

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Envelhecimento

Na maioria dos países desenvolvidos, a expectativa de vida média do *Homo sapiens* não excedia 40-45 anos até dois séculos atrás. Porém, a sobrevivência de um pequeno número de pessoas “*muito velhas*” em sociedades primitivas é documentado. Apenas no último século o envelhecimento passou a ser algo comum. (Stuart-Hamilton, 2002). Assim, o envelhecimento de grande parcela da população, é um fenômeno recente, em consequência de vários fatores como: redução da mortalidade infantil, melhoria dos cuidados médicos e condições ambientais. (LARBI *et al.*, 2008).

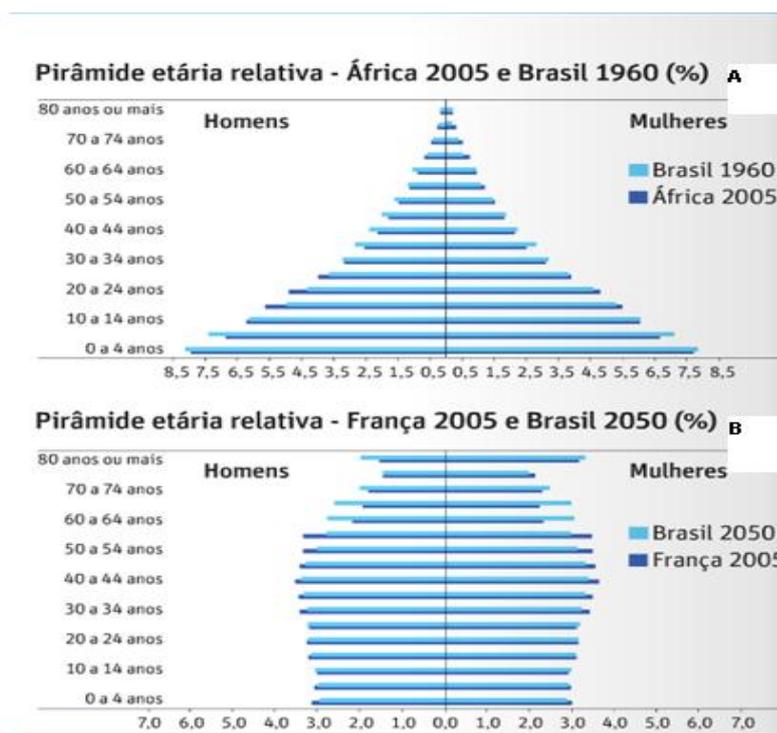
A senescência é o processo natural do envelhecimento, o qual compromete progressivamente aspectos físicos e cognitivos. Segundo a OMS, a terceira idade tem início entre os 60 e 65 anos. No entanto, esta é uma idade instituída para efeitos de pesquisa, já que o processo de envelhecimento depende de três classes de fatores principais: biológicos, psíquicos e sociais. São esses fatores que podem preconizar a velhice, acelerando ou retardando o aparecimento e a instalação de doenças e de sintomas característicos da idade madura (PEREIRA *et al.*, 2004).

O envelhecimento populacional configura-se como um dos maiores desafios enfrentados pela saúde pública contemporânea e ocorreu inicialmente em países desenvolvidos. Entretanto, recentemente, nos países em desenvolvimento, o envelhecimento da população tem ocorrido de forma mais acentuada (LIMA-COSTA & VERAS, 2003). Segundo Vendelbo & Nair (2011), nos últimos cem anos, a expectativa de vida aumentou substancialmente em todo o mundo, e Lourenço (2010) mostrou um crescimento exponencial da população idosa também no Brasil. Sabe-se que a população mundial cresce anualmente a uma taxa de 1,7% e a população acima de 65 anos aumenta em 2,5% ao ano (FREITAS, 1999).

O Brasil caminha em direção ao envelhecimento populacional. De acordo com dados do Censo 2010, realizado pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), há mais pessoas com idade acima de 65 anos do que abaixo de 4 anos. Além disso, em relação ao ano 2000, a representatividade dos grupos etários diminuiu para todas as faixas com até 25 anos e aumentou nos outros grupos.

A população com 65 anos ou mais passou de 5,9%, em 2000, para 7,4% em 2010. Já o grupo de crianças de zero a quatro anos dos sexos masculino e feminino representavam 4,9% e 4,7% da população total no ano 2000, respectivamente. Em 2010, esses percentuais caíram para 3,7% e 3,6%, respectivamente. O aumento da participação da população idosa na pirâmide etária é um dos destaques responsáveis pelo crescimento absoluto da população do Brasil nos últimos dez anos, que se deu principalmente em virtude do crescimento da população adulta.

Os dados do Censo 2010, divulgados pelo IBGE, indicam que em no máximo 40 anos, a pirâmide etária brasileira será semelhante à da França atual. O país terá taxa de natalidade mais baixa e, com isso, média de idade maior. Há 50 anos, o país tinha o mesmo perfil etário do continente africano hoje: muitos jovens e crianças. Desde então, a população do país cresce em ritmo cada vez mais lento (Figura 1).



**Figura 1:** Representação gráfica da evolução das faixas etárias na população brasileira. Em (A) 1960 e (B) uma projeção para 2050. Fonte: IBGE 2010.

O envelhecimento é comumente definido como um acúmulo de diversas mudanças deletérias nas células e tecidos que ocorre ao longo dos anos, responsável por um aumento do risco de doenças e morte (TOSATO *et al.*, 2007). A incidência de mortalidade e de várias

doenças degenerativas como infarto, fraturas no quadril e mal de Alzheimer aumentam exponencialmente com a idade (CUMMINGS, 2007).

Com o avanço da idade, a massa de vários sistemas como o muscular, ósseo e cerebral, diminui. Funções fisiológicas como gasto energético total, quantidade espontânea de movimentos, reflexos, tônus e resistência muscular, batimento cardíaco máximo, função cognitiva, e taxa de filtração glomerular diminuem continuamente com o passar dos anos (TERMAN, 2006). Evidências se acumulam indicando que o envelhecimento e doenças crônicas / degenerativas são causados primariamente devido ao dano gerado pelos radicais livres. (SPIRDUSO, 2005).

“Imunossenescência” é o termo cunhado para a idade associada à diminuição da competência imunológica, que torna os indivíduos mais susceptíveis à doenças e aumenta a morbidade e mortalidade por infecções em idosos, quando comparados aos jovens. O principal resultado observado com a velhice, é a diminuição da imunidade adaptativa e aumento em baixo grau, do estado inflamatório crônico, que têm sido referido como: “Inflamm-aging”. Dentro dessa perspectiva, a carga antigênica crônica e “Inflamm-aging” são fortes candidatos como principais forças motrizes da taxa de envelhecimento e da patogênese das principais doenças relacionadas à idade (LARBI *et al.*, 2008).

Medvedev (1990) afirma que existem mais de 300 teorias sobre o envelhecimento e muitas delas coexistem porque não se contradizem ou porque tentam explicar formas diferentes e independentes de senescência.

Considerando a afirmação de Medvedev, em genética molecular podemos citar alterações na expressão de proteínas, mutação somática e encurtamento de telômeros; em bioquímica, a teoria dos radicais livres e as taxas metabólicas; e na evolução, teorias que não enfatizam o envelhecimento como um fenômeno biológico, mas como um processo de evolução (OLIVEIRA *et al.*, 2010).

