabolismo da hesperidina.....	20
2.4. Sistema imune inato.....	22
2.5. Macrófagos.....	23
2.6. Citocinas.....	25
2.6.1. Interleucina IL-10.....	27
2.6.2. Interleucina IL-12.....	29
2.6.3. Interleucina TNF- α	30
2.7. Óxido nítrico (NO).....	32
3. Objetivos.....	34
3.1. Geral.....	34
3.2. Específicos.....	34
4. Material e Métodos.....	35
4.1. Animais e condições experimentais.....	35
4.2. Compostos.....	35
4.3. Esquema do delineamento experimental.....	35
4.4. Delineamento experimental.....	36
4.5. Obtenção das células do exudato peritoneal.....	36
4.6. Obtenção dos sobrenadantes das culturas de células peritoneais.....	37
4.7. Determinação da produção de NO.....	38
4.8. Determinação da atividade inibitória da glicosil hesperidina e dos pré-tratamentos quanto à produção de NO.....	38
4.9. Determinação da viabilidade celular dos macrófagos.....	39
4.10. Determinação da liberação de citocinas.....	40
5. Análise estatística.....	42
6. Resultados.....	45
6.1. Viabilidade celular de macrófagos.....	45

6.2. Produção de NO.....	46
6.3. Atividade inibitória da glicosil hesperidina e dos pré-tratamentos quanto à produção de NO.....	48
6.4. Liberação de IL-10.....	50
6.5. Liberação de IL-12.....	51
6.6. Liberação de TNF- α	53
7. Discussão.....	56
8. Conclusão.....	63
9. Referências bibliográficas.....	64

LISTA DE QUADROS

Figura 1. Constituintes do suco de laranja.....	18
Figura 2. Estrutura química da G-Hesperidina, hesperidina e hesperitina.....	19
Figura 3. Esquema geral da absorção e metabolismo da hesperidina.....	22
Figura 4. Ativação dos macrófagos e a cascata de reações pela ligação ao LPS ao seu receptor (TLR-4)	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Produção de óxido nítrico por macrófagos murinos tratados com G-hesperidina, LPS e RPMI-C.....	46
Tabela 2. Inibição da produção de óxido nítrico por macrófagos murinos tratados com G-hesperidina + LPS, LPS RPMI-C.....	49
Tabela 3. Liberação da citocina IL-10 por macrófagos murinos tratados com G-hesperidina + LPS, LPS e RPMI-C.....	50
Tabela 4. Liberação da citocina IL-12 por macrófagos murinos tratados com G-hesperidina + LPS, LPS e RPMI-C.....	52
Tabela 5. Liberação da citocina TNF- α por macrófagos murinos tratados com G-hesperidina + LPS, LPS e RPMI-C.....	54

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Viabilidade celular de macrófagos murinos tratados com RPMI-C, G-hesperidina e G-hesperidina + LPS.....	45
Gráfico 2. Produção de óxido nítrico por macrófagos murinos tratados com G-hesperidina, LPS e RPMI-C.....	47
Gráfico 3. Inibição da produção de óxido nítrico por macrófagos murinos tratados com G-hesperidina + LPS, LPS e RPMI-C.....	49
Gráfico 4. Liberação da citocina IL-10 por macrófagos murinos tratados com G-hesperidina + LPS, LPS e RPMI-C.....	51
Gráfico 5. Liberação da citocina IL-12 por macrófagos murinos tratados com G-hesperidina + LPS, LPS e RPMI-C.....	53
Gráfico 6. Liberação da citocina TNF- α por macrófagos murinos tratados com G-hesperidina + LPS, LPS e RPMI-C.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TNF- α/β	Fator de necrose tumoral alfa/beta
TNF-RI	Receptores de TNF I
TNF-RII	Receptores de TNF II
IL-12	Interleucina 12
IL-10	Interleucina 10
IL-6	Interleucina 6
IL-1	Interleucina 1
TGF- β	Fator de crescimento tumoral beta
IFN- γ	Interferon gama
SGLT 1	Transportadores de glicose dependentes de sódio
G-hesperidina	Glicosil hesperidina
NK	Células natural <i>killers</i>
NO	Óxido nítrico
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
TLR	Receptores semelhantes a Toll
LPS	Lipopolissacarídeo bacteriano
Th1	Células T auxiliar (T helper tipo 1)
Th2	Células T auxiliar (tipo 2)
APCs	Células apresentadoras de antígenos
MHC classe I e II	Moléculas de histocompatibilidade classe I e II
NF- κ B	Fator nuclear kappa B
ROS	Espécies reativas de oxigênio
RNS	Espécies reativas de nitrogênio

NOS	Óxido nítrico sintase
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
RPMI-1640	Meio de cultura celular
SS	Solução salina
GH	Glicosil hesperidina
SL	Suco de Laranja
SL-GH	Suco de Laranja + Glicosil hesperidina
PBS	Tampão fosfato-salino
Q.S.P.	Quantidade suficiente para
UV	Ultravioleta
ELISA	Ensaio imunoenzimático
BSA	Bloqueador não-específico de proteínas
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico

1. INTRODUÇÃO

Estudos clínicos e epidemiológicos têm evidenciado que uma dieta equilibrada e um estado nutricional adequado contribuem para a homeostasia do sistema imune, regulando a defesa do hospedeiro e diminuindo o risco no desenvolvimento de doenças crônicas e agudas (CHANDRA, 1997, BEISEL, 1992, CHANDRA, 2002). Apesar dos nutrientes desempenharem papel regulador imprescindível no organismo, existe ainda outra classe de substâncias presentes nos alimentos que quando ingeridos regularmente promovem efeitos benéficos à saúde. Estas substâncias são denominadas “compostos bioativos”, os quais são constituintes extra-nutricionais que ocorrem em pequenas quantidades nos alimentos, variando amplamente em suas estruturas químicas e funções. Inclui os compostos fenólicos e sua subcategoria, os flavonóides, que estão presentes em todas as plantas e têm sido amplamente estudados em frutas, hortaliças, cereais, legumes, nozes, óleo de oliva, chás e vinho (KRIS-ETHERTON et al., 2002).

Os alimentos que contêm compostos bioativos podem eventualmente ser considerados alimentos funcionais, pois quando consumidos como parte da dieta usual contribuem não somente com os nutrientes tradicionais, mas também conferem efeitos adicionais que protegem contra as doenças comuns. Neste contexto o suco de laranja apresenta características de um alimento funcional devido ao seu alto teor de vitamina C, ácido fólico, potássio, compostos bioativos, como os carotenóides e os flavonóides cítricos (SILALAH et al., 2002).

A hesperidina é uma flavanona encontrada principalmente no suco de laranja e tem sido atribuído a este composto propriedades anti-inflamatórias,

antioxidantes, antitumorais, antivirais, hipolipidêmicas, entre outras (GARG et al., 2002, BENAVENTE-GARCIA e CASTILLO, 2008). Devido à baixa solubilidade do produto natural, foi desenvolvida uma forma sintética denominada de glicosil hesperidina (GH), que apresenta alta solubilidade em relação à hesperidina presente naturalmente nos alimentos (HIJIYA et al., 1991; YAMADA et al., 2006).

Estudos que avaliam os efeitos dos compostos bioativos na resposta imune utilizam modelos celulares que são capazes de representar os mecanismos de ação envolvidos durante o processo de ativação celular. Os macrófagos são amplamente utilizados, pois representam uma classe de fagócitos do sistema imune inato, que se destacam desde o início da resposta imune contra substâncias e agentes estranhos ao organismo. Sua ativação é um fenômeno complexo caracterizado pela liberação de mediadores químicos (óxido nítrico, peróxido de hidrogênio) e citocinas como TNF- α , IL-12, IL-10, IL-6, IL-1 que atuam de forma regulada, a fim de eliminar os agentes estranhos, por meio de um processo denominado inflamação (JANEWAY et al., 2007, MOSSER e EDWARDS, 2008; ABBAS et al., 2008).

Cabe ressaltar que apesar da hesperidina ser amplamente estudada, poucas pesquisas tem mostrado o papel da glicosil hesperidina e sua relação com a liberação de mediadores químicos e citocinas durante a resposta imune inata em macrófagos. Além disso, pouco se conhece sobre os efeitos da hesperidina quando administrada na forma de suco de laranja.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Suco de Laranja

O suco de laranja é o suco de fruta mais consumido no mundo todo (PEREZ-CACHO e ROUSEFF, 2008). Rico em vitaminas, como a vitamina C e o folato, em minerais como potássio e em açúcares naturais e flavonóides cítricos, denominados hesperidina e naringenina. Dos nutrientes mais prevalentes no suco de laranja, a vitamina C merece destaque, pois é encontrada em fontes alimentares específicas como as frutas, especialmente as cítricas (USDA, 2007). A vitamina C, também denominada ácido ascórbico, é um antioxidante hidrossolúvel, capaz de reagir diretamente contra os radicais livres superóxido, hidroxilas e oxigênio *singlet* que podem causar danos a membranas celulares, DNA e lipídeos plasmáticos (SAUBERLICH, 1994). Além disso, participa como cofator na biossíntese do colágeno, da carnitina e de neurotransmissores e está associada à redução do risco de doenças como câncer e doença cardiovascular (SILALAH, 2002). Os principais nutrientes presentes em um copo de 200 mL de suco de laranja são mostrados no Quadro 1.

Figura 1. Constituintes do suco de laranja presentes em um copo de 200mL

Constituintes	Copo de suco de laranja
Energia	45 Kcal
Potássio	190 mg
Vitamina C	40 mg
Folato	44 µg
Hesperidina	117 mg
Naringenina	12 mg

(USDA, 2007 e MORAND, 2009)

2.2. Hesperidina, hesperitina e glicosil hesperidina

Hesperidina é um tipo de flavonóide cítrico, classificado como uma flavanona glicosídica, cuja estrutura química é constituída pela hesperitina (forma aglicona) ligada aos açúcares glicose e a ramnose na posição 7 (YAMADA, et al., 2006). Está presente naturalmente em frutas cítricas, principalmente no suco de laranja e suas quantidades podem variar de acordo com o solo, clima, variedade da fruta, e tipo de suco (MANTHEY et al., 2001). Apesar de ser reconhecida a importância biológica dos flavonóides cítricos, ainda não há recomendações para a ingestão (KNEKT et al., 2002). Nos EUA, o consumo individual médio diário de frutas cítricas e suco de frutas tem sido estimado em 68g, dos quais 59g são consumidos em sucos, geralmente de laranja (ERLUND et al., 2001). No Brasil, não existem dados disponíveis sobre a ingestão específica dos flavonóides cítricos.

À hesperidina são atribuídas múltiplas atividades biológicas, tais como anti-inflamatória, antiviral, hipolipidêmica, antitumoral, entre outras (BENAVENTE-GARCIA e CASTILLO, 1997; BERKARDA et al., 1998; GARG et al., 2001; MATSUMOTO et al., 2004, BENAVENTE-GARCIA e CASTILLO, 2008). Contudo, apesar de apresentar muitos efeitos benéficos, a hesperidina é muito pouco solúvel em água (<0,01%) o que a torna pouco biodisponível para o organismo. Em 1991, Hijiya et al., patentearam uma forma sintética da hesperidina, denominada glicosil hesperidina (G-hesperidina), por meio da transglicosilação com ciclodextrina glicoranotransferase da bactéria *Bacillus stearothermophilus*. Desta forma, a G-hesperidina se torna mais solúvel (10.000 vezes) que a hesperidina, além disso, tem sido confirmado que as atividades biológicas da G-hesperidina são iguais ou melhores do que a da

hesperidina (YAMADA et al., 2006). A estrutura química da hesperidina, G-hesperidina e hesperitina podem ser visualizadas no Quadro 2.

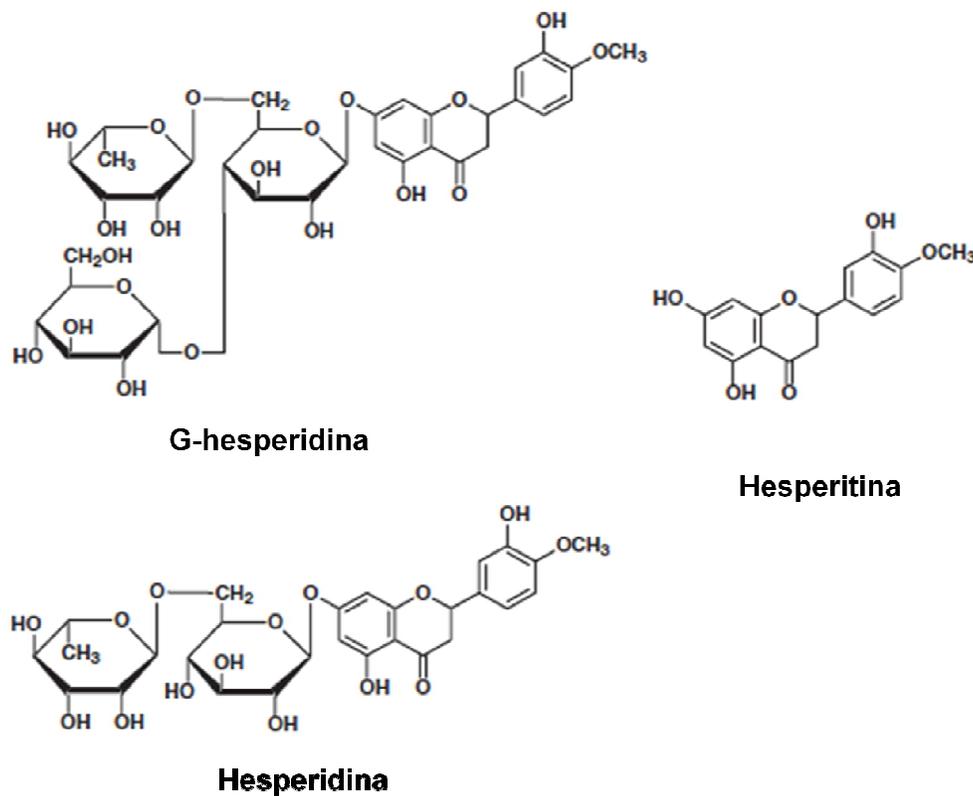


Figura 2. Estrutura química da G-Hesperidina, hesperidina e hesperitina (YAMADA et al., 2006)

2.3. Absorção e metabolismo da hesperidina

O mecanismo de absorção, metabolismo e ação dos flavonóides cítricos no organismo ainda não estão totalmente elucidados, entretanto estudos demonstram, de forma geral, que no intestino delgado a absorção dos flavonóides parece ocorrer através da especificidade das enzimas intestinais pela molécula de açúcar ligada ao composto (ERLUND, 2004), envolvendo

transportadores de glicose dependentes de sódio 1 (SGLT 1) (YAMADA et al., 2006).