Há várias maneiras de classificar e organizar as diferentes teorias do envelhecimento. Hart & Turturro (1983) sugeriram a adoção de uma escala crescente de abrangência: teorias de base celular, teorias baseadas em órgãos e sistemas, teorias populacionais e, finalmente,

teorias integrativas. Hayflick (1985) optou por uma escala mais restrita: teorias fundamentadas em órgãos, de base fisiológica e genômica.

Evidências indicam que o envelhecimento e as doenças crônicas / degenerativas são causados primariamente devido ao dano gerado pelos radicais livres (HARMAN, 1981), todavia, todas as reações químicas que se manifestam no envelhecimento estão sujeitas às influências ambientais (HARMAN, 2003; VENDELBO & NAIR, 2011).

O envelhecimento fisiológico compreende uma série de alterações nas funções orgânicas e mentais devido exclusivamente aos efeitos da idade avançada sobre o organismo, fazendo com que o mesmo perca a capacidade de manter o equilíbrio homeostático e que todas as funções fisiológicas gradualmente comecem a declinar. Tais alterações têm por característica principal a diminuição progressiva da reserva funcional. Isto significa dizer que um organismo envelhecido, em condições normais, poderá sobreviver adequadamente, porém, quando submetido às situações de estresse físico, emocional dentre outros, pode apresentar dificuldades em manter sua homeostase e, desta forma, manifestar sobrecarga funcional, a qual pode culminar em processos patológicos, uma vez que há o comprometimento dos sistemas endócrino, nervoso e imunológico (PEREIRA *et al.*, 2004).

## **1.2 Neuroimunomodulação**

O sistema imunológico possui várias propriedades de extrema importância à sobrevivência. Regulado por neurotransmissores, proteínas, citocinas e hormônios, está envolvido com diferentes sistemas do organismo, especialmente os sistemas nervosos autônomo (SNA) e central (SNC) e o sistema endócrino. Os diversos estímulos captados pelo cérebro durante diferentes situações podem agir de maneira benéfica ou prejudicial sobre o sistema imune, desencadeando uma série de reações com conseqüências importantes. Entre esses estímulos, o estresse merece destaque (BAUER, 2005).

O estudo das interações entre os sistemas imune (SI) e nervoso central (SNC) tem despertado o interesse de inúmeros grupos de pesquisa. Esse interesse e os dados dos trabalhos realizados acabaram por resultar na concepção de uma grande área de pesquisa

conhecida como Psiconeuroimunologia ou Neuroimunomodulação. Esta área estuda os mecanismos através dos quais esses sistemas trocam informações, influenciando-se mutuamente, com evidentes implicações fisiológicas e patológicas (ALVES & PALERMO, 2007).

Atualmente, é sabido que diversos estímulos provenientes do SNC são capazes de modular uma resposta imune. O sistema endócrino – e, em especial, o eixo hipotálamo-pituitária-adrenal (HPA) – é um dos responsáveis por vários dos elos entre estes dois sistemas. Participam ainda dessa resposta, endorfinas, tireotrofinas, prostaglandina, hormônio do crescimento e, principalmente, o sistema nervoso autônomo simpático (SNAS) (ALVES & PALERMO, 2007).

Adrian Dunn revisou e agrupou os possíveis mecanismos através dos quais o SI (Sistema Imune) sinalizaria o SNC (Sistema Nervoso Central), destacando: 1) uma ação direta dos mediadores do SI nos locais onde a barreira hematoencefálica é mais permeável, como nos órgãos circumventriculares, 2) uma ação de mediadores do SI em aferências periféricas do SNC, como nas terminações do nervo vago, e 3) uma ação de mediadores do SI em locais que funcionariam como interface entre o sistema imunológico e o SNC, sem a necessidade da transferência direta do mediador para dentro deste (por exemplo, citocinas ligando-se a seus receptores no endotélio da microvasculatura cerebral, gerando mensageiros lipídicos como os prostanóides, que podem transitar através de barreiras) (DUNN, 2002).

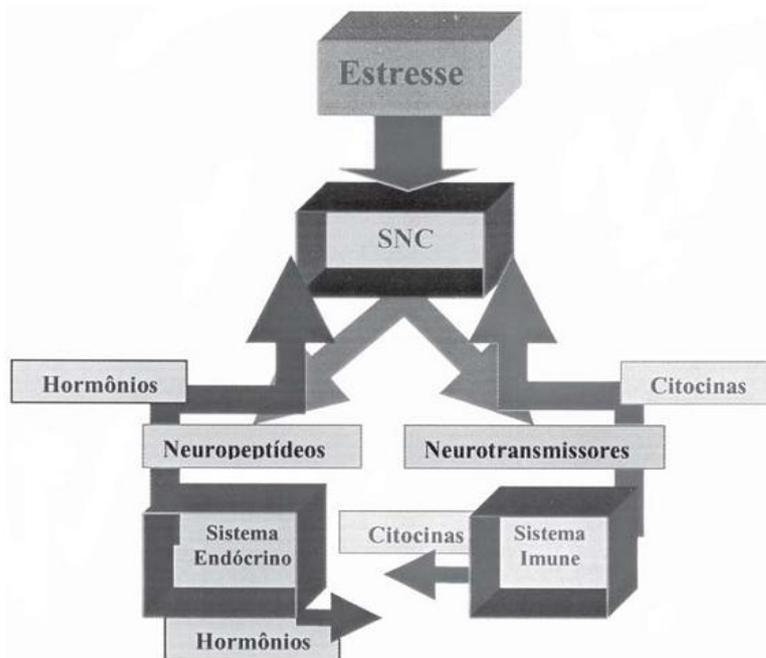
Muitas pesquisas têm sugerido que a exposição prolongada ao estresse durante a vida, mais especificamente aos hormônios do estresse, tem um papel significativo no processo de envelhecimento (Sapolsky & Meaney, 1986). Estas suposições têm dado origem a um grande número de estudos envolvendo sistemas neuroendócrinos. O mais importante sistema neuroendócrino responsivo ao estresse em humanos é o eixo Hipotálamo - Pituitária (hipófise)-Adrenal (HPA). Tal eixo é ativado quando a homeostasia do organismo é ameaçada, geralmente em situações referidas como estressoras. E essa ativação do eixo HPA é realizada pela serotonina, acetilcolina e citocinas inflamatórias (HALL *et.al*, 2012).

Embora os fatores psicológicos e físicos que iniciam o estresse diferem-se, as maneiras como impactam o sistema imunitário, são semelhantes e incluem ativação do eixo

hipotalâmico-pituitário-adrenal (eixo HPA) e o simpático adreno-medular (SAM), ambos os quais influenciam o sistema imune (LARBI *et al.*,2008).

Quando idosos saudáveis são avaliados, o processo de imunosenescência envolve involução tímica, baixa contagem de linfócitos, aumento da frequência de apoptose em leucócitos, diminuição na produção de citocinas responsáveis pela proliferação celular, além de outras mudanças (BAUER, 2005).

Durante o envelhecimento ocorre uma hiperativação do eixo HPA, com liberação intermitente de glicocorticóides (GRUVER *et al.*,2007). Estes podem se ligar aos leucócitos inibindo sua proliferação, como acontece, por exemplo, com os linfócitos TCD4+, que auxiliam a resposta imune adaptativa, mediada por anticorpos secretados pelos linfócitos B. Pode ocorrer também diminuição na proliferação de linfócitos TCD8+, responsáveis pela resposta imune inata frente a patógenos intracelulares (SAPOLSKY *et al.*, 2000). Ocorre também, um declínio na produção de citocinas que medeiam às respostas do sistema imune frente às alterações ocorridas no sistema endócrino (GORONZY *et al.*, 2007).



**Figura 2:** Esquema ilustrativo das interações entre os sistema nervoso, imune e endócrino.  
Fonte: ALVES, 2007.

### 1.3 Noradrenalina

A noradrenalina (NA) é um neuro-hormônio liberado pelos vertebrados durante o estresse agudo, podendo também influenciar na função imune. (BARROS et al., 2012), atua com o objetivo de redistribuir o fluxo sanguíneo corporal de tal forma a preservar órgãos nobres, às custas de uma redução na perfusão em leitos periféricos. Além disso, desempenha um papel relevante na regulação do eixo HPA (OLIVEIRA *et al.*, 2005; LEVI & TASKER, 2012).

As catecolaminas têm sido implicadas em muitos aspectos das respostas imunes inata ou adaptativa. Dentre as suas funções estão: capacidade para modular a eficiência na apresentação de antígenos pelas células dendríticas; expansão clonal de linfócitos; a migração ou tráfego celular; supressão da resposta imune celular e aprimoramento da resposta imune humoral. A Adrenalina e a Noradrenalina, os principais neurotransmissores simpáticos, modulam o sistema imune através da interação com os receptores adrenérgicos acoplados à proteína G ( $\alpha_1, \alpha_2, \beta_1, \beta_2, \beta_3$ ). Assim, a ocupação desses receptores estimula ou inibe adenilato ciclase, o que irá influenciar o papel das citocinas. (TRACY 2009; SZELÉNYI & VÍZI 2007 )

Há poucos estudos sobre a regulação do eixo simpático-adrenal-medular (SAM) em processos inflamatórios. O sistema nervoso simpático apresenta mudanças com a idade, há aumento da atividade tônica em repouso, principalmente indexados pela liberação de NA nas junções neuroefetoras. Esta saída de adrenalina e noradrenalina em resposta ao estresse parece diminuir com a idade. (HEFFNER, 2011.)

Neste contexto, o envelhecimento resulta da redução da competência adaptativa ao estresse, pois ocorre uma diminuição da resposta simpática causada por três modificações. A primeira leva à diminuição do número de receptores de catecolaminas, como a noradrenalina (NA). Na segunda, ocorre um declínio nas *heat shock proteins* (proteínas de choque térmico), que aumentam a resistência ao estresse em várias espécies, inclusive a humana. E, por último, ocorre uma diminuição da competência das catecolaminas para induzir a produção dessas proteínas (TEIXEIRA & GUARIENTO 2010).

## 1.4 Granulócitos

O sistema imune inato é mediado por diversos grupos de células incluindo macrófagos, monócitos, células natural killer (NK), células dendríticas e granulócitos que incluem: neutrófilos, basófilos e eosinófilos. (SCHRODER & RINK, 1999).

Os granulócitos são células fagocíticas, envolvidos na defesa não específica e em uma resposta aguda a agentes infecciosos (SANTIS, 1999). Os basófilos e eosinófilos são especializados na resposta imune contra parasitas, alergia e asma. Já os neutrófilos constituem-se como a primeira linha de defesa contra a maioria dos agentes patogênicos. Eles são rapidamente recrutados para o local da inflamação, através de quimiocinas como IL-8 (RYMKIEWICZ, *et.al.* , 2012). Sua arma bactericida inclui geração de oxigênio reativo intermediário (ROI) e nitrogênio reativo intermediário (RNI), radicais livres, liberação de enzimas degradativas e peptídeos microbiais, além de atuar na inflamação (THRUSH *et. al.*, 1978, PANDA *et. al.*,2009).

Todos os tipos de células imunes são afetadas durante o envelhecimento. O efeito deste sobre as células do sistema imune adaptativo é bem documentado. Em contraste, o conhecimento sobre as alterações observadas em neutrófilos polimorfonucleares (PMN), relacionadas à idade ainda é limitado (WESSELS *et.al.*, 2010).

Nos leucócitos sanguíneos 60 a 70% são granulócitos e desses, 90% desses são neutrófilos. Dessa forma não se pode subestimar a importância dessas células na imunosenescência (SCHRODER & RINK, 1999). Estas células podem estar comprometidas durante o envelhecimento, aumentando não somente a morbidade, mas a mortalidade, tanto por infecções bacterianas como doenças inflamatórias crônicas (PANDA *et. al.*, 2009).

O balanço pro e anti-oxidante pode ser determinado pelo processo fagocítico uma forma primária de defesa contra microorganismos que causam infecção. (MORONI *et al.*,2007).

CHAVES, M.M. e cols (1998 e 2000) demonstraram, em granulócitos, um aumento das espécies reativas de oxigênio (ERO) a partir dos 40 anos e de nitrogênio (ERN) a partir dos 50 anos. Concomitantemente com este aumento, estes autores observaram uma

diminuição significativa do poder antioxidante, sugerindo um desequilíbrio celular metabólico no envelhecimento. (HARMAN, 2003).

Desta forma, os granulócitos tornam-se boas ferramentas para o estudo e a compreensão dos mecanismos imunorregulatórios decorrentes do processo de envelhecimento fisiológico.

### **1.5 Mecanismos anti-oxidantes**

A produção contínua de radicais livres nos processos metabólicos celulares levou ao desenvolvimento de mecanismos antioxidantes para atenuar os danos oxidativos (SIES, 1993).

Os antioxidantes são definidos como substâncias presentes em pequenas quantidades comparadas com outros substratos oxidativos retardando significativamente ou inibindo a oxidação destes substratos. Eles defendem o organismo dos radicais livres e mantém a homeostase, mas este mesmo organismo desenvolve diversos sistemas antioxidantes reparando as enzimas e removendo as moléculas oxidadas. Entretanto, o cérebro não apresenta defesas antioxidantes totalmente eficientes, tornando-o vulnerável ao estresse oxidativo e deficiente em prevenir as doenças oxidativas com o envelhecimento do organismo. (FLOYD & HENSLEY, 2002).

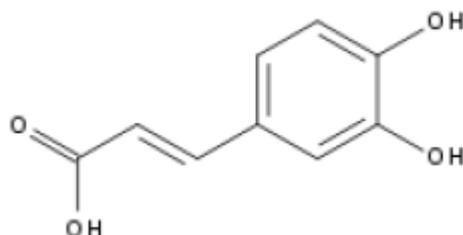
Os sistemas antioxidantes podem exercer papel neuroprotetor por protegerem o tecido nervoso de degeneração, ocasionados por isquemia ou como resultado de doenças neurodegenerativas crônicas (RAFII & AISEN, 2009). Defesas antioxidantes endógenas podem ser tanto não-enzimáticas (ácido úrico, glutathione, bilirrubina, tióis, albumina, vitaminas e fenóis) como enzimáticas (superóxido dismutases, glutathione peroxidases e catalase). (FUSCO *et al.*, 2007).

### 1.5.1 Ácido Caféico

A maior fonte de antioxidantes é proveniente da alimentação, principalmente da família dos fenóis (FUSCO *et al.*, 2007).