Em relação à hesperidina, estudos indicam que esta, após a ingestão, é hidrolisada pela microflora intestinal e absorvida no cólon em sua forma aglicona (hesperitina) (MANACH et al., 2003) e as principais enzimas envolvidas na hidrólise são as hidrolases (floridina hidrolase lactase (LPH) e glicosidases (α -glicosidases, glicosidade citosólica (CBG) (ERLUND, 2004). Posteriormente, na parede intestinal, a hesperitina sofre reações de conjugação, tais como glicuronidação e metilação (MANACH et al., 1998; SPENCER et al., 1999), forma na qual é conduzida pelo sistema-porta dos enterócitos ao fígado, onde sofrerá outras reações, como metilação, sulfatação e glicuronidação, formando uma variedade de metabólitos (SCALBERT et al., 2002, MATSUMOTO et al., 2004). É importante ressaltar que uma parte da hesperidina absorvida é convertida em hesperitina, entretanto a outra parte da hesperidina que não sofre deglicosilação é parcialmente conjugada, e imediatamente liberada da circulação e excretada sob a forma de metabólitos na urina sem que haja reabsorção renal tubular (MATSUMOTO et al., 2004; YAMADA et al., 2006). Finalmente, os metabólitos (hesperitina-glicuronídeos e sulfoglicuronídeos) podem ser excretados pela bile ou conduzidos aos tecidos periféricos pelo sistema sanguíneo, onde poderá desempenhar as atividades funcionais no organismo, amplamente descritas na literatura (HEIM et al., 2002).

Um importante estudo realizado por Yamada et al. (2006) comparou a absorção e a excreção urinária da G-hesperidina em relação à hesperidina em ratos. Os resultados obtidos mostraram que G-hesperidina apresenta o mesmo

perfil de metabólitos excretados na urina que a hesperidina, e que a G-hesperidina é mais eficientemente absorvida, devido à sua alta solubilidade. Os autores sugerem ainda que quando oralmente administrada a G-hesperidina é inicialmente hidrolisada pelas enzimas α -glicosidases no intestino delgado, onde ocorre a liberação da hesperidina e subsequentemente é hidrolisada a hesperitina pelas β -glicosidases por bactérias intestinais. O Quadro 3 mostra o esquema geral da absorção e metabolismo da hesperidina.

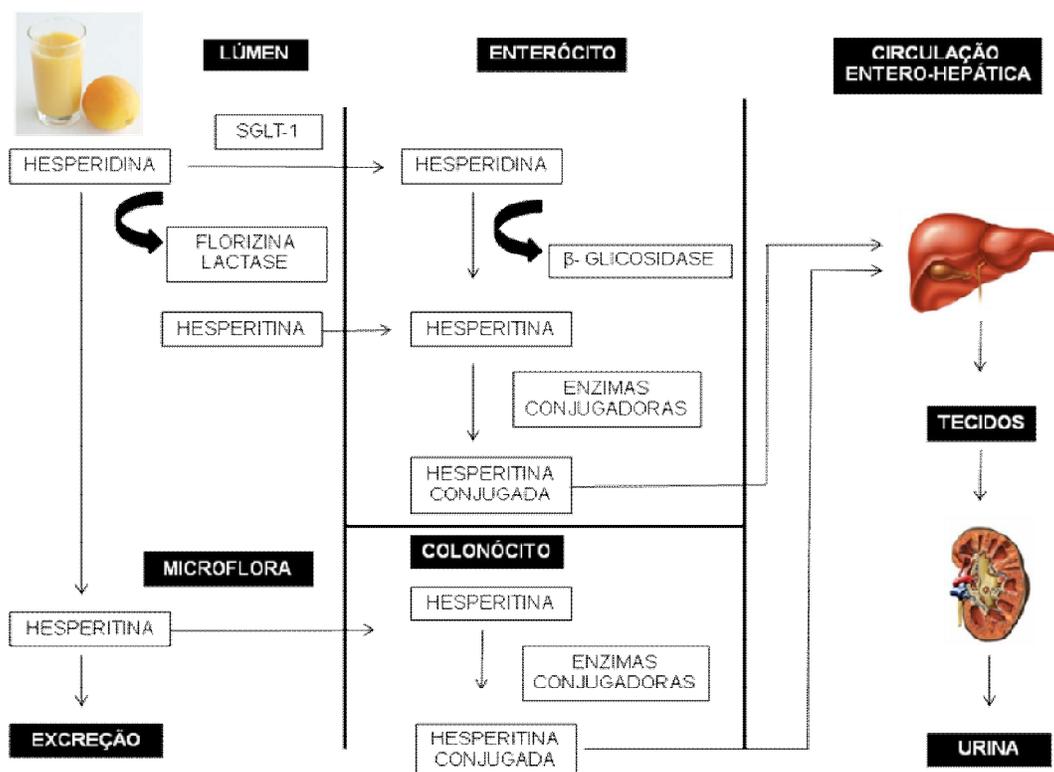


Figura 3. Esquema geral da absorção e metabolismo da hesperidina. Adaptado de Nielsen et al.(2005).

2.4. Sistema imune inato

O sistema imune tem como função proteger o organismo contra patógenos e substâncias estranhas não-infecciosas que podem desencadear uma resposta imunológica, sendo constituído por órgãos, células e moléculas que asseguram essa proteção (ABBAS et al., 2008). Imunidade inata (natural ou nativa) é a primeira linha de defesa contra os microorganismos. Consiste em mecanismos celulares e bioquímicos que já existiam antes do estabelecimento de uma infecção e que estão programados para responder rapidamente a introdução de um patógeno. Os principais componentes do sistema imunológico inato são as barreiras físicas e químicas (epitélios e substâncias antibacterianas nas superfícies epiteliais), células fagocitárias (neutrófilos e macrófagos), células *natural killer* (NK), proteínas do sangue, incluindo o sistema complemento e outros mediadores da inflamação, citocinas (que regulam e coordenam várias atividades das células da imunidade inata) (ABBAS et al., 2008).

A inflamação é uma resposta característica do sistema imune inato, caracterizada pelo aumento da permeabilidade do tecido endotelial, liberação seqüencial de mediadores biológicos e recrutamento de leucócitos circulantes, os quais se tornam ativados no local da inflamação para eliminarem o agente infeccioso, podendo provocar lesões em tecidos normais (HANADA e YOSHIMURA, 2002; ABBAS et al., 2008). Os mecanismos da imunidade inata são específicos para estruturas que são comuns a grupos de microorganismos semelhantes e não consegue distinguir diferenças discretas entre substâncias estranhas (JANEWAY et al., 2007).

2.5. Macrófagos

Os macrófagos são fagócitos do sistema imune e estão amplamente distribuídos nos tecidos. Estas células são a forma madura dos monócitos, que circulam no sangue e se diferenciam continuamente em macrófagos, após migrarem para os tecidos. A ativação dos macrófagos é um fenômeno complexo, caracterizado pelo aumento das suas atividades biológicas, as quais incluem a fagocitose de agentes estranhos, apresentação de antígenos e produção de citocinas (IL-6, IL-1, IL-12, TNF- α), intermediários de nitrogênio (NO) e de oxigênio (H_2O_2) e liberação de quimiocinas, decorrentes de estímulos celulares (JANEWAY et al., 2007; MOSSER e EDWARDS, 2008). Assim, os macrófagos apresentam uma notável plasticidade que permite a eles responder eficientemente aos sinais do ambiente celular mudando o seu fenótipo e sua fisiologia, em ambas as respostas, inatas e adaptativas (MOSSER e EDWARDS, 2008).

Os macrófagos podem responder a estímulos endógenos que são rapidamente gerados pela infecção, dano ou morte celular por meio dos receptores de reconhecimento padrão intracelular semelhantes à Toll (TLRs) e os receptores interleucina 1 (IL1-R). Esta função faz dos macrófagos um dos sensores primários de corpos estranhos (KONO e ROCK, 2008; ZANGH e MOSSER, 2008). O lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), um produto de bactérias gram-negativas, é um dos mais potentes estimuladores de macrófagos, pois induz o aumento do consumo de glicose e oxigênio, e desta forma a célula adquire a capacidade de eliminar microorganismos e células tumorais, por meio de um mecanismo refinado de reconhecimento do LPS (ADEREM e ULEVITCH, 2000; HEUMANN e ROGER, 2002). Ativação dos

macrófagos e a cascata de reações pela ligação ao LPS ao seu receptor (TLR-4) podem ser visualizadas no Quadro 4.

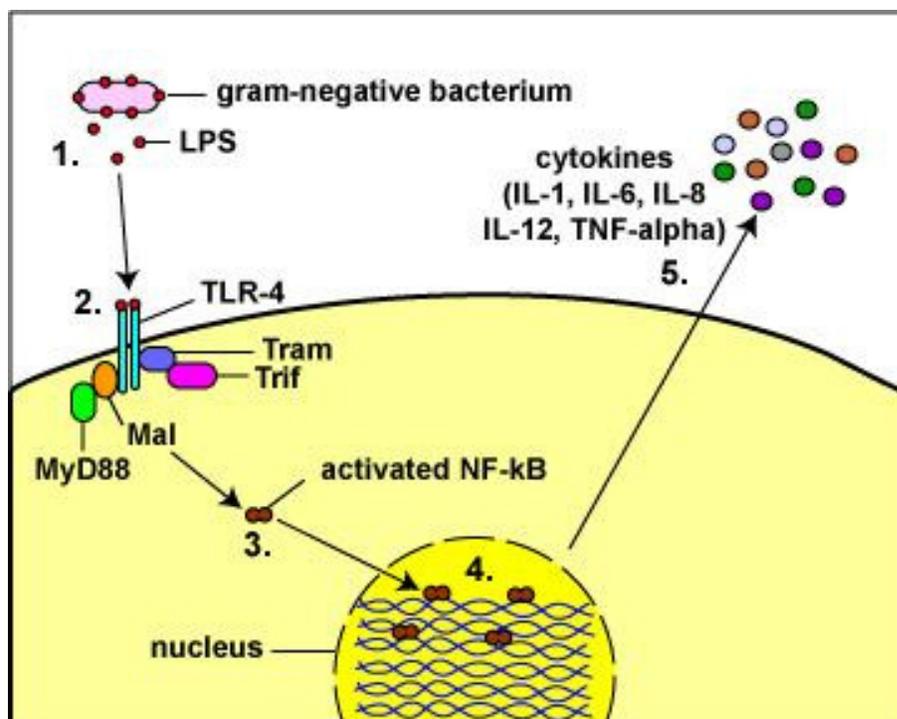


Figura 4. A lise de bactérias gram-negativas causa a liberação do LPS. O LPS na membrana celular se liga ao receptor TLR-4 do macrófago. Moléculas regulatórias dentro da célula disparam reações que ativam o fator de transcrição NF-kappa B, responsável pela inflamação. NF-kappa B, atua no núcleo celular e ativa genes que codificam citocinas tais como interleucina -1 (IL-1), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina 8 (IL-8), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 12 (IL-12). (Disponível em <http://student.ccbcmd.edu/home/>).

2.6. Citocinas

A comunicação entre as células imunes e inflamatórias é mediada em grande parte por proteínas solúveis denominadas citocinas (HERNÁNDEZ-ÚRZUA e ALVARADO-NAVARRO, 2001). Estas moléculas efetoras são produzidas por diferentes tipos celulares, especialmente por macrófagos ativados transitoriamente e que controlam localmente a amplitude e duração da

resposta imunológica. As citocinas exercem um papel fundamental na resposta inflamatória aguda e crônica iniciadas por infecção, agressão ou toxicidade celular, além de ser um componente importante da resposta imune inata por mediar muitas das suas funções (DINARELLO, 2000; YASUKAWA et al., 2000). As citocinas atuam através da ligação a receptores específicos na membrana celular, estabelecendo uma cascata que leva a introdução, ao favorecimento ou a inibição de inúmeros genes citocina-regulados no núcleo celular (DINARELLO, 2000; ABBAS et al., 2008).