Dentre os componentes desta família está o ácido caféico [3-(3,4-di-hidroxifenil)-2-propanóico] que é um ácido fenólico encontrado em vários produtos agrícolas (SUL *et al.*, 2009). Apesar do nome que o remete ao café, e este grão ser sua principal fonte, o Ácido Caféico pode também ser encontrado em frutas e vegetais como maçã, ameixa, uvas e tomates, sendo possível isolá-lo das folhas de *Alsophila spinulosa*, uma pteridófito originária da China, com propriedades já descritas para o tratamento de doenças neurodegenerativas, inflamatórias, câncer, diabetes envelhecimento, dentre outras (MAISTRO *et al.*, 2011).

A figura 3 mostra a fórmula estrutural do ácido caféico.



**Figura 3:** Fórmula estrutural do Ácido Caféico

Independentemente da ingestão, as propriedades biológicas dos polifenóis somente serão aproveitadas se a biodisponibilidade dos mesmos for favorável. A estrutura química dos polifenóis e a composição da microflora intestinal determinam a taxa, a extensão da absorção e a natureza dos metabólitos circulantes no plasma (SCALBERT & WILLIAMSON, 2000).

Já foi observado um efeito inibitório desta substância em danos oxidativos de células de ratos (SAKURAI *et al.*, 2005) e humanas (HSIEH *et al.*, 2005) expostas à radiação UV. Também observou-se que o ácido caféico faz a retirada de radicais hidroxila e superóxido, além de agir como doador de hidrogênio (MORI & IWAHASHI, 2009).

Entretanto, segundo Skibola (2000), os potenciais efeitos tóxicos decorrentes da excessiva ingestão de flavonóides são comumente ignorados. Em doses altas, podem agir como mutagênicos, geradores de radicais livres e inibidores de enzimas chave do metabolismo de hormônios.

## 1.6 Mecanismos Neuroprotetores (Óxido Nítrico)

O Óxido Nítrico (NO) é uma importante molécula de sinalização intercelular, que contribui para a regulação do eixo HPA (GADEK-MICHALSKA & BUGAGISKI, 2008). Exerce funções como modulação do tônus vascular, neurotransmissão, resposta imune e sinalização celular (TRIPATHI *et.al.*, 2007; FAASSEN & VANIN, 2007). Além disso, o NO é um importante mensageiro molecular no cérebro e tem uma função importante no aprendizado e memória e funciona também como agente neuro protetor (THATCHER *et.al.*, 2006).

A síntese do NO resulta da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, que é convertida em L-citrulina. Esta reação é catalisada pela óxido nítrico sintase (NO<sub>S</sub>) (BERG *et.al.*, 2008) A família (NO<sub>S</sub>) apresenta 3 isoformas: 2 constitutivas (Óxido nítrico neuronal NO<sub>N</sub>, Óxido nítrico endotelial - NO<sub>E</sub>), que são dependentes dos íons cálcio e da calmodulina e que está envolvida diretamente na sinalização celular. A outra forma é a indutiva (NO<sub>I</sub>) que sob condições normais não são expressas. Elas são induzidas por citocinase / ou endotoxinas em uma variedade de células incluindo-se macrófagos, linfócitos T, células endoteliais, miócitos, hepatócitos, condrócitos, neutrófilos e plaquetas (GUZIK *et.al.*, 2003). O nível de (NO<sub>I</sub>) é baixo no sistema nervoso central, mas ele é induzido por alguns eventos como a reação inflamatória. As isoformas tanto constitutivas quanto induzidas, são auto reguladas nas células cerebrais sobre condições pró-inflamatórias (TRIPATHI *et.al.*, 2007).

Uma via de sinalização importante na produção de óxido nítrico é a via IRS/PI3-K/Akt/eNOS, que pode ser estimulada pela IL-6. A formação das espécies reativas de nitrogênio (ERN) ocorre pela interação com radicais livres. Assim como as espécies reativas de oxigênio (ERO), as ERN são normalmente úteis para o organismo, porém, em excesso,

podem ser tóxicas. Desta forma, um balanço entre NO<sup>•</sup> e ERO nos locais de lesão é essencial para saber se a sinalização para a resposta será de dano tecidual ou de reparo ou ainda de inflamação crônica, pois quando existe um aumento de ERO em relação a NO<sup>•</sup>, existe maior produção de peroxinitrito (maléfico para o organismo – produto da reação do óxido nítrico com o radical superóxido) e quando existe um aumento de NO<sup>•</sup> em relação ao ERO, existe maior produção de alkil peroxinitratos (benéficos) (DARLEY – USMAR *et al.* , 1995; FAASSEN & VANIN,2007; GUTTERIDGE, 2007).

## **1.7 Mecanismos anti e pró-inflamatórios**

Infecções e injúria tecidual induzem uma cascata complexa de eventos fisiológicos conhecida como resposta inflamatória, que promove proteção aos tecidos, restringindo os danos no local da infecção ou injúria, mas podendo ter efeitos deletérios quando de forma exacerbada. Vários mediadores participam ativamente da resposta inflamatória: 1) quimiocinas realizam quimiotaxia de leucócitos; 2) enzimas plasmáticas, como bradicinina e fibrinopeptídeos, aumentam a permeabilidade vascular; 3) plasminina degrada coágulos em produtos quimiotáticos e ativa proteínas do sistema complemento e seus derivados, como anafilotoxinas que induzem degranulação de mastócitos e conseqüente liberação de histamina, e opsoninas que induzem a opsonização de microrganismos, facilitando a fagocitose; 4) mediadores lipídicos como tromboxanos, prostaglandinas e leucotrienos participam do processo de vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular; 5) citocinas induzem efeitos locais, tais como indução da expressão de moléculas de adesão e de quimiocinas (BILATE,2007)

### **1.7.1 Citocinas**

Citocina é o nome genérico que designa o grupo de proteínas envolvidas na emissão de sinais entre as células, funcionando como um conjunto de agentes imunorreguladores. As citocinas pró- inflamatórias atraem células imunes, que respondem aos agentes invasores. A inflamação localizada é uma resposta imunitária vital, que, quando aguda, é benéfica, mas quando crônica e silenciosa, pode levar ao desenvolvimento de doenças neurodegenerativas.

As citocinas anti-inflamatórias são uma série de moléculas imunorreguladoras que controlam as respostas da citocina pró-inflamatória. O papel fisiológico dessas moléculas, na inflamação, e o seu papel patológico, em estados inflamatórios sistêmicos, têm sido gradualmente reconhecidos. Entre as principais citocinas inflamatórias encontram-se os receptores antagonistas IL-1, IL-4, IL-6, IL-10, IL-11 e IL-13, conhecidos pelas suas funções de mediadores e reguladores da inflamação (BERTELLI *et.al.*,2010).

A produção das mesmas é desencadeada quando as células são ativadas por diferentes estímulos, como agentes infecciosos, tumores ou estresse. Elas atuam na comunicação entre as células, promovendo a indução ou regulação da resposta imune. As principais características das citocinas são: 1. Uma mesma citocina pode ser produzida por mais de um tipo celular; 2. Uma mesma citocina pode ter diferentes efeitos, dependendo das condições do microambiente – pleiotropismo; 3. Diferentes citocinas podem exercer a mesma função – redundância; 4. As citocinas podem potencializar ou inibir o efeito de outras citocinas – sinergismo ou antagonismo, respectivamente; 5. A maioria das citocinas exerce efeitos parácrinos (ação sobre células presentes nas proximidades das células produtoras da citocina) ou efeitos autócrinos (ação sobre o tipo celular que a produz). Além disso, algumas citocinas exercem efeitos endócrinos, agindo sobre células presentes em outros locais que não os da célula produtora daquela citocina (BILATE, 2007).

O envelhecimento tem sido associado a um aumento crônico dos níveis circulantes de marcadores inflamatórios, incluindo citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias, antagonistas de citocinas e proteínas de fase aguda. A grande variação de fatores ambientais, incluindo tabagismo, infecções, obesidade, fatores genéticos, declínio funcional, fragilidade e diminuição de hormônios sexuais podem contribuir para atividade inflamatória sistêmica em idosos. Uma ativação imune generalizada relacionada ao envelhecimento pode contribuir para o desenvolvimento da Síndrome de Fragilidade por meio de influências patológicas em outros órgãos e sistemas. A ativação inflamatória generalizada ocorreria como consequência da falha de mecanismos regulatórios que permitem que células imunes ativadas continuem a produzir agentes catabólicos, mesmo depois de cessado o estímulo. A exposição em níveis elevados dessas substâncias por um longo período contribui para a fragilidade, pela sua ação catabólica (MACEDO *et.al.*,2008).

### 1.7.2 *Interleucina 4 (IL-4)*

A interleucina-4 (IL-4) é uma linfocina pleiotrópica que desempenha um papel importante no sistema imune (TAKEDA,1996). Tem efeito anti-inflamatórios e imunomodulatórios (FORMENTINI *et.al.*,2012), regula a produção de outras citocinas, bem como de monócitos, macrófagos, eosinófilos, células endoteliais e células *Natural Killer* (Enzo Life science ; LUZINA *et.al.*, 2012). As respostas imunitárias tipo 2, implicam em uma resposta humoral caracterizada pela IL-4 dependente da produção de IgE e IgG (VIJAYANAND *et.al.*,2012).

Essa interleucina já demonstrou *in vitro* uma atividade antitumoral contra mielomas, linfomas, leucemia e alguns tumores sólidos (OLEKSOWICZ & DUTCHER , 1994 ). IL-4 tem sido extensivamente estudada no contexto do seu papel na imunidade. O acúmulo de provas indica, no entanto, que também desempenha um papel crítico nas funções superiores do cérebro normal, tais como a memória e aprendizagem (GADANI *et.al.*,2012).

### 1.7.3 *Interleucina 10 (IL-10)*

A Interleucina- 10 (IL-10) é uma citocina pleiotrópica que estimula várias células hematopoiéticas (DE DEUS *et.al.*,2012). É um mediador anti-inflamatório (FERRARI, 2007), e também fator de desativação de macrófagos. Atuando em células acessórias de macrófagos – monócitos, para produzir os seus efeitos inibitórios sobre as células T e células *Natural Killer*. Ela também regula o crescimento e / ou diferenciação das células B, mastócitos, granulócitos, células dendríticas, células endoteliais e queratinócitos (Enzo Lifescience Catalog ).

A interleucina 10 desempenha um papel central limitando a resposta imune do hospedeiro a agentes patogênicos, mantendo a homeostase do tecido normal. A desregulação da IL-10 está associada a um risco aumentado para o desenvolvimento de muitas patologias auto-imunes. (IYER & CHENG, 2012; SARAIVA & GARRA, 2010). A produção de IL-10 parece estar associada com muitas células do sistema imunológico, afirmando seu papel crucial como um regulador de “feedback”

imunológico, em diversas respostas; não só das células TH1 ,mas também TH2, como no caso de esquistossomas, *Aspergillus spp* e alergias (SARAIVA & GARRA, 2010).

Recentes estudos sugerem que a IL-10 é a citocina chave que pode suprimir a imunidade mediada por células. Tem sido encontrada em níveis elevados em idosos saudáveis (MACEDO *et.al.*,2008).

#### **1.7.4 Interleucina 8 (IL-8)**

A interleucina-8 (IL-8), também conhecida como CXCL-8, foi originalmente purificada a partir de lipopolissacarídeo (LPS)-estimulados por cultura de monócitos humanos e, subsequentemente, mostrou que induzia a quimiotaxia de neutrófilos e linfócitos-T, ativava os neutrófilos, e aumentava a expressão e adesão de dos mesmos (ASFAHA *et.al.*,2012).

A interleucina-8 (IL-8) tem propriedades mitogênicas e angiogênicas. Monócitos, macrófagos, neutrófilos, linfócitos, fibroblastos dérmicos, queratinócitos, células endoteliais vasculares, os melanócitos, hepatócitos e várias linhas de células tumorais são produtoras de IL-8 (Enzo Lifescience Catalog # ADI-900-156). Em tecidos inflamados, a fonte primária de secreção de IL-8 parece ser de células mielóides, onde o gene é transcricionalmente-regulado por proteína ativadora-1 e o fator nuclear  $\kappa$ B. Essa interleucina é normalmente indetectável em tecidos saudáveis, mas sua expressão é fortemente regulada por citocinas pró-inflamatórias ou fatores associados a patógenos, através dos receptores do tipo Toll em tecidos feridos e / ou infectados. (ASFAHA *et.al.*,2012).

A presença de inflamação no processo de envelhecimento traduz-se em acumulação de neutrófilos, na elevação dos níveis plasmáticos de interleucinas IL-6, IL-8 e TNF-alfa (RODRIGUES,2009).

Diante desses fatos, sabendo-se que pode existir uma inter-relação entre envelhecimento, processos imunes, ação da noradrenalina e óxido nítrico, e mecanismos antioxidantes e antiinflamatórios do ácido caféico, buscamos preencher uma lacuna que ainda existe dentro dessa possível correlação de fatores acima

mencionados. Assim, nosso estudo pode auxiliar na geração de novas terapias que possam proporcionar uma melhor qualidade de vida dos indivíduos dentro do implacável processo de senilidade.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar o efeito modulador da Noradrenalina e do Ácido Caféico, sobre a produção de Óxido Nítrico, o processo de Fagocitose e a dosagem de citocinas anti e pró-inflamatórias, em granulócitos humanos, durante o processo de envelhecimento .

### **2.2 Objetivos Específicos**

**2.2.1** Avaliar a produção de Óxido Nítrico (NO) pela Reação de Griess, na presença ou ausência de Noradrenalina em Granulócitos humanos, durante o processo de envelhecimento.

**2.2.2** Avaliar o processo de Fagocitose realizado através do Zimozan (ZC3b) opsonizado corado, na presença ou ausência de Noradrenalina em Granulócitos humanos, durante o processo de envelhecimento.

**2.2.3** Avaliar a produção de Citocinas pró-inflamatórias (IL-8) e antiinflamatórias (IL-4 e IL-10) na presença ou ausência de Noradrenalina em Granulócitos humanos, durante o processo de envelhecimento.

**2.2.4** Avaliar o possível efeito modulador do Ácido Caféico sobre a ação da Noradrenalina através da avaliação da produção de óxido nítrico, fagocitose e dosagem de citocinas pró e antiinflamatórias .

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Comitê de ética**

O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), e foi aprovado dentro das normas do comitê em questão. Projeto de pesquisa CAAE 0663.0.203.000-11.