Algumas citocinas promovem a inflamação e são denominadas citocinas pró-inflamatórias, enquanto outras suprimem a atividade de citocinas pró-inflamatórias, e por isso são chamadas de citocinas anti-inflamatórias. Esta classificação é baseada nos genes codificados para a síntese de mediadores moleculares que são regulados durante a inflamação, por exemplo, alguns genes codificam enzimas pró-inflamatórias, tais como fosfolipase A2, ciclooxigenase e óxido nítrico sintase que aumentam a síntese de leucotrienos, prostaglandinas e óxido nítrico (ASADULLAH et al., 2002).

Outra classificação também utilizada foi proposta por Mosmann et al (1986), na qual as citocinas podem ser divididas pelos tipos de células T: auxiliar tipo 1 (T helper, Th1) ou T auxiliar tipo 2 (Th2). Esta classificação inclui os dois maiores subtipos de células T CD4+, Th1 e Th2, e apresentam diferentes padrões de produção de citocinas, além de possuírem papéis distintos na resposta imunológica. Células Th1 murinas secretam interleucina IL-2, interferon- γ (IFN- γ), TNF- α/β e direcionam uma resposta imunológica do tipo inflamatória contra patógenos intracelulares (MOSMANN et al., 1986; MOSMANN e COFFMAN, 1989). Estas citocinas estimulam a fagocitose de

células infectadas pela ativação de macrófagos, desencadeiam a produção de anticorpos e ativam o sistema complemento que contribui com a opsonização das partículas a serem fagocitadas (MOSMANN et al., 1986). Por outro lado, linfócitos Th2 secretam IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 e medeiam uma defesa humoral, anti-inflamatória, estimulando a produção de anticorpos contra antígenos extracelulares, além de também inibirem as funções macrofágicas (MOSMANN et al., 1986). As citocinas dependendo de sua concentração, em algumas doenças são benéficas ao hospedeiro, representando um componente da defesa imunológica. Em outros casos, entretanto, elas podem causar um conjunto de manifestações tais como agressão tecidual, perda de peso e choque (ABBAS et al., 2008).

2.6.1. Interleucina-10 (IL-10)

A IL-10 é uma importante citocina imuno-regulatória produzida por muitas populações celulares. Sua principal ação biológica parece ser a limitação e finalização da resposta inflamatória, bem como a regulação da diferenciação e proliferação de células T e B, células NK e células apresentadoras de antígenos (ASADULLAH et al., 2003). Inicialmente acreditava-se que a IL-10 inibia a produção de citocinas das células apresentadoras de antígenos, tais como macrófagos e células dendríticas. Entretanto, atualmente já se sabe que a IL-10 também desempenha um importante papel ao bloquear a produção de citocinas, a expressão de moléculas co-estimulatórias (CD80, CD86 e MHC classe II) e secreção de quimiocinas (PESTKA et al., 2004). Pesquisas têm mostrado que a IL-10 medeia propriedades imuno estimulatórias que ajudam a eliminar infecção e

partículas não-infecciosas ao promover uma limitada inflamação (ASADULLAH et al., 2003; MOCELLIN et al., 2003), além de promover um impacto na inflamação e doenças malignas e auto-imunes (MOORE et al., 2001).

O mecanismo pelo qual a IL-10 atua em proteínas inflamatórias é controlado transcricionalmente pelo NF-kappa B, por isso foi sugerido que IL-10 pode exercer uma parte significativa das propriedades anti-inflamatórias ao inibir este fator de transcrição (MOORE et al., 2001). Na resposta imune inata, a IL-10 é um potente inibidor de macrófagos e de células dendríticas ativadas que atuam no controle das reações da resposta imune inata e adquirida. A IL-10 inibe a produção de IL-12, a qual é um estímulo crítico para a secreção de IFN- γ , que por sua vez age como indutor das reações imunológicas intracelulares, desta forma, IL-10 age para regular negativamente todas essas reações (ABBAS et al., 2008). Assim, pode-se considerar que IL-10 é uma citocina pluripotente com efeitos em numerosas populações celulares, especialmente em células imunes residentes e circulantes. Isto faz desta citocina uma importante molécula na imuno-regulação do hospedeiro. Enquanto dados iniciais após a descoberta da IL-10 mostrava que esta citocina mediava principalmente funções supressoras, dados recentes mostram propriedades estimulatórias em certas populações celulares (MOCELLIN et al., 2003; ASADULLAH et al., 2004).

2.6.2. Interleucina-12 (IL-12)

A IL-12 é uma proteína heterodímera produzida por fagócitos e células apresentadoras de antígenos em ambas as respostas, inata e adaptativa. Esta citocina representa um fator chave na indução da ativação de macrófagos

dependentes e independentes de células T, na geração de células Th1 e células T citotóxicas e na resistência às infecções bacterianas e parasitárias (MA, 2001). Além disso, é o mediador inicial de uma seqüência de respostas, que envolvem macrófagos, células NK e linfócitos T e que resulta na eliminação de microorganismos intracelulares (ABBAS et al., 2008; HERNÁNDEZ-ÚRZUA e ALVARADO-NAVARRO, 2001).

A IL-12 atua primeiramente em três estágios durante a resposta imune inata e adaptativa: 1) no início da infecção a IL-12 é produzida e induz a produção de IFN- γ através de células NK e células T, o qual contribui para a ativação de células fagocíticas e inflamação; 2) IL-12 induzida por IFN- γ favorece a diferenciação celular de células Th1 ao primar células T CD4⁺ para uma alta produção de IFN- γ e 3) IL-12 contribui para a produção, proliferação e diferenciação de células Th1 em resposta a antígenos. A IL-12 representa uma ponte funcional entre a resposta inata e subsequente imunidade adaptativa antígeno-específico (TRINCHIERI, 1995). Assim, a imunidade inata atua contra agentes invasores, mediada pela IL-12 na seguinte ordem: agentes invasores → resposta dos macrófagos e células dendríticas → secreção de IL-12 → secreção de IFN- γ → ativação dos macrófagos → destruição dos microorganismos (ABBAS et al., 2008).

A sinalização pela IL-12 é disparada por receptores semelhantes Toll (TLRs), induzida por muitos estímulos microbianos (LPS), infecção por bactérias intracelulares e infecção por vírus (ABBAS et al., 2008). Existem mecanismos efetivos que regulam negativamente a produção de IL-12 e a responsividade de células T e NK para IL-12. A citocina IL-10 é uma citocina produzida pelas células fagocíticas. A habilidade da IL-10 em suprimir a

produção de IFN- γ e outras citocinas secretadas por Th1 é devido primeiramente à inibição de IL-12 pelas APCs e pela inibição da expressão de outras moléculas co-estimulatórias de superfície e citocinas pró-inflamatórias, outra citocina inibidora de IL-12 é o TGF- β (TRINCHIERI, 1997).

2.6.3. Fator de Necrose Tumoral (TNF)

O termo fator de necrose tumoral se refere a duas citocinas codificadas por genes separados conhecidas como fator de necrose tumoral- α e fator de necrose tumoral- β . Ambas as citocinas interagem com os mesmos receptores de superfície e têm sido implicadas como mediadores patogênicos de algumas doenças humanas. O TNF é sintetizado por macrófagos e outras células em resposta a toxinas bacterianas, produtos inflamatórios e outros estímulos invasivos (TRACEY e CERAMI et al., 1994). O TNF é o principal mediador da resposta inflamatória aguda, produzida principalmente por macrófagos ativados (BEUTLER, 1995). Atua no início da resposta imune, ao regular a cascata de citocinas durante a resposta inflamatória, além de ser responsável por muitas das complicações sistêmicas de infecções graves (MAKHATADZE, 1998). Existem dois receptores distintos de TNF, TNF-RI e TNF-RII, ambos os receptores estão presentes em quase todos os tipos celulares. Os receptores de TNF são membros de uma grande família de proteínas, das quais muitas estão envolvidas nas respostas imunes e inflamatórias (TRACEY e CERAMI, 1995; ABBAS et al., 2008).

As principais funções do TNF incluem o recrutamento de neutrófilos e monócitos para os locais de infecção, a fim de eliminar microorganismos (BEUTLER, 1995). O TNF também atua mediando ações sobre células do

endotélio vascular e leucócitos para que expressem moléculas de adesão e posteriormente induzam a quimiotaxia de leucócitos e secreção da citocina IL-1, que age semelhantemente ao TNF. Um estímulo potente para desencadear a produção de TNF por macrófagos é a ligação de receptores semelhantes à Toll com LPS, e a liberação de interferon- γ , produzido por células NK e células T (GRELL E SCHEURICH, 1997). Em infecções graves, o TNF é produzido em grandes quantidades podendo causar desordens sistêmicas, ao penetrar na corrente sanguínea e agir em locais distantes como um hormônio endócrino (ABBAS et al., 2008). As principais ações sistêmicas do TNF incluem ação no hipotálamo para induzir febre, uma vez que a produção de febre em resposta ao TNF e IL-1 é mediada pela síntese aumentada de prostaglandinas por células hipotalâmicas estimuladas por citocinas. A produção prolongada de TNF pode causar a perda de células musculares e adiposas e níveis circulantes elevados também podem levar a distúrbios metabólicos graves, devido ao seu efeito hipoglicemiante (quedas bruscas nos níveis de glicose sanguínea) (TRACEY e CERAMI, 1995; GRELL e SCHEURICH, 1997).

2.7. Óxido nítrico (NO)

Além da secreção de citocinas, as células do sistema imune inato, especialmente os macrófagos, respondem a invasão de agentes estranhos ao produzirem mediadores celulares capazes de combater estes microorganismos. Os compostos intermediários do nitrogênio (RNS) e do oxigênio (ROS) representam importantes mediadores da atividade microbicida e antitumoral dos macrófagos, por atuarem na sinalização e regulação da resposta imune e inflamatória das doenças infecciosas (VOLDOUKIS et al.,

1995). O óxido nítrico é uma molécula gasosa que apresenta um elétron desemparelhado, portanto, é um radical livre. É sintetizado por uma família de enzimas designadas óxido nítrico sintase (NOS), que converte o átomo de nitrogênio do aminoácido L-arginina em NO e posteriormente em nitrito e L-citrulina (MONCADA et al., 1991; MONACADA, 1999).

Três isoenzimas foram identificadas como responsáveis pela produção de NO e foram denominadas de neuronal (nNOS ou NOS 1), induzível (iNOS ou NO 2) e endotelial (eNOS ou NOS 3) (MONCADA et al., 1991). O NO está envolvido em numerosos processos homeostáticos como regulação do tônus vascular, modulação da citotoxicidade por macrófagos ativados, regulação da proliferação celular, regulação da migração celular, ativação de fatores de transcrição, indução de genes citoprotetores, modulação da produção de citocinas tóxicas e neurotransmissão no sistema nervoso central e periférico (MONCADA e HIGGS, 1995; GROSS e WOLIN, 1995). Na inflamação, os macrófagos são ativados e expressam a enzima iNOS, que por sua vez aumentam de maneira significativa os níveis de produção de NO, que parece atuar como um mecanismo efetor celular contra patógenos (BRÜNE et al., 1998).

A exposição prolongada a grandes quantidades de NO, como na ativação da iNOS, inibe a atividade de várias enzimas, como a aconitase, citocromo C oxidase e ribonucleotídeo redutase e desta forma, o NO pode se tornar citotóxico muito provavelmente pela formação de peroxinitrito (BOLANOS et al., 1997). Entretanto, existe no organismo, um controle homeostático apropriado que faz com que esse mediador atue como um sinal

útil em determinado evento fisiológico ou, ao contrário, seja citotóxico devido a uma síntese excessiva (ACHIKE e KWAN, 2003).

Um nível elevado de NO via iNOS pode destruir não somente os tecidos adjacentes mas também infiltrados de macrófagos ou células T na lesão inflamatória e causar morte apoptótica dessas células inflamatórias, o que é considerado benéfico para eliminar células desnecessárias prevenindo a liberação do conteúdo intracelular, potencialmente tóxicos ao meio extracelular (ALBINA et al., 1993, OKUDA et al., 1996). A expressão da iNOS é regulada principalmente por citocinas. O NO pode inibir a secreção de citocinas inflamatórias como interferon- γ (IFN- γ) e IL-2 das células T (OKUDA et al., 1996). A indução da transcrição da iNOS é feita pelas citocinas derivadas das células T. As citocinas de padrão Th1, como o IFN- γ e IL-2, regulam positivamente o NO, enquanto que a regulação negativa é feita pela IL-4 e IL-10, citocinas de perfil Th2 (TAYLOR-ROBINSON et al., 1994).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar os efeitos da ingestão do suco de laranja, da glicosil hesperidina e da mistura de ambos sobre o sistema imune inato de camundongos.