#### **3.2 Material e Equipamentos**

##### ***3.2.1 Equipamentos***

Autoclave vertical – PHOENIX

Banho-Maria a 37°C – HEMOQUÍMICA

Centrífuga – LS – 3PLUS – CELM

Estufa – Shel LAB

Leitor de Microplacas – THERMO PLATE

Microscópio biológico binocular – QUIMIS

##### ***3.2.2 Materiais***

Álcool 70% v/v

Algodão

Béquer de 50,100,500 mL

Câmara de Newbauer espelhada

Eppendorfs de 1,5 e 2 mL

IL-4 human ELISA Kit – Catalog.N°900-145 Enzo Life Sciences

IL-8 human ELISA Kit – Catalog.N°900-156 Enzo Life Sciences

IL-10 human ELISA Kit – ADI – 900-036 Enzo Life Sciences

Luvas descartáveis

Papel filme

Pipeta automática 200 µL

Pipetas de 10,20,50,100,500,1000 µL

Pipeta Pasteur de ponta fina

Pipeta graduada 1,5,10 mL

Pêras para pipeta

Placas para cultura de células de 24 poços

Placas para cultura de células de 96 poços

Provetas de 25,50,100,1000 mL

Ponteiras para pipetas

Tubos de hemólise

Tubos siliconizados

### **3.3-Reagentes**

Ácido Caféico - CALBIOCHEM

Ácido Clorídrico – SYNTH

Ácido Fosfórico 85% - SIGMA

Azul de Trypan – SIGMA

Cloreto de potássio – SYNTH

Cloreto de sódio – SYNTH

Dimetilsulfóxido (DMSO) – SIGMA

Fosfato de sódio bafásico anidro – SYNTH

Fosfato de potássio monobásico anidro – SYNTH

Hemitartarato de Norepinefrina – HIPOLABOR

Hidróxido de sódio - VETEC

Leokopac – Bion Ltda.

Monopac – Bion Ltda.

Naftiletilenodiamida - SIGMA

Nitrito de sódio- Synth

RPMI – 1640 – SIGMA

Sulfanilamida – SIGMA

Zimozan - SIGMA

### **3.4 Soluções**

#### ***3.4.1 Solução tampão fosfato salina sem cálcio e sem magnésio (PBS)***

Para o preparo de PBS, foram misturados os seguintes sais:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (1,15 g),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,20 g), NaCl (8,0 g), KCl (0,20 g), sendo o volume final completado para 1 litro com água MILLI-Q. O pH da solução (7,3) foi acertado utilizando-se HCl 1N ou NaOH 1N. A solução final foi autoclavada a 121° C por 20 minutos.

### ***3.4.2 Solução de Azul de Trypan***

Fez-se a diluição de (0,1% em PBS) 0,1 g do corante Azul de Trypan em 100 mL de solução de PBS.

### ***3.4.3 Meio de cultura RPMI***

Um frasco de RPMI foi diluído em 900 mL de água destilada. Em seguida foram adicionados 2,0 g de bicarbonato de sódio e 1 ampola de 1,5 mL de antibiótico (garamicina 40 mg/mL). O pH foi ajustado para a faixa de 7,3 – 7,4, utilizando-se NaOH 0,5N. O volume final da solução foi ajustado para 1000 mL. Em seguida a solução foi filtrada em membrana de porosidade de 0,22 microns, e colocada em recipiente estéril.

### ***3.4.4 Solução de Ácido Caféico à 2774 Mm***

Para solução estoque, o conteúdo do frasco (500 mg) foi diluído em 10 mL de DMSO. Esta solução (0,2774 M) foi estocada refrigerada. Para uso, diluía-se 100 vezes em PBS, para a concentração de uso: 2774  $\mu$ M. Ao (LEE & ZHU, 2006; MAISTRO *et al.*, 2011). No momento do experimento, era pipetado o volume necessário para se ter uma concentração final de Ácido Caféico 500  $\mu$ M.

### ***3.4.5 Solução de Noradrenalina $170 \times 10^{-4} M$***

Para solução estoque, o conteúdo do frasco (170M) foi diluído em 100mL de PBS. Esta solução (NA  $170 \times 10^{-1} M$ ) foi estocada refrigerada. Para realização dos testes, diluía-se em PBS para concentração de uso: NA  $170 \times 10^{-8} M$ . No momento do experimento, era pipetado o volume necessário para se ter uma concentração final de Noradrenalina  $170 \times 10^{-9} M$ .

### ***3.4.6 Solução Padrão de Nitrito***

Para o preparo da solução 6,9 mg de Nitrito de sódio ( $NaNO_2$ ) foi dissolvido em 10 mL de PBS; com a obtenção de uma solução padrão a 10 mM.

### ***3.4.7- Gradiente de separação de células***

Para separação dos granulócitos foram utilizados dois gradientes de densidades diferentes, a saber: Monopaque: ( $d = 1,08$ ) (Bion LTDA) Leukopaque: ( $d = 1,12$ ) (Bion LTDA).

### ***3.4.8 Solução de Sulfanilamida 1%***

Para o preparo da solução 1,0g de Sulfanilamida foi dissolvido em 100mL de Ácido Fosfórico 2,5%. O conteúdo foi homogeneizado e protegido da luz.

### **3.4.9 Solução de Naftilenodiamida 0,1%**

Para o preparo da solução 0,1g de Naftilenodiamida foi dissolvido em 100mL de Ácido Fosfórico 2,5%. O conteúdo foi homogeneizado e protegido da luz.

### **3.4.10 Solução de Griess**

Esta solução foi preparada à partir da mistura em proporções iguais da Sulfanilamida 1% com Nafitiletlenodiamida 0,1%. Essa solução é feita no momento da dosagem de nitrito, no Teste de produção de Óxido Nítrico.

## **3.5 Definição da concentração usada para a Noradrenalina**

Através de curva concentração-resposta escolheu-se a concentração da Noradrenalina, como sendo  $170 \times 10^{-9}M$ . Os critérios de escolha da mesma, foram que, nessa concentração, houve efeito ativatório dos grupos estimulados, em relação ao controle, a viabilidade celular permaneceu próxima de 95%, e por tratar-se de uma concentração fisiológica (GOSAIN *et al.*, 2009).

## **3.6 Definição da concentração usada para o Ácido Caféico**

Através de curva concentração-resposta escolheu-se a concentração do Ácido Caféico, como sendo  $500\mu M$ . Os critérios de escolha da mesma, foram os mesmos usados para a definição da concentração da Noradrenalina: ativação do grupo

estimulado em relação ao grupo controle e permanência da viabilidade celular próximo a 95%.

### 3.7 Métodos

#### 3.7.1 Seleção de Doadores

Foram selecionados indivíduos entre 20 e 80 anos, de ambos os sexos, que se encontrava em um processo normal de envelhecimento. Para a escolha dos doadores adotamos critérios de exclusão de acordo com protocolo SENIEURS (LIGTHRT *et. al.*,1984), que é um sistema de estudo no qual avaliam um indivíduo saudável do não saudável que apresenta como critérios exclusão, doenças e medicamentos que influenciam nos parâmetros imunogerontológicos. Os critérios de exclusão apontados no protocolo são: Fumantes, portadores de infecção, inflamação, malignâncias, desordens lipoproliferativas, arteriosclerose, insuficiência cardíaca, uso de medicamentos que influenciem diretamente na função imune. Os indivíduos foram selecionados através de um Questionário de Perguntas (3.5.1), aplicado pela mestrandia Raquel Cunha Lara, aos interessados em participar da pesquisa. Aqueles que estavam áptos à participação, foram submetidos à assinatura de um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

Os indivíduos foram divididos em 3 (Três) grupos:

I: 20 a 39 anos

II: 40 a 59 anos

III: 60 a 80 anos

Houve aplicação de 3 (Três) protocolos: Fagocitose / Produção de Óxido Nítrico / Dosagem de IL-4,IL-8,IL-10. O número de doadores para cada protocolo está estipulado na tabela abaixo:

**Tabela 1:** Número de doadores de acordo com as faixas etárias e protocolos.

GRUPOS / PROTOCOLOS	FAGOCITOSE	PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO	DOSAGEM DE IL-4	DOSAGEM DE IL-8	DOSAGEM DE IL-10
I	10	10	10	10	10
II	10	10	10	10	10
III	10	10	10	10	10

### 3.7.2 Questionário de Perguntas para seleção de doadores

Nome Completo:

Idade:

Sexo:

Gravidez? Sim ( )

Não ( )

Fumante? Sim ( )

Não ( )

Alcoolista? Sim ( )

Não ( )

Faz uso de medicamentos? Se sim, quais?-----

-----

Já foi diagnosticado como diabético? Sim ( )

Não ( )

Tem hipo/hipertireoidismo? Sim ( )

Não ( )

### 3.8 Coleta de Sangue

Após leitura e assinatura do TCLE, o sangue periférico foi obtido por punção venosa a partir de voluntários adultos saudáveis, utilizando tubos contendo heparina,

como anticoagulante (ESMANN *et al.*,2010) e os neutrófilos foram isolados segundo a técnica descrita por BICALHO *et al.*, 1981.

Em suma, 4mL de sangue heparinizado foram adicionados sobre 3 mL de gradiente Monopaque (densidade= 1,12), empilhado sobre 3 mL de gradiente Leucopaque (densidade= 1,13) em tubos de vidro. Após centrifugação a 2500 rpm por 40 minutos foram obtidas três fases distintas separadas por dois anéis interfásicos. O primeiro anel, correspondente às células Mononucleares, e o segundo anel, correspondente aos Granulócitos. O plasma, correspondente à primeira fase formada após centrifugação, foi retirado e acondicionado em um tubo de vidro. Em seguida retirou-se também o anel de mononucleares, sendo esse descartado. Os Granulócitos foram acondicionados em um tubo siliconizado, que teve seu volume completado com PBS (pH=7,3) para duas sessões de lavagem a 1500 rpm por 15 minutos cada. Após as duas lavagens as células foram suspensas em 1,0 mL de RPMI. Para utilização, as mesmas foram diluídas 100 vezes em PBS e contadas em placa de Newbauer. Ajustou-se o volume final para  $1 \times 10^6$  células em 100  $\mu$ L.

### 3.9 Procedimento para obtenção do ZC3b corado

Inicia-se com a diluição do Zimozan estoque: 240  $\mu$ L de Zimozan estoque é resuspenso em 760  $\mu$ L de PBS, formando a solução de uso. Em tubos de hemólise, adiciona-se 1800 $\mu$ L de PBS e 200 $\mu$ L da solução de Zimozan formada, descrita anteriormente. Procedese com a centrifugação a 1500 rpm/5minutos dessa segunda solução formada. O sobrenadante é então retirado e, é então adicionado ao tubo de hemólise 400 $\mu$ L de plasma e 1600 $\mu$ L de PBS. O tubo de hemólise é colocado em banho-maria a 37°C por 30 minutos, sendo necessário homogeneizar o conteúdo a cada 10 minutos. Decorridos os 30 minutos, completa-se o tubo com PBS e o leva para centrifugação a 1500 rpm/5 minutos. Essa lavagem deve ser feita duas vezes. Após a segunda lavagem, completa-se o tubo com 1000 $\mu$ L de PBS.

Ao Zimozan previamente opsonizado, adiciona-se 20 gotas de Azul de Trypan 1%. Novamente, o tubo é levado para banho-maria à 37°C, onde seu conteúdo deve ser também homogeneizado a cada 10 minutos. Após os 30 minutos finais, completa-se o tubo com PBS e

o leva para centrifugação aos mesmos 1500 rpm/5 minutos. Esta lavagem deve ser feita em duplicata. Ao fim, retira-se o sobrenadante, e o pellet é resuspenso em 1000µL de PBS. (PERILLO *et.al.*, 2005).

### 3.10 Fagocitose através de Microscopia Óptica

Após separação dos Granulócitos fez-se o ajuste do volume final, no qual para cada 100 µL de solução (Granulócitos +RPMI) tínhamos  $1 \times 10^6$  células. Essas células granulomatosas foram incubadas em banho-maria, à 37°C por um período de 30 minutos. Tal incubação, incluiu: Granulócitos  $1 \times 10^6$  em meio de cultura RPMI, Granulócitos  $1 \times 10^6$  estimulados com Noradrenalina  $170 \times 10^{-8}M$ , Granulócitos  $1 \times 10^6$  estimulados com Ácido Caféico  $2774\mu M$  e Granulócitos  $1 \times 10^6$  estimulados com Noradrenalina  $170 \times 10^{-8}M$  e Ácido Caféico  $2774\mu M$ . Em todas essas situações de incubação, adicionou-se também, zimozan opsonizado e corado. O zimozan é derivado da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, sendo portanto, uma partícula imunologicamente estranha. Decorrido esse tempo de incubação (30 minutos), contou-se pelo microscópio óptico, 100 células em processo fagocítico e não-fagocítico com auxílio da câmara de Neubauer. Determinando-se dessa forma a porcentagem de fagocitose. É importante salientar, que todo o procedimento foi feito em duplicata.

**Tabela 2:** Ensaio de Fagocitose – Disposição dos Granulócitos

Tubos de Hemólise	Granulócitos	RPMI	Zimozan opsonizado	Ácido Caféico (estoque) 2774 uM	Norepinefrina (estoque) $170 \times 10^{-8} \text{M}$
Tubo de Hemólise 1	100µL( $1 \times 10^6$ )	300µL	100µL		
Tubo de Hemólise 2	100µL( $1 \times 10^6$ )	210µL	100µL	90µL	
Tubo de Hemólise 3	100µL( $1 \times 10^6$ )	250µL	100µL		50µL
Tubo de Hemólise 4	100µL( $1 \times 10^6$ )	160µL	100µL	90µL	50µL

\*conteúdo total de cada tubo = 500µL

\*\*procedimento realizado em duplicata

\*\*\* A concentração final do Ácido Caféico foi de 500uM e da Noradrenalina  $170 \times 10^{-9}$