3.2. Objetivos específicos

Determinar a produção e inibição da produção de óxido nítrico e a liberação das citocinas IL-10, IL-12 e TNF- α em culturas de macrófagos murinos tratados previamente com suco de laranja como fonte natural de hesperidina, glicosil hesperidina e a mistura de ambos os compostos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Animais e condições experimentais

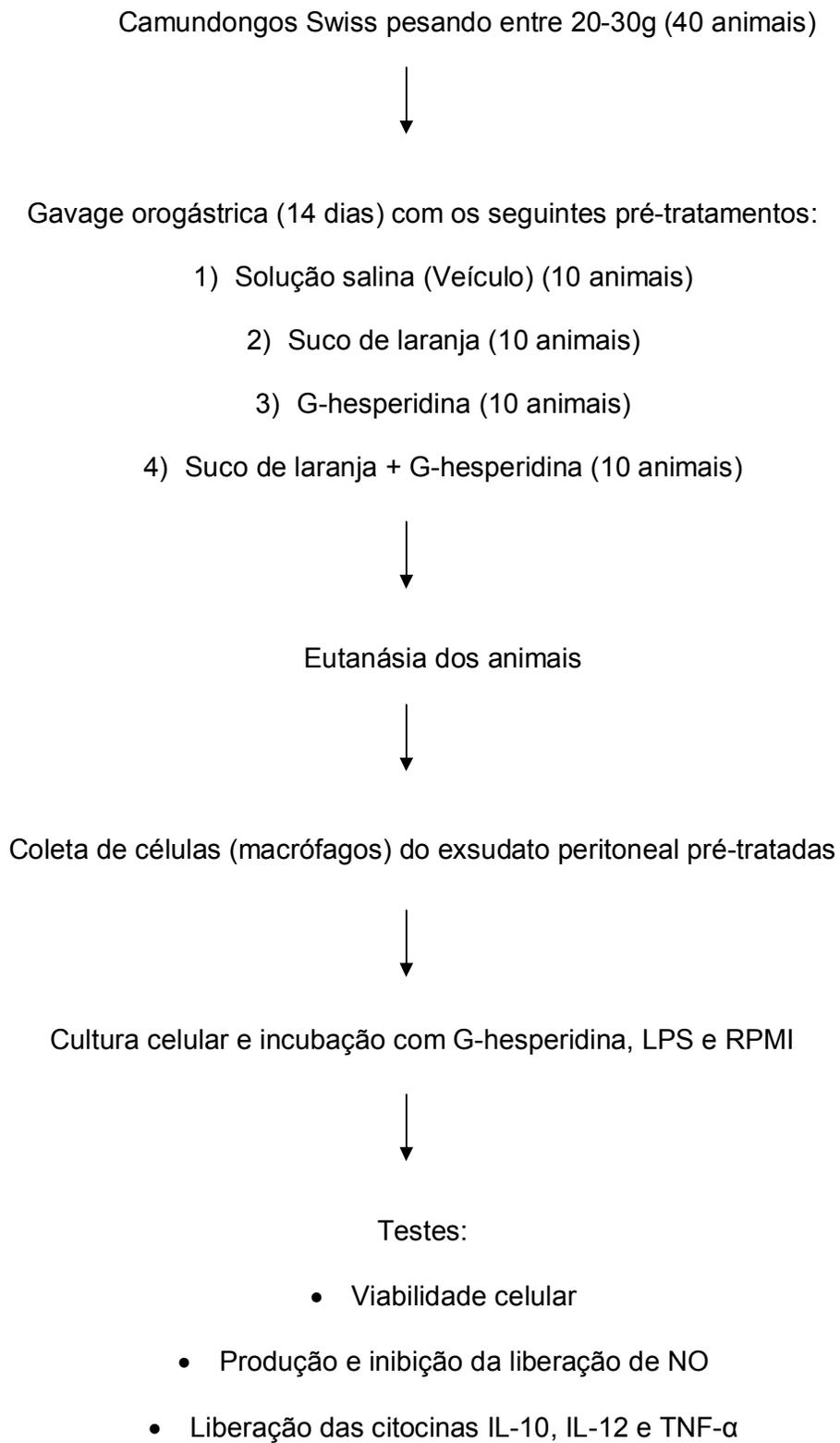
Foram utilizados 40 camundongos Swiss, fêmeas, pesando entre 20-30g, 45-60 dias de idade, provenientes do Biotério Central da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP. Os camundongos foram escolhidos de acordo com o peso acima especificado para evitar grandes variações na administração da solução que continha glicosil hesperidina, ajustada em uma concentração de 100mg/Kg de peso corporal. Os animais foram acondicionados em gaiolas de polietileno e mantidos em grupos de cinco animais/gaiola, em condições estáveis de ambiente (23°C, 56% de umidade relativa do ar) e ciclos claro/escuro de 12 horas. Foram ofertados água e ração (Labina, Purina®) *ad libitum*.

4.2. Compostos

- Glicosil hesperidina (G-hesperidina) em pó não-estéril (cedido pela empresa Hayashibara Company Ltd. – Japão)
- Suco de laranja pronto para consumo (cedido pela empresa Citrosuco Paulista S/A (Grupo Fisher), Matão – SP – Brasil)

Os compostos foram preparados diariamente em câmara de fluxo laminar estéril e separados em becker individuais de 10mL. Para a administração dos compostos foi utilizado seringa de 1 mL e agulha de gavage. A concentração de G-hesperidina utilizada foi de 100mg/Kg de peso corporal e os animais foram pesados em dias alternados para o ajuste da concentração da G-hesperidina.

4.3. Esquema do delineamento experimental



4.4. Delineamento experimental

Experimento *in vivo*

Os animais foram divididos em quatro grupos (10 animais/grupo) e receberam durante quatorze dias, por gavagem orogástrica, os seguintes compostos:

- 1) Solução salina (SS): animais receberam 0,5mL de solução salina;
- 2) G-hesperidina (GH): animais receberam 0,5mL de uma solução contendo G-hesperidina diluída em solução salina;
- 3) Suco (SL): animais receberam 0,5mL de suco de laranja;
- 4) Suco de Laranja e G-hesperidina (SL-GH): animais receberam 0,5mL de uma solução contendo G-Hesperidina diluída em suco de laranja.

Após o pré-tratamento com os compostos supracitados, as células dos animais foram coletadas e cultivadas na presença de G-hesperidina ou LPS (controle positivo) ou somente em meio de cultura RPMI (controle negativo) para a realização dos testes *in vitro*.

4.5. Obtenção das células do exsudato peritoneal

Experimento *ex vivo*

Os animais foram previamente estimulados pela inoculação intraperitoneal de 3,0mL de tioglicolato de sódio (DIFCO Lab. LTDA) a 3,0% três dias antes de serem eutanasiados em câmara de CO₂. Estes animais tiveram a pele da região abdominal retirada assepticamente em câmara de fluxo laminar Classe 100 (Veco) e o peritônio exposto. Posteriormente foram inoculados 5,0mL de PBS, pH 7,2 gelado na cavidade abdominal. O líquido peritoneal resultante foi coletado com seringa e agulha, transferido para um

tubo cônico estéril com capacidade de 15,0mL (Corning, Inc.) e centrifugado a 63g durante 5 minutos (Centrífuga Fanem, Ind. Bras.) e o sedimento celular lavado três vezes com 3,0mL de PBS. Após a última lavagem as células foram ressuspendidas em 1,0mL de meio de cultura RPMI-1640 (Sigma) contendo 2β-mercaptoetanol (Sigma) a $2 \times 10^{-5}M$, penicilina 100U/mL (Sigma), estreptomicina 100U/mL (Sigma), L-glutamina 2mM (Sigma) e 5% de soro fetal bovino (Cultilab), sendo o meio assim composto designado de RPMI-1640 completo (RPMI-1640-C) para a contagem de células. O número de células foi determinado pela contagem em câmara hemocitométrica tipo Neubauer (Boeco, Germany) e a suspensão celular ajustada à concentração de 5×10^6 células para realização dos testes propostos.

4.6. Obtenção dos sobrenadantes das culturas de células peritoneais

Experimento *in vitro*

As células peritoneais foram ajustadas à concentração de 5×10^6 células/mL em meio RPMI-1640-C e distribuídas em placas de cultura celular estéreis de 24 cavidades (Corning, Inc.). A cada cavidade foi adicionado 0,5mL da suspensão celular e as placas foram incubadas a 37°C por 60 minutos em estufa contendo tensão constante de 5% de CO₂ (Forma Scientific). Após esta incubação, as células não aderentes foram descartadas e lavadas com meio de cultura RPMI-1640-C. Sobre os macrófagos que ficaram aderidos à placa foram adicionados:

- 1) 0,5mL de meio RPMI-1640-C + G-hesperidina (117μM) diluída em 0,5mL de meio RPMI-1640-C;

- 2) 0,5mL de LPS (10µg/mL) + 0,5mL de meio RPMI-1640-C como controle positivo;
- 3) 1mL de meio RPMI-1640-C como controle negativo.

Posteriormente, as placas foram novamente incubadas a 37°C em estufa com tensão constante de 5% de CO₂ (Forma Scientific) por mais 24 horas. Em seguida, os sobrenadantes das culturas foram coletados, aliquotados e estocados em freezer a -80°C até o momento da determinação das citocinas.

4.7. Determinação da produção de óxido nítrico (NO)

O NO foi quantificado espectrofotometricamente pelo acúmulo de nitrito no sobrenadante da cultura de células por meio da reação de diazotação com o reagente de Griess (composto de 1g de sulfanilamida (Merck), 0,1g de dicloro N(1-naftil) etilenodiamina (Merck), 2,5mL de ácido ortofosfórico (Mallinckrodt Chemical) e água deionizada q.s.p 100mL), conforme descrito por Green et al. (1982).

Alíquotas de 50µL dos sobrenadantes das culturas de células do exsudato peritoneal foram transferidas para outra placa de cultura de células não estéril contendo 96 cavidades de fundo planas (Corning, Inc.) e foram acrescidas com igual volume de reagente de Griess. Após 10 minutos de incubação em temperatura ambiente ao abrigo da luz, a absorvância foi determinada em UV/visível com filtro de 540nm em espectrofotômetro (Microplate Reader, Multiskan Ascent, Labsystems). As concentrações de NO liberado nos sobrenadantes das culturas celulares foram calculadas a partir de uma curva padrão, previamente estabelecidas, com concentrações molares

conhecidas de nitrito de sódio e os valores foram expressos em μmol de nitrito/ 5×10^5 células.

4.8. Determinação da atividade inibitória da glicosil hesperidina e dos pré-tratamentos quanto à produção de NO

As células peritoneais foram ajustadas à concentração de 5×10^5 células/mL em meio RPMI-1640-C e distribuídas em placas de cultura celular estéreis de 96 cavidades (Corning, Inc.). A cada cavidade foi adicionado $100 \mu\text{L}$ da suspensão celular e as placas foram incubadas a 37°C por 60 minutos em estufa contendo tensão constante de 5% de CO_2 (Forma Scientific). Após esta incubação, as células não aderentes foram descartadas e lavadas com meio de cultura RPMI-1640-C. Sobre os macrófagos que ficaram aderidos à placa foi adicionado:

- 1) $100 \mu\text{L}$ de meio RPMI-1640-C + $100 \mu\text{L}$ de LPS ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$) + G-hesperidina ($117 \mu\text{M}$) diluída em $100 \mu\text{L}$ de meio RPMI-1640-C;
- 2) $200 \mu\text{L}$ de meio RPMI-1640-C + $100 \mu\text{L}$ de LPS ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$) como controle positivo;
- 3) $300 \mu\text{L}$ de meio RPMI-1640-C como controle negativo.

Posteriormente, as placas foram novamente incubadas a 37°C em estufa com tensão constante de 5% de CO_2 (Forma Scientific) por mais 24 horas. A produção de NO foi medida espectrofotometricamente através do acúmulo de nitrito no meio de cultura com a utilização do reagente de Griess conforme descrito no item 4.6.

4.9. Determinação da viabilidade celular dos macrófagos

O ensaio colorimétrico do MTT tem como princípio a redução do sal MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difenil bromo tetrazólio, pela desidrogenase mitocondrial das células vivas, para um produto de reação MTT-formazana de coloração azul escuro (Mosmann, 1983).

Em placa de cultura de células estéril de 96 cavidades (Corning, Inc.) foram distribuídos 100 μ L por cavidade das suspensões de células do exsudato peritoneal ajustadas à concentração de 5×10^6 células/mL em meio de cultura RPMI-1640-C em presença de:

- 1) 100 μ L de meio RPMI-1640-C + G-hesperidina (117 μ M) diluída em 100 μ L de meio RPMI-1640-C;
- 2) 100 μ L LPS (10 μ g/mL) + G-hesperidina (117 μ M) diluída em 100 μ L de meio RPMI-1640-C como controle positivo;
- 3) 200 μ L de meio de cultura RPMI-1640-C.

As placas foram incubadas por 24 h a 37°C em estufa contendo tensão constante de 5% de CO₂ (Forma Scientific). Após esta incubação as células aderentes foram tratadas com 100 μ L de uma solução de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio), (Across Organics) a 0,5mg/mL em RPMI-1640. A placa foi então incubada por mais 3 horas nas mesmas condições anteriores. Após esta incubação os sobrenadantes foram descartados e as células aderentes tratadas com 100 μ L de isopropanol (Mallinckrodt Chemical) para solubilizar os cristais de formazana formados. A leitura da densidade ótica foi determinada em espectrofotômetro (Multiskan Ascent, Labsystems) em UV/visível a 540 nm com filtro de referência de 620 nm.

4.10. Determinação da liberação de citocinas

As citocinas IL-10, IL-12, TNF- α foram quantificadas nos sobrenadantes das culturas de macrófagos peritoneais, por meio do teste imunoenzimático ELISA sanduíche. Para esta determinação foi utilizado o Kit BD Pharmingen de acordo com as instruções dos fabricantes. As placas de 96 orifícios (Corning Inc.) foram adsorvidas com anticorpo de captura, monoclonal, obtidos de rato, anti-citocina de camundongo, na concentração adequada para cada citocina em PBS, pH 7,2 (100 μ L/cavidade) e incubadas “overnight” à temperatura ambiente. No dia seguinte, as placas foram lavadas três vezes com PBS, pH 7,2, contendo 0,05% de Tween-20 (PBS-T) e bloqueadas com 300 μ L/cavidade de BSA a 1% em PBS (PBS/BSA, com 5% de sacarose e 0,5% de azida sódica) à temperatura ambiente por 60 minutos. Após a incubação, as placas foram lavadas três vezes com PBS-T e na última lavagem foram adicionados a cada cavidade 100 μ L do padrão de citocinas ou dos sobrenadantes das culturas de células a serem testados. As placas foram incubadas à temperatura ambiente por 120 minutos, e lavadas 3 vezes com PBS/T. Em seguida, foram adicionados 100 μ L/cavidade de anticorpo monoclonal de cabra (anticorpo anti-citocina de camundongo) marcado com biotina, diluído à concentração adequada de cada citocina em diluente de reagente (1% BSA, 0,05% de Tween 20 em PBS, pH 7,2-7,4). As placas foram incubadas a temperatura ambiente por 120 minutos e lavadas três vezes com PBS-T, sendo então adicionados 100 μ L/cavidade do conjugado peroxidase-estreptavidina diluído 1/200 em diluente de reagente e incubadas novamente à temperatura ambiente por 20 minutos. Após este período de incubação, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T e em seguida adicionadas de 100 μ L do substrato [10mM de

tampão citratofosfato, contendo 0,4mM de tetrametilbenzidina (SIGMA) e 1,2mM de H₂O₂ (Mallinckrodt Chemical)] a cada cavidade. A reação foi interrompida adicionando-se 50μL de H₂SO₄ 2N a cada cavidade. A absorvância foi lida a 450nm em espectrofotômetro UV/visível para microplacas (Multiskan Ascent, Labsystems), e as concentrações de cada citocina foram quantificadas utilizando-se uma curva padrão previamente estabelecidas com quantidades conhecidas das citocinas. Os resultados foram expressos em pg/mL.

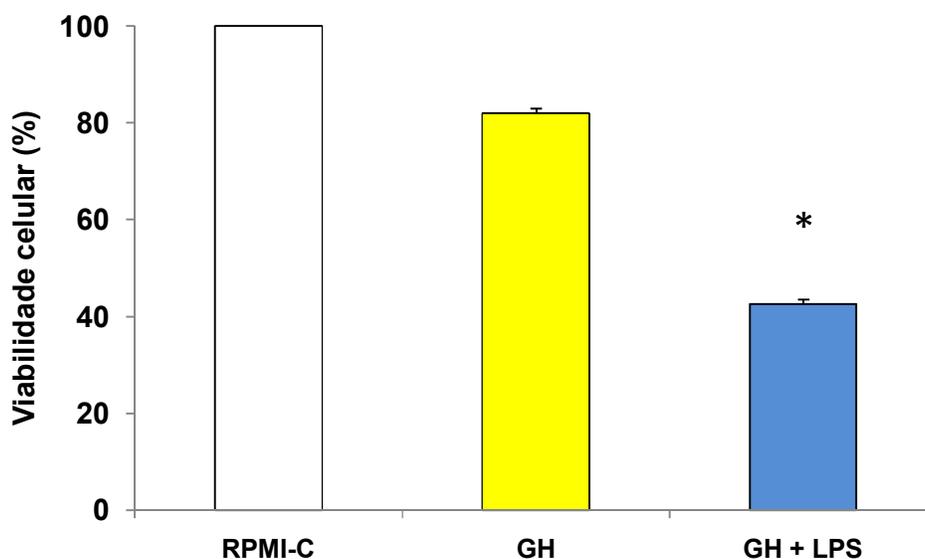
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados foi realizada com o auxílio do software Microsoft Office Excel 2003 e Sigma Stat, versão 2.03, 1995. As variáveis foram resumidas e tabuladas como média e desvio padrão. Todos os conjuntos de dados foram testados quanto à normalidade. O nível de significância adotada foi de 5% em todas as comparações efetuadas. Em seguida foi aplicada análise de variância ANOVA “Two Way” para detectar diferenças significativas entre os tratamentos e entre os grupos. Posteriormente, utilizou-se o Teste de Tukey para identificar estas diferenças.

6. RESULTADOS

6.1. Viabilidade celular de macrófagos

O teste de viabilidade celular por meio do ensaio de MTT foi realizado com o objetivo de avaliar o possível papel citotóxico da G-hesperidina em cultura de macrófagos murinos. Para este ensaio foram utilizados macrófagos peritoneais de camundongos normais. As células foram estimuladas com G-hesperidina *in vitro*, G-hesperidina + LPS *in vitro*.



* Diferença estatisticamente significativa, $p < 0,05$.

Gráfico 1. Viabilidade celular de macrófagos murinos tratados com meio RPMI-C, glicosil hesperidina (GH) e glicosil hesperidina + LPS (GH + LPS).

Neste ensaio foi avaliado se a G-hesperidina era capaz de promover citotoxicidade celular. Os resultados mostraram que as células cultivadas em meio RPMI apresentaram viabilidade celular de 100%. Na presença de G-hesperidina *in vitro*, os níveis de viabilidade celular foram maiores que 82%, sugerindo que a G-hesperidina não apresentou caráter citotóxico. Nas células

desafiadas com G-Hesperidina + LPS, os níveis de viabilidade celular foram de 43%, indicando que a G-hesperidina *per se*, não foi capaz de intervir no efeito citotóxico promovido pelo LPS capaz de causar morte celular.

6.2. Produção de NO

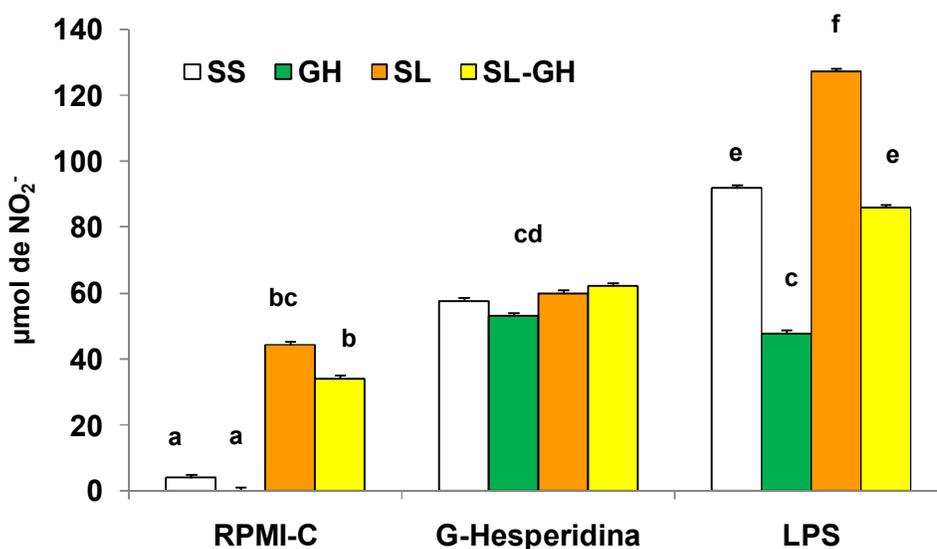
A produção de NO foi avaliada em cultura de macrófagos murinos tratados com G-hesperidina, LPS e RPMI-C. Os macrófagos foram obtidos de grupos de animais tratados previamente com solução salina como veículo (0,5mL), G-hesperidina (100mg/kg/0,5mL), suco de laranja (0,5mL) ou suco de laranja + G-hesperidina (100mg/Kg/0,5mL) por meio de gavage durante quatorze dias. A produção de nitrito (NO_2^-) foi espectrofotometricamente quantificada no sobrenadante da cultura celular por meio do reagente de Griess, os resultados foram expressos em μmol de NO_2^- (Tabela 2 e Gráfico 2).

Tabela 1. Produção de óxido nítrico por macrófagos murinos tratados com G-hesperidina, LPS e RPMI-C

Grupos de Animais	Produção de NO em macrófagos ($\mu\text{mol NO}_2^-$)		
	RPMI-C	G-hesperidina	LPS
Solução Salina	4.0 \pm 1.0 ^a	58.0 \pm 4.1 ^{cd}	92.0 \pm 5.0 ^e
G-hesperidina	0.0 \pm 0.0 ^a	53.0 \pm 2.4 ^{cd}	48.0 \pm 2.0 ^c
Suco de Laranja	44.3 \pm 4.1 ^{bc}	60.0 \pm 3.0 ^{cd}	127.0 \pm 13 ^f
Suco + G-hesperidina	34.0 \pm 4.0 ^b	62.1 \pm 4.0 ^{cd}	86.0 \pm 3.4 ^e

^a Letras iguais indicam não haver diferenças estatística entre os dados;

^{a,b,c,d,e,f} Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas, $p < 0,05$.



^a Letras iguais indicam não haver diferenças estatísticas entre os dados;

^{a,b,c,d,e,f} Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas, $p < 0,05$.

Gráfico 2. Produção de óxido nítrico por macrófagos murinos tratados com G-hesperidina, LPS e RPMI-C. Os macrófagos foram obtidos de grupos de animais tratados previamente com solução salina (SS), G-hesperidina (GH), suco de laranja (SL) ou suco de laranja + G-hesperidina (SL-GH) por meio de gavagem durante quatorze dias.

Objetivou-se com este teste, verificar o possível papel dos tratamentos prévios e da adição da G-hesperidina sobre a produção de NO em cultura de macrófagos. As células cultivadas em meio RPMI-C, pré-tratadas com SL e SL-GH produziram mais NO do que aquelas tratadas com GH ou SS, que por sua vez não produziram NO.

Na presença de G-hesperidina *in vitro*, as células produziram NO moderadamente, contudo não apresentaram diferenças em relação aos pré-tratamentos. Com a administração de LPS, o maior estímulo na produção de NO, foi promovido pelas células pré-tratadas com SL, entretanto, as células

pré-tratadas com GH diminuíram a produção de NO, quando comparada as células que receberam SS.

6.3. Atividade inibitória da glicosil hesperidina e dos pré-tratamentos quanto à produção de NO

O ensaio de inibição de NO, foi realizado em cultura de macrófagos murinos tratados com G-hesperidina + LPS, LPS e RPMI-C. Os macrófagos foram obtidos de grupos de animais tratados com solução salina como veículo (0,5mL), G-hesperidina (100mg/kg/0,5mL), suco de laranja (0,5mL) ou suco de laranja + G-hesperidina (100mg/Kg/0,5mL) por meio de gavagem durante quatorze dias. A inibição da produção de nitrito (NO_2^-) foi espectrofotometricamente quantificada no sobrenadante da cultura celular por meio do reagente de Griess, os resultados foram expressos em μmol de NO_2^- (Tabela 3 e Gráfico 3).

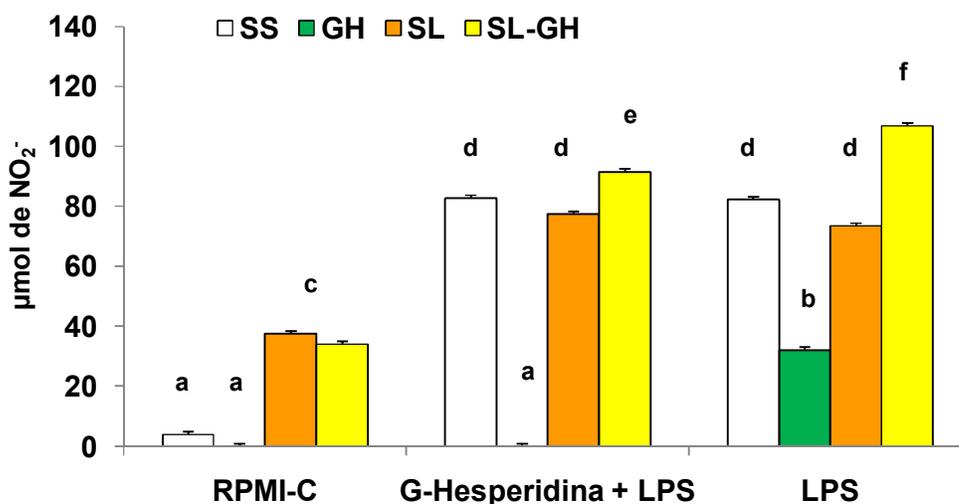
Foi investigada neste ensaio, a possibilidade de inibição da produção de NO pela G-hesperidina e pelos pré-tratamentos, quando LPS, um potente estimulador da produção de NO foi adicionado à cultura celular. As células do cultivadas em meio RPMI-C que não produziram NO foram àquelas tratadas previamente com GH, que por sua vez não diferiram das células que receberam SS. Houve uma baixa produção de NO nas células tratadas com SL e SL-GH e ambos os tratamentos não foram diferentes.

Tabela 2. Produção de NO por macrófagos murinos tratados com G-hesperidina + LPS, LPS e RPMI-C

Grupos de Animais	Inibição da produção de NO em macrófagos ($\mu\text{mol NO}_2^-$)		
	RPMI-C	G-hesperidina + LPS	LPS
Solução Salina	4.0 ± 1.0^a	83 ± 2.0^d	82.2 ± 3.0^d
G-hesperidina	0.0 ± 0.0^a	0.0 ± 0.0^a	32.1 ± 3.0^b
Suco de Laranja	38.0 ± 4.3^c	77.4 ± 2.4^d	73.4 ± 2.3^d
Suco + G-hesperidina	34.0 ± 4.0^c	92.0 ± 2.3^e	107.0 ± 6.0^f

^a Letras iguais indicam não haver diferenças estatística entre os dados;

^{a,b,c,d,e,f} Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativas, $p < 0,05$.



^a Letras iguais indicam não haver diferenças estatística entre os dados;

^{a,b,c,d,e,f} Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativa, $p < 0,05$.

Gráfico 3. Inibição da produção de óxido nítrico por macrófagos murinos tratados com G-hesperidina + LPS, LPS e RPMI-C. Os macrófagos foram obtidos de grupos de animais tratados previamente com solução salina (SS), G-hesperidina (GH), suco de laranja (SL) ou suco de laranja + G-hesperidina (SL-GH) por meio de gavage durante quatorze dias.

6.4. Liberação de IL-10

A liberação da citocina IL-10 foi avaliada em cultura de macrófagos murinos tratados com G-hesperidina, LPS e RPMI-C. Os macrófagos foram obtidos de grupos de animais tratados com solução salina como veículo (0,5mL), G-hesperidina (100mg/kg/0,5mL), suco de laranja (0,5mL) ou suco de laranja + G-hesperidina (100mg/Kg/0,5mL) por meio de gavagem durante quatorze dias. A produção de IL-10 foi quantificada no sobrenadante da cultura de macrófagos por meio do teste imunoenzimático ELISA e os resultados foram expressos em pg/mL (Tabela 4 e Gráfico 4).

Tabela 3. Liberação da citocina IL-10 por macrófagos murinos tratados com G-hesperidina, LPS e RPMI-C.

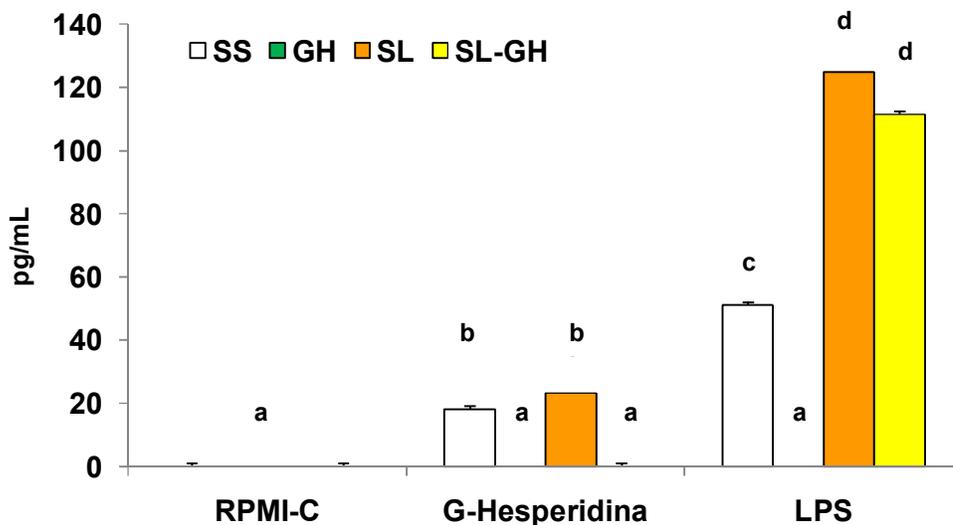
Grupos de Animais	Liberação de IL-10 em macrófagos (pg/mL)		
	RPMI-C	G-hesperidina	LPS
Solução Salina	0.0 ± 0.0 ^a	18.2 ± 4.3 ^b	51.0 ± 9.0 ^c
G-hesperidina	0.0 ± 0.0 ^a	0.0 ± 0.0 ^a	0.0 ± 0.0 ^a
Suco de Laranja	0.0 ± 0.0 ^a	23.3 ± 4.0 ^b	125.0 ± 12.0 ^d
Suco + G-hesperidina	0.0 ± 0.0 ^a	0.0 ± 0.0 ^a	112.0 ± 18.0 ^d

^a Letras iguais indicam não haver diferenças estatística entre os dados;

^{a,b,c,d} Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativa, $p < 0,05$.

Objetivou-se com este teste verificar o possível papel dos pré-tratamentos e do tratamento com G-hesperidina, LPS e RPMI-C sobre a liberação da citocina IL-10 em cultura de macrófagos. Células pré-tratadas e cultivadas com RPMI-C não houve liberação de IL-10 em nenhum dos tratamentos prévios. Na presença de G-hesperidina *in vitro*, foi observada

moderada liberação de IL-10 no pré-tratamento com SL, entretanto essa liberação foi semelhante as células que receberam SS. Células pré-tratadas com GH e SL-GH não promoveram a liberação de IL-10.



^a Letras iguais indicam não haver diferenças estatística entre os dados;

^{a,b,c,d} Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativa, $p < 0,05$.

Gráfico 4. Liberação da citocina IL-10 por macrófagos murinos tratados com G-hesperidina, LPS e RPMI-C. Os macrófagos foram obtidos de grupos de animais tratados previamente com solução salina (SS), G-hesperidina (GH), suco de laranja (SL) ou suco de laranja + G-hesperidina (SL-GH) por meio de gavagem durante quatorze dias.

Com a administração de LPS foi observado que as células pré-tratadas com GH diminuíram a produção de IL-10, enquanto que o SL e SL-GH potencializaram semelhantemente a liberação de IL-10 pelos macrófagos quando comparada as células que receberam SS.

6.5. Liberação de IL-12

A liberação da citocina IL-12 foi avaliada em cultura de macrófagos murinos tratados com G-hesperidina, LPS e RPMI-C. Os macrófagos foram obtidos de grupos de animais tratados com solução salina como veículo (0,5mL), G-hesperidina (100mg/kg/0,5mL), suco de laranja (0,5mL) ou suco de laranja + G-hesperidina (100mg/Kg/0,5mL) por meio de gavagem durante quatorze dias. A produção de IL-12 foi quantificada no sobrenadante da cultura de macrófagos por meio do teste imunoenzimático ELISA e os resultados foram expressos em pg/mL (Tabela 5 e Gráfico 5).

Foi verificada neste ensaio, a liberação da citocina IL-12 de acordo com os tratamentos prévios, e do tratamento *in vitro* com G-hesperidina, LPS e RPMI-C.

Tabela 4. Liberação da citocina IL-12 por macrófagos murinos tratados com G-hesperidina, LPS e RPMI-C.

Grupos de Animais	Liberação de IL-12 em macrófagos (pg/mL)		
	RPMI-C	G-hesperidina	LPS
Solução Salina	404.3 ± 12.0 ^a	446.0 ± 10.4 ^a	813.0 ± 49.4 ^d
G-hesperidina	790.0 ± 9.3 ^d	408.2 ± 13.0 ^a	1149.0 ± 10.3 ^e
Suco de Laranja	610.3 ± 100.0 ^b	488.0 ± 13.0 ^a	925.0 ± 61.2 ^d
Suco + G-hesperidina	918.0 ± 51.2 ^d	757.0 ± 31.0 ^c	961.0 ± 22.4 ^d

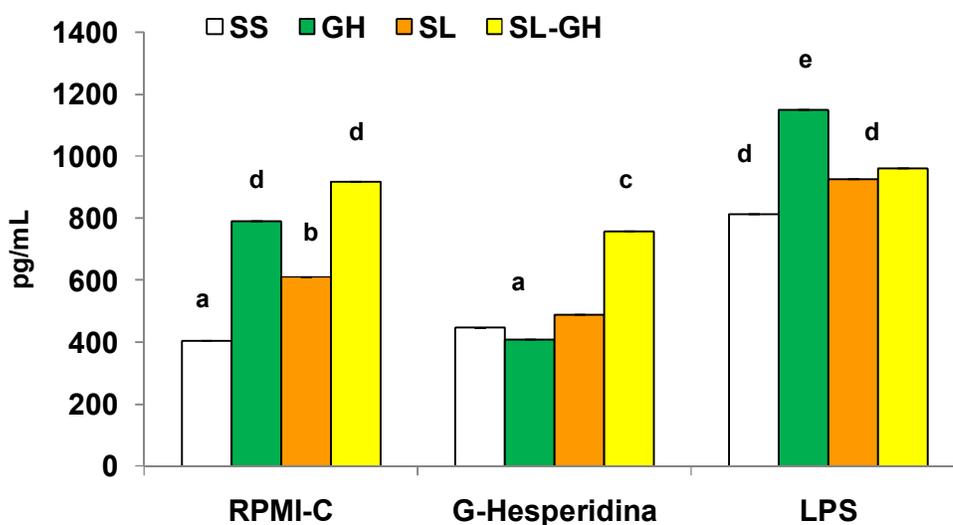
^a Letras iguais indicam não haver diferenças estatística entre os dados;

^{a,b,c,d,e} Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativa, $p < 0,05$.

Nas células cultivadas com RPMI-C e tratadas previamente com GH e SL-GH houve maior liberação de IL-12 em relação, àquelas tratadas com SL, que por sua vez liberou significativamente mais IL-12 quando comparada as células que receberam SS.

Células que receberam G-hesperidina *in vitro*, foram observadas diferenças significativas na liberação de IL-12, somente naquelas pré-tratadas com SL-GH.

Nas células desafiadas com LPS, foi verificado que àquelas pré-tratadas com GH, liberaram mais IL-12 do que os outros tratamentos, os quais não foram diferentes das células que receberam SS.



^a Letras iguais indicam não haver diferenças estatísticas entre os dados;

^{a,b,c,d} Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativa, $p < 0,05$.

Gráfico 5. Liberação da citocina IL-12 por macrófagos murinos tratados com G-hesperidina, LPS e RPMI-C. Os macrófagos foram obtidos de grupos de animais tratados previamente com solução salina (SS), G-hesperidina (GH), suco de laranja (SL) ou suco de laranja + G-hesperidina (SL-GH) por meio de gavage durante quatorze dias.

6.6. Liberação de TNF- α

A liberação do TNF- α foi avaliada em cultura de macrófagos murinos tratados com G-hesperidina, LPS e RPMI-C. Os macrófagos foram obtidos de grupos de animais tratados com solução salina como veículo (0,5mL), G-hesperidina (100mg/kg/0,5mL), suco de laranja (0,5mL) ou suco de laranja + G-hesperidina (100mg/Kg/0,5mL) por meio de gavage durante quatorze dias. A produção de TNF- α foi quantificada no sobrenadante da cultura de macrófagos por meio do teste imunoenzimático ELISA e os resultados foram expressos em pg/mL (Tabela 6 e Figura 6).

Tabela 5. Liberação da citocina TNF- α por macrófagos murinos tratados com G-hesperidina, LPS e RPMI-C.

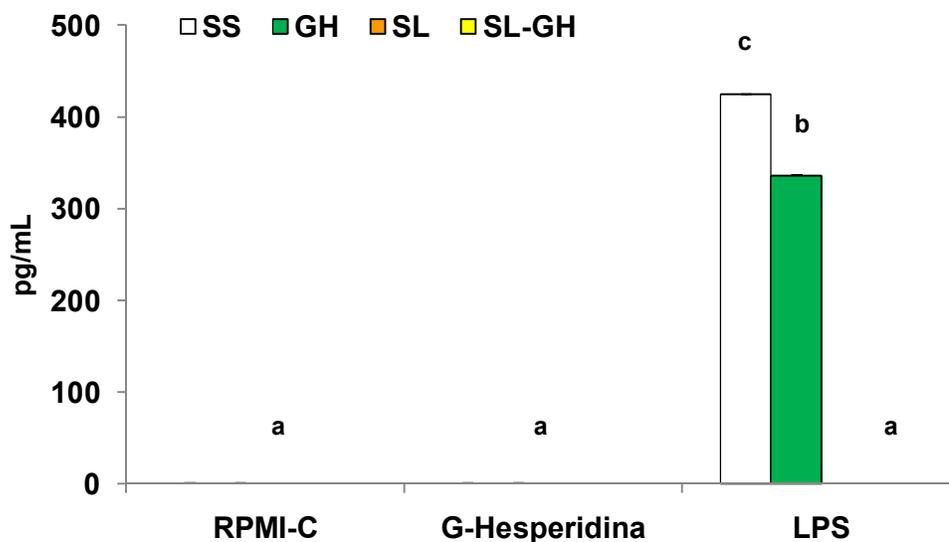
Grupos de Animais	Liberação de TNF- α em macrófagos (pg/mL)		
	RPMI-C	G-hesperidina	LPS
Solução Salina	0.0 \pm 0.0 ^a	0.0 \pm 0.0 ^a	425.0 \pm 88.0 ^c
G-hesperidina	0.0 \pm 0.0 ^a	0.0 \pm 0.0 ^a	336 \pm 71.4 ^b
Suco de Laranja	0.0 \pm 0.0 ^a	0.0 \pm 0.0 ^a	0.0 \pm 0.0 ^a
Suco + G-hesperidina	0.0 \pm 0.0 ^a	0.0 \pm 0.0 ^a	0.0 \pm 0.0 ^a

^a Letras iguais indicam não haver diferenças estatística entre os dados;

^{a,b,c} Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativa, $p < 0,05$.

Neste ensaio, foi analisada a liberação da citocina TNF- α após os tratamentos prévios e a adição da G-Hesperidina e do LPS. Não houve liberação de TNF- α em nenhum dos tratamentos prévios quando as células foram cultivadas em meio RPMI-C. Na presença de G-hesperidina *in vitro*, também não houve liberação de TNF- α em nenhum dos pré-tratamentos. Nas células desafiadas com LPS, foi observado liberação de TNF- α pelas células

que receberam SS e naquelas tratadas com GH, houve liberação de TNF- α em menor quantidade. Não houve liberação desta citocina nos pré-tratamentos com SL e SL-GH.



^a Letras iguais indicam não haver diferenças estatística entre os dados;

^{a,b,c} Letras diferentes representam diferenças estatisticamente significativa, $p < 0,05$.

Gráfico 6. Liberação da citocina TNF- α por macrófagos murinos tratados com G-hesperidina, LPS e RPMI-C. Os macrófagos foram obtidos de grupos de animais tratados previamente com solução salina (SS), G-hesperidina (GH), suco de laranja (SL) ou suco de laranja + G-hesperidina (SL-GH) por meio de gavage durante quatorze dias.

7. DISCUSSÃO

A hesperidina tem sido foco de muitas pesquisas envolvendo modulação da resposta imune por meio da ativação de diferentes tipos celulares e fatores de transcrição, liberação de citocinas e mediadores químicos (MANTHEY et al., 1999; YEH et al., 2007; CHOI et al., 2007). O papel da hesperidina também tem sido estudado em muitas doenças como o câncer, artrite reumatóide, infecção pulmonar, que apresentam características de doenças que acometem o sistema imune (BERKARDA et al., 1998; SILALAHY et al., 2002; LI et al., 2007; YEH et al., 2007). Neste estudo foi investigada a ação do suco de laranja (SL), da glicosil hesperidina (GH) e da mistura de ambos (SL-GH) sobre o sistema imune inato de camundongos. Posteriormente foi avaliado o efeito do tratamento da G-hesperidina e do LPS *in vitro* sobre os macrófagos que receberam os pré-tratamentos supracitados.

A produção de NO testada em macrófagos, mostrou que no controle negativo, células pré-tratadas com SL e SL-GH produziram significativamente mais NO do que aquelas tratadas somente com GH ou SS, que por sua vez não produziram NO. Na presença de LPS, o maior estímulo na produção de NO, foi promovido pelas células pré-tratadas com SL, entretanto, as células pré-tratadas com GH diminuíram a produção de NO, quando comparada as células que receberam SS. Este resultado indicou que o suco de laranja atuou no sistema imune inato, ao estimular a produção de NO pelos macrófagos, que se tornaram ativos produzindo ROS e RNS. A produção moderada ($\sim 60 \mu\text{mol}$ de NO_2^-) destes radicais livres apresenta caráter benéfico principalmente no combate a agentes infecciosos (GARCIA e STEIN, 2006). Contudo, quando liberados em altas concentrações podem promover danos celulares, tais como

peroxidação lipídica, agressão às proteínas dos tecidos e das membranas, às enzimas e principalmente ao DNA, além de serem apontados como os principais responsáveis pela causa de algumas doenças (HALLIWELL, 1996).

As atividades favoráveis exercidas pelo suco de laranja no sistema imune podem ser devido à combinação de seus nutrientes ou ao sinergismo que ocorre entre a vitamina C e os flavonóides cítricos, porém os mecanismos envolvidos nessa interação ainda permanecem pouco esclarecidos (VINSON e JANG, 2001; SÁNCHEZ-MORENO et al., 2003). Ghanim et al. (2007), investigaram a expressão do NF- κ B e a produção de ROS e da proteína C reativa (PRC). Além disso também foi investigado possível efeito que os flavonóides hesperitina, naringenina e a vitamina C poderiam apresentar sobre a produção de ROS em cultura de monócitos humanos, tratados *in vivo* com: suco de laranja, solução de glicose, solução de frutose e água adoçada com sacarina (como controle).

Os resultados do estudo de Ghanim et al. (2007) mostraram que tanto o suco de laranja quanto a frutose, carboidrato presente em grandes quantidades no suco de laranja, não causaram *stress* oxidativo e inflamação, ao contrário da glicose, que atua como indutor de espécies reativas de oxigênio e do fator de transcrição NF- κ B. Os dois flavonóides hesperitina e naringenina apresentaram efeitos supressores na produção de ROS *in vitro*, entretanto o mesmo resultado não foi observado com relação ao ácido ascórbico. Além disso, o suco de laranja diminuiu a concentração da PRC, um importante marcador de inflamação de fase aguda (YOUNG et al., 1991). Os autores concluíram que há várias maneiras de promover inflamação e *stress* oxidativo pós-prandial e que escolhas alimentares adequadas, tais como, alto consumo de frutas e baixo

consumo de açúcares simples e gorduras saturadas (WHO, 2003) podem prevenir os danos causados pela produção excessiva de radicais livres.

A atividade inibitória na produção de NO, foi analisada neste estudo em macrófagos pré-tratados com SS, SL, GH e SL-GH e posteriormente com os tratamentos, G-hesperidina + LPS, LPS e RPMI-C. Não houve produção de NO nas células pré-tratadas com GH e SS, enquanto que nas células pré-tratadas com SL e SL-GH houve baixa produção de NO quando estas foram cultivadas somente com RPMI-C. Na presença de G-Hesperidina + LPS *in vitro* foi observado inibição total da produção de NO nas células previamente tratadas com GH, indicando que a G-hesperidina, foi capaz de inibir a excessiva produção de NO promovida pelo LPS. As células tratadas com SL, SL-GH e SS não inibiram a produção de NO, porém o tratamento que menos inibiu foi aquele com SL-GH. Nas células estimuladas com LPS, foi observada inibição da produção de NO pelo pré-tratamento com GH, confirmando que a G-hesperidina atua baixando ou inibindo a produção de NO. O pré-tratamento com SL inibiu moderadamente a produção de NO e foi semelhante às células que receberam SS, já as células que receberam tratamento prévio com SL-GH não inibiram a produção de NO.

Este resultado sugere que a G-hesperidina pode atuar como um composto anti-inflamatório, pois inibiu completamente a produção de NO, mesmo na presença de LPS. A produção excessiva de óxido nítrico tem sido implicada em uma variedade de condições patofisiológicas incluindo inflamação, carcinogênese, aterosclerose e diabetes (BUTTERY et al., 1996; GALLO et al., 1998; HOBBS et al., 1999; YAGIHASHI et al., 2000). Os resultados observados no presente estudo, corroboram com o estudo de Sakata et al.

(2003), que investigaram os efeitos modulatórios da hesperidina na expressão das enzimas inflamatórias ciclooxigenase (COX-2) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e também na produção de NO e prostaglandina E₂ (PGE₂) induzida por LPS em macrófagos. O qual mostrou que o tratamento com hesperidina suprimiu a produção de NO e PGE₂ e os níveis de expressão das enzimas iNOS e COX-2, sugerindo que a inibição destas enzimas pode promover ação anti-inflamatória em condições sistêmicas e localizadas (SALVEMINI et al., 1993). Resultados semelhantes também foram encontrados por Choi et al. (2007), quanto a atividade inibitória da produção de NO por uma variedade de flavonóides cítricos, incluindo a hesperidina, entretanto, a maior atividade inibitória da produção de NO, foi promovida pela nobelitina seguida pela tangeritina.

Em relação à liberação de citocinas, os resultados observados mostraram que nas células controle negativo não houve liberação de IL-10 em nenhum dos tratamentos prévios. As células cultivadas na presença de G-hesperidina *in vitro* que liberaram IL-10 de forma moderada, foram aquelas pré-tratadas com SL, entretanto essa liberação foi semelhante ao V. Células pré-tratadas com GH e SL-GH não promoveram a liberação de IL-10. Na presença de LPS, as células pré-tratadas com GH diminuíram a produção de IL-10, enquanto que o SL e SL-GH potencializaram semelhantemente, a liberação de IL-10 pelos macrófagos quando comparado ao V.

Este resultado indica que o tratamento prévio com SL promoveu a liberação da citocina IL-10 no tratamento com G-hesperidina *in vitro* e na presença de LPS, potencializou ainda mais a liberação. Foi observado também

que o pré-tratamento com G-hesperidina diminuiu a produção desta citocina em ambos os tratamentos *in vitro*.

A IL-10 é uma potente citocina anti-inflamatória que contribui de forma benéfica na imunoterapia de algumas doenças, além disso exerce inibição nos processos inflamatórios mediados pelo perfil de células Th1, uma vez que este evento é realizado pela regulação da síntese de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-12) (LYNCH et al., 2003; GOODMAN et al., 2003). Resultados interessantes também foram observados na liberação de TNF- α , pois não houve produção desta citocina nas células do controle negativo e também naquelas tratadas com G-hesperidina *in vitro*, em nenhum dos pré-tratamentos. Entretanto, os pré-tratamentos com SL e SL-GH na presença de LPS, diminuíram completamente a liberação de TNF- α , sugerindo que o suco de laranja pode ser considerado um alimento com características anti-inflamatórias, uma vez que o TNF- α , está associado a processos inflamatórios (MANTHEY et al., 1999). Ao contrário, houve expressiva liberação de TNF- α pelas células pré-tratadas com GH, mas em menor quantidade, quando comparada ao V. Manthey et al. (1999), investigaram a habilidade de diferentes flavonóides cítricos em afetar a resposta inflamatória ao inibir a expressão de TNF- α em monócitos humanos induzidos por LPS. Os resultados mostraram que a hepmetoxiflavona, um tipo de flavona polimetoxilada, inibiu a produção de TNF, enquanto que os outros flavonóides cítricos testados, incluindo a hesperidina, não foram capazes de promover este efeito, semelhante aos resultados obtidos no presente estudo, no qual somente o pré-tratamento com SL e SL-GH promoveu a diminuição desta citocina.

A IL-12 é uma citocina relacionada com estímulo da resposta imune inata a microorganismos intracelulares e atua como um indutor da imunidade mediada por células, ou seja, a resposta adaptativa contra esses microorganismos (BIRON e GAZZINELLI, 1995). No presente estudo, estudo foi observado que no controle negativo os pré-tratamentos com GH e SL-GH liberaram mais IL-12 em relação, àquelas tratadas com SL, que por sua vez liberou significativamente mais IL-12 comparada ao V. Nas células que receberam G-hesperidina *in vitro*, foram observadas diferenças estatisticamente significativas na liberação de IL-12, somente naquelas tratadas com SL-GH. Nas células desafiadas com LPS, foi verificado que o pré-tratamento com GH liberou mais IL-12, do que os outros tratamentos, que não foram estatisticamente diferentes do V. Estes resultados sugerem que o pré-tratamento com GH, pode estar envolvido com a ativação do sistema imune, devido à liberação da citocina IL-12, que quando liberada em quantidades moderadas pode desempenhar papel benéfico ao direcionar a resposta imunológica para um perfil Th1 pró-inflamatório, a fim de combater patógenos intracelulares (MOSMANN et al., 1986; MOSMANN e COFFMAN, 1989).

Estudo conduzido por Yeh et al. (2007), mostrou que a hesperidina atuou na modulação da resposta imune em um modelo de inflamação aguda de pulmão, por meio da diminuição da expressão de TNF- α , IL-1 β , IL-6, e IL-12 induzida por LPS e pelo aumento da produção das citocinas anti-inflamatórias IL-4 e IL-10. Além disso, houve diminuição da expressão da enzima iNOS e da produção de óxido nítrico. Apesar da semelhança de alguns resultados observados no presente estudo com o estudo de Yeh et al. (2007),

especialmente em relação a IL-12, o qual foi observado um aumento na sua liberação no grupo que recebeu G-hesperidina, este resultado divergente provavelmente se deve as diferentes metodologias encontradas em ambos os estudos.

O ensaio de viabilidade celular foi realizado a fim de investigar a possibilidade da G-hesperidina em atuar como um composto citotóxico capaz de promover morte celular. De acordo com os resultados, foi verificado que a G-hesperidina não apresenta caráter citotóxico, uma vez que houve viabilidade celular de 80%.

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho podemos concluir que o consumo da hesperidina em sua forma natural, não isolada, incorporada ao suco de laranja, é provavelmente a maneira mais segura e adequada para se obter os efeitos funcionais desejáveis ao organismo.

8. CONCLUSÕES

- O pré-tratamento com suco de laranja estimulou o sistema imune por meio da produção de NO e pela liberação da citocina anti-inflamatória IL-10 e diminuiu a produção da citocina pró-inflamatória TNF- α na presença de LPS.
- O pré-tratamento com G-hesperidina aumentou a produção da citocina IL-12, diminuiu a produção da citocina IL-10 e inibiu a produção de NO.
- Não foram obtidos resultados conclusivos em relação ao suco de laranja + G-hesperidina, necessitando de maiores investigações e diferentes metodologias.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHANRA, R.K. Nutrition and the immune system: an introduction. *Am. J. Clin. Nutr.*, v. 66, n. 2, p. 460S-463S, 1997.

BEISEL, W.R. Nutrition and immune function: Overview. *J. Nut.*, v.126, Suppl 10, p. 2611S-2615S, 1996.

CHANRA, R.K. Nutrition and the immune system from birth to old age. *Eur. J. Clin. Nutr.*, v.56, Suppl 3, p.S73-S76, 2002.

KRIS-ETHERTON, P.M.; HECKER, K.D.; BONANOME, A.; COVAL, S.M.; BINKOSKI, A.E.; HILPERT, K.F.; GRIEL, A.E.; ETHERTON, T.D. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *Am. J. Med.*, v.30, n.113, Suppl 9B, p.71S-88S, 2002.

SILALAH, J. Anticancer and health protective properties of citrus fruit components. *Asia Pacific J. Clin. Nutr.*, v.11, n.1, p. 79-84, 2002.

GARG, A.; GARG, S.; ZANEVELD, L. J. D. et al. Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytother. Res.*, v. 15, n. 8, p. 655-669, 2001.

BENAVENTE-GÁRCIA, O.; CASTILLO, J. Update on uses and properties of citrus flavonoids: new findings in anticancer, cardiovascular, and anti-inflammatory activity. **J. Agric. Food. Chem.**, v.56, n. 15, p.6185-6205, 2008.

HIJIYA, H., MIYAKE, T. European Patent 0402049 (1991).

YAMADA, M.; TANABE, F.; ARAI, N. et al. Bioavailability of glucosyl hesperidin in rats. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 70, n. 6, p. 1386-1394, 2006.

JANEWAY, C. A. Jr.; MEDZHITOV R. Innate immune recognition. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 20, n.1, p. 197-216, 2002.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. Exploring the full spectrum of macrophage activation.

Nat. Rev. Immunol., v.8, p. 958-969, 2008.

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A.; H.; ANDREW, H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 6ª Ed. São Paulo: Elsevier, 2008.

PEREZ-CACHO, P.; ROUSEFF, R. Processing and storage effects on orange juice aroma: a review. **J. Agric. Food Chem.**, v.56, n. 21, p.9785-9796, 2008.

USDA. Department of health and human services and U.S Department of agriculture. Database for the flavonoid content of selected foods, release 2, 2007. Disponível em <http://www.ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=6231>. Acesso em 05/08/2009.

SAUBERLICHE, H.E. Pharmacology of vitamin C. **Annu. Rev. Nutr.**, v.14, p. 371-91, 1994.

MORAND, C. Antioxidants modify cardiovascular disease gene expression. **Basic Cardiovascular Sciences Conference, American Heart Association**. Abstract P149, 2009.

MANTHEY, J.A.; GUTHRIE, N.; GROHMANN, K. Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. **Curr. Med. Chem.**, v. 8, n. 2, p. 135-153, 2001.

KNEKT, P.; KUMPULAINEN, J.; JÄRVINEN, R. et al. Flavonoid intake and risk of chronic disease. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 76, n. 3, p. 560-568, 2002.

ERLUND, I.; MERIRINNE, E.; ALFTHAN, G.; ARO, A. Plasma kinetics and urinary excretion of the flavanones naringenin and hesperetin in humans after ingestion of orange juice and grapefruit juice. **J. Nutr.**, v.131, n. 2, p. 235-241, 2001.

BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILLO, J.; MARIN, F.R. et al. Uses and properties of citrus flavonoids. **Agric. Food Chem.**, v. 45, n. 12, p. 4504-4515, 1997.

BERKARDA, B.; KOYUNKU, H.; SOYBIR, G.; BAYKUT, F. Inhibitory effect of hesperidin on tumour initiation and promotion in mouse skin. **Res. Exp. Med.**, v.198, n. 2, p.93-99,

1998.

MATSUMOTO, H.; IKOMA, Y.; SUGIURA, M.; MASAMICHI Y.; HASEGAXA, Y. Identification and quantification of the conjugated metabolites derived from orally administered hesperidin in rat plasma. **Agric. Food Chem.**, v. 52, n. 21 , p. 6653-6659, 2004.

ERLUND, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenina. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. **Nutr. Res.**, v. 24, n. 10 , p. 851-874, 2004.

MANACH, C.; MORAND, C.; GIL-IZQUIERDO, A. et al. Bioavailability in humans of the flavanones hesperidin and narirutin after the ingestion of two doses of orange juice. **Eur. J. Clin. Nutr.**, v.57, n. 2, p. 235-242, 2003.

MANACH, C.; MORAND, C.; CRESPIY, V. et al. Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. **FEBS Lett**, v. 426, n. 3, p. 331-336, 1998.

SPENCER, J.P.E.; CHOWRIMOOTO, G.; CHOUDHURY, R. et al. The small intestine can both absorb and glucuronidate luminal flavonoids. **FEBS Lett.**, v. 458, n. 2, p. 224-230, 1999.

SCALBERT A.; WILLIAMSON, G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. **J. Nutr.** v.130, Suppl 8S, p. 2073S-2085S, 2000.

HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILVA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **J. Nutr. Biochem.**, v.13, n.10, p. 572-584, 2002.

NIELSEN, I. L. F.; CHEE, W. S. S.; POULSEN, L. et al. Bioavailability is improved by enzymatic modification of citrus flavonoid hesperidin in humans: a randomized, double-blind, crossover trial. **J. Nutr.**, v. 136, p. 404-408, 2005.

HANADA, T.; YOSHIMURA, A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 13, n. 4-5, p. 413-421, 2002.

JANEWAY 2007

KONO, H.; ROCK, K. L. How dying cells alert the immune system to danger. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 8, p. 279–289, 2008.

ZHANG, X.; MOSSER, D. M. Macrophage activation by endogenous danger signals. **J. Pathol.**, v. 214, n. 2, p.161-178, 2008.

ADEREM, A.; ULEVITCH, R.J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 782-787, 2000.

HEUMANN, D.; ROGER, T. Initial responses to endotoxins and gram-negative bacteria. *Clinica Chimica Acta.*, v. 323, n. 1-2, p.59-72, 2002.

Toll-Like Receptors Responding to Lipopolysaccharide (LPS) from the Gram-Negative Cell Wall. Disponível em <http://student.ccbcmd.edu/home/>. Acesso em 05/08/2009.

HERNÁNDEZ-ÚRZUA, M. A.; ALVARADO-NAVARRO, A. Interleucinas e imunidade inata. **Rev. Biomed.**, v.12, p. 272-280, 2001.

DINARELLO, C.A. Proinflammatory cytokines. **Chest.**, v.118, n. 2, p.503-508, 2000.

YASUKAWA, H.; SASAKI, A.; YOSHIMURA A. Negative regulation of cytokine signaling pathways. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 18, p. 143-164, 2000.

ASADULLAH, K.; STERRY, W.; VOLK, H.D. Interleukin-10 therapy- review of a new approach. **Pharmacol. Rev.**, v. 55, n. 2, p. 241-269, 2003.

MOSMANN, T.R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M.W.; GIEDLIN, M.A.; COFFMAN, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol.**, v. 136, n. 7, p. 2348-2357, 1986.

MOSMANN, T.R.; COFFMAN, R.L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 7, p. 145-

173,1989.

PESTKA, S.; KRAUSE, C.D.; SARKAR, D.; et al. Interleukin-10 and related cytokines and receptors. **Annu. Rev. Immunol.**, v.22, p. 929-979, 2004. Trends in immunology. v. 24, n.1, p. 36-43, 2003.

MOCELLIN, S.; PANELLI, M.C.; WANG, E.; et al. The dual role of IL-10. **Trends Immunol.** v.24, n. 1, p.36-43, 2003.

MOORE, K.W.; de WALL MALAFYT, R.; COFFMAN, R.L.; et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annu. Rev. Immunol.**, v.19, p. 683-765, 2001.

TRINCHIERI, G. Interleukin 12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions that bridge innate resistance and antigen-specific adaptative immunity. **Annu. Rev. Immunol.** v.13, p. 251-276, 1995.

TRINCHIERI, G. Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN-gamma). **Curr. Opin. Immunol.**, v.9, n. 1, p. 17-23, 1997.

TRACEY, K.J.; CERAMI, A. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. **Annu. Rev. Med.**, v. 45, p. 491-503, 1994.

BEUTLER, B. TNF, immunity and inflammatory disease: lessons of the past decade. **J. Investig. Med.**, v.43, n. 3, p. 227-253, 1995.

MAKHATADZE N.J. Tumor necrosis factor locus: genetic organization and biological implications. **Hum. Immunol.**, v. 59, n. 9, p. 571-579, 1998.

GRELL, M.; SCHEURICH, P. Tumor necrosis factor. growth factors and cytokines in health and disease. v. 2B, p. 669-726, 1997.

VOLDOUKIS, I.; MAZIER, D.; DEBRÉ, P.; MOSSALAYI, M.D. Nitric oxide and human infectious disease. **Res. Immunol.**, v.146, n. 9, p.689-692, 1995.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.J.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

MONCADA, S. Nitric oxide: discovery and impact on clinical medicine. **J. R. Soc. Med.**, v. 92, n. 4, p.164-169, 1999.

MONCADA, S.; HIGGS, A. Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide. **FASEB J.**, v. 9, n. 13, p. 1319-1330, 1995.

GROSS, S.S.; WOLIN, M.S. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. **Annu. Rev. Physiol.**, v.57, p.737-769, 1995.

BRÜNE, B.; VON KNETHEN, A.; SANDAU, K.B. Nitric oxide and its role in apoptosis. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 351, n. 3, p. 261-272, 1998.

BOLANOS, J.P.; ALMEIDA, A.; STEWART, V. et al. Nitric oxide-mediated mitochondrial damage in the brain: Mechanisms and implications for neurodegenerative diseases. **J. Neurochem.**, v. 68, n. 6, p. 2227-2240, 1997.

ACHIKE, F. I.; KWAN, C. Y. Nitric oxide, human diseases and the herbal products that affect the nitric oxide signaling pathway. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v.30, n. 9, p. 605-15, 2003.

ALBINA, J.E.; CUI, S.; MATEO, R.B.; REICHNER, J.S. Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. **J. Immunol.**, v.150, n. 11, p.5080-5085, 1993.

OKUDA, Y., SAKODA, S., SHIMAOKA, M., et al. T. Nitric oxide induces apoptosis in mouse splenic T lymphocytes. **Immunol Lett.** v.52, n. 2-3, p.135-138, 1996.

TAYLOR-ROBINSON, A. W.; LIEW, F. Y.; SEVERN, A. et al. Regulation of the immune response by nitric oxide differentially produced by T helper type 1 and T helper type 2 cells. **Eur. J. Immunol.**, v. 24, n. 4, 980-984, 1994.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOK, J.S. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.**, v.126, n. 1, p.131-138, 1982.

MANTHEY, J.A.; GROHMANN, K.; MONTANARI, A. et al. Polymethoxylated flavones

derived from citrus suppress tumor necrosis factor-alpha expression by human monocytes. **J. Nat. Prod.**, v. 62, n. 3, p.441-444, 1999.

YEH, C. C.; KAO, S. J. LIN, C. C. et al. The immunomodulation of endotoxin-induced acute lung injury by hesperidin in vivo and in vitro. **Life Sci.**, v. 80, n. 20, p.1821-1831, 2007.

CHOI, S.Y.; KO, H.C.; KO, S.Y. et al. Correlation between flavonoid content and the NO production inhibitory activity of peel extracts from various citrus fruits.**Biol. Pharm. Bull.**, v. 30, n. 4, p. 772-778, 2007.

LI, R.; LI, J. CAI, L. et al. Suppression of adjuvant arthritis by hesperidin in rats and its mechanisms.**J. Pharm. Pharmacol.**, v. 60, n. 2, p. 221-228, 2008.

GARCIA, X.; STEIN, F. Nitric oxide. **Semin. Pediatr. Infect. Dis.**, v.17, n. 2, p. 55-57. 2006.

HALLIWELL, B. Oxidative stress, nutrition and health. Experimental strategies for optimization of nutritional antioxidant intake in humans. **Free Radic. Res.**, v. 25, n. 1, p. 57-74, 1996.

VINSON, J.; JANG, J. *In vitro* and *in vivo* lipoprotein antioxidant effect of a citrus extract and ascorbic acid on normal and hypercholesterolemic human subjects. **J. Med. Food.**, v.4, n. 4, p. 187-192. 2001.

SÁNCHEZ-MORENO C.; CANO, M. P.; ANCOS, B. et al. Effect of orange juice intake on vitamin C concentrations and biomarkers of antioxidant status in humans. **Am. J. Clin. Nutr.**, 78, n. 3, p. 454-460, 2003.

GHANIM, H.; MOHANTY P.; PATHAK, R. et al. Orange juice or fructose intake does not induce oxidative and inflammatory response. **Diabetes Care.**, v. 30, n. 6, p. 1406-1411, 2007.

YOUNG, B.; GLEESON, M.; CRIPPS, A. W. C-reactive protein: a critical review.

Pathology., v.23, n. 2, p.118-24, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). DIET, NUTRITION AND THE PREVENTION OF CHRONIC DISEASES. GENEVA, 2003. 148P.

BUTTERY, L.D.; , SPRINGALL, D.R.; CHESTER A. H. et al. Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxynitrite. **Lab. Invest.**, v. 75, n. 1, p.77-85, 1996.

GALLO, O.; MASINI, E.; MORBIDELLI, L. et al. Role of nitric oxide in angiogenesis and tumor progression in head and neck cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**; v. 90, n. 8, p. 587-596, 1998.

HOBBS, A. J.; HIGGS, A.; MONCADA, S. Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.**, v. 39, p. 191–220, 1999.

YAGIHASHI, N.; KASAJIMA, H.; SUGAI, S. et al. Increased *in situ* expression of nitric oxide synthase in human colorectal cancer. **Virchows Arch.**, v. 436, n. 2, p.109-114, 2000.

SAKATA

SALVEMINI, D.; MISKO, T. P.; MASFERRER, J. L. et al. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 90, n. 15, p.7240-7244, 1993.

CHOI

LYNCH, E.L., LITTLE, F.F., WILSON, K.C. et al. Immunomodulatory cytokines in asthmatic inflammation. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v.14, n. 6, p. 489-502, 2003.

GOODMAN, R.B., PUGIN,J., LEE,J.S., MATTHAY, M.A. Cytokine-mediated inflammation in acute lung injury. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v.14 p. n. 6, 523-535, 2003.

BIRON, C. A.; GAZZINELLI, R. Effects of IL-12 on immune responses to microbial

infections: a key mediator in regulating disease outcome. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 7, n. 4, p. 485-496, 1995.

MA, X. TNF- α and IL-12: a balancing act in macrophage functioning. **Microbes and Infection**, v.3, n. 2, p.121-129, 2001.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)