### 3.11 Produção de Óxido Nítrico pela reação de Griess

Foi avaliada a quantificação de nitrito segundo reação de Griess (GRIESS , 1864) para observar a produção de óxido nítrico por granulócitos no qual segue o seguinte protocolo: 100 µl de granulócitos foram incubados na presença ou ausência de Noradrenalina  $170 \times 10^{-8} \text{M}$  e Ácido Caféico 2774µM. Em todos os ensaios o volume final foi ajustado para 300µl com RPMI pH 7,4. Os granulócitos foram mantidos em placas de cultura celular de 24 poços, em Estufa à 37°C e 5% CO<sub>2</sub> (dióxido de carbono) por 16 h. Decorridas essas 16 horas, os granulócitos foram centrifugados à 2500 RPM por 15 minutos. O sobrenadante foi coletado e utilizado para dosagem do nitrito. O *pellet* foi resuspenso em 200µl de RPMI pH 7,4 e imediatamente, submetido à análise de viabilidade celular. Para dosagem do nitrito, foi utilizado 100µl de sobrenadante, que foram dispostos em placas de 96 poços. Aos sobrenadantes, foram adicionados 100µl de solução de Griess, que é formada de sulfanilamina 1% em 2,5% de ácido fosfórico e naitilenodiamina 0,1% em 25% de ácido fosfórico, na proporção 1:1. O conteúdo da placa foi analisado por leitor de ELISA, no comprimento de

onda 540nm. A concentração de nitrito foi calculada por regressão linear, utilizando a curva padrão obtida a partir de uma solução de nitrito de sódio 1 mM e meio de cultura RPMI.

**Tabela 3:** Produção de Óxido Nítrico – disposição dos Granulócitos.

Placa de Cultura	Granulócitos	RPMI	Ácido Caféico	Norepinefrina
Celular- 24 poços			2774µM	170 x 10 <sup>-8</sup> M
Poço 1	100µL(1X10 <sup>6</sup> )	200µL		
Poço 2	100µL(1X10 <sup>6</sup> )	146µL	54µL	
Poço 3	100µL(1X10 <sup>6</sup> )	170µL		30µL
Poço 4	100µL(1X10 <sup>6</sup> )	116µL	54µL	30µL

\*conteúdo total de cada poço = 300µL

\*\*procedimento realizado em duplicata

\*\*\* A concentração final do Ácido Caféico foi de 500 uM e da Noradrenalina 170 x 10<sup>-9</sup>M.

**Tabela 4:** Leitura da Produção de Óxido Nítrico – Leitor de ELISA 540nm.

Placa de Cultura Celular- 96 poços		
Poço 1	100 µL Sobrenadante de Granulócitos	100 µL Reagente de Griess
Poço 2	100 µL Sobrenadante de Granulócitos estimulados com Norepinefrina $10^{-9}$ M	100 µL Reagente de Griess
Poço 3	100 µL Sobrenadante de Granulócitos estimulados com Ácido Caféico $500\mu\text{M}$	100 µL Reagente de Griess
Poço 4	100 µL Sobrenadante de Granulócitos estimulados com Norepinefrina $10^{-9}$ M+ Ácido Caféico $500\mu\text{M}$	100 µL Reagente de Griess

\*conteúdo total de cada poço = 200 µL

\*\*procedimento realizado em duplicata

### 3.12 Quantificação da produção de citocinas

A quantificação da produção de interleucina 4 (IL-4), interleucina 8 (IL-8), interleucina 10 (IL-10) foi realizada em sobrenadante de cultura de Granulócitos ( $1 \times 10^6/100 \mu\text{L}$ ), na presença ou ausência de Noradrenalina ( $170 \times 10^{-9}$  M) e Ácido Caféico ( $500 \mu\text{M}$ ), de acordo com as recomendações do fabricante. Os kits utilizados foram:

IL-4 human ELISA Kit – Catalog.Nº900-145 Enzo Life Sciences

IL-8 human ELISA Kit – Catalog.Nº900-156 Enzo Life Sciences

IL-10 human ELISA Kit – ADI – 900-036 Enzo Life Sciences

### **3.13 Viabilidade celular**

A viabilidade celular foi realizada pelo teste de azul de tripan (OLIVEIRA –LIMA & DIAS DA SILVA, 1970). Resumidamente, aos granulócitos será adicionada 1 gota de solução 0,1% de azul de tripan. Após este procedimento, os granulócitos foram observados em câmara de Neubauer, pelo auxílio do microscópio óptico. Assim, tanto células mortas (coloração azul) quanto células vivas (brilhantes) foram contadas. Nos ensaios onde o número de células não-viáveis ultrapassou 5%, houve descarte das mesmas. Concluindo-se que a viabilidade celular deve ser sempre superior a 95%.

### **3.14 Análise estatística**

O teste estatístico utilizado foi o não paramétrico de Mann-Whitney. Este teste corresponde ao teste “t” para amostras independentes no caso paramétrico e avalia se existe diferença significativa entre duas variáveis distintas. O nível de significância foi avaliado a partir de um p-valor e para valores com  $p < 0,05$  os resultados foram considerados significativos e  $p < 0,01$  muito significativos. Também foi usado um teste inicial de ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, para a análise da modulação do ácido caféico sobre a noradrenalina (item 4.2 - Resultados), quando comparamos as faixas etárias entre si. Aqui sendo considerado significativo os valores onde  $p < 0,05$ . Para análise dos resultados utilizou-se o software Prism 5.

## 4 RESULTADOS

### 4.1. Avaliação do processo de fagocitose por microscopia óptica, geração de óxido nítrico e produção de interleucinas pro e antiinflamatórias por granulócitos humanos.

#### 4.1.1 Faixa etária de 20 a 39 anos

A tabela 5 mostra o perfil fagocítico dos granulócitos humanos incubados de 3 (três) formas diferentes, a saber: em estado basal; estimulados com ácido caféico 500 uM e estimulados com noradrenalina  $170 \times 10^{-9}$  M . Todos esses, na faixa etária de 20 a 39 anos. Nossos resultados mostraram que houve um aumento da capacidade de fagocitose dessas células de defesa, quando as mesmas foram estimuladas por noradrenalina quando comparadas ao grupo controle (granulócitos em estado basal). Tal **ativação foi de 26%**, e não foi observada quando os granulócitos foram incubados isoladamente com ácido caféico.

**Tabela 5:** Comparação da porcentagem de fagocitose em granulócitos humanos estimulados com ácido caféico e noradrenalina na faixa etária de 20-39 anos.

Faixa Etária: 20-39 anos	Fagocitose (MÉDIA <sup>+/-</sup> EP)	% Ativação	%Inibição
G + ZC3b	66,30 +/- 3,87	-	-
G + AC + ZC3b	62,00 +/- 6,94	-	-
G + NA + ZC3b	83,56 +/- 2,76 *	26	-

\* = significativo  $p < 0,05$  pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney quando comparado ao grupo controle (G +ZC3b) G+ZC3b = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Zimozam opsonizado (ZC3b). G+AC+ZC3b = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Ácido Caféico (AC) 500 uM e Zimosan opsonizado (ZC3b). G+ NA + ZC3b = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Noradrenalina (NA)  $170 \times 10^{-9}$  M e Zimosan opsonizado (ZC3b).

A tabela 6 mostra o perfil fagocítico dos granulócitos humanos, quando o objetivo foi avaliar a modulação do ácido caféico sobre a ação da noradrenalina no processo de fagocitose. Por isso, fez-se a análise de 2 grupos: o primeiro estimulado com noradrenalina e o segundo estimulado tanto com a noradrenalina, quanto com o ácido caféico. Nossos resultados demonstraram que quando o ácido caféico foi incubado com a noradrenalina houve uma **inibição de 32%** da capacidade fagocítica desempenhada pelos granulócitos.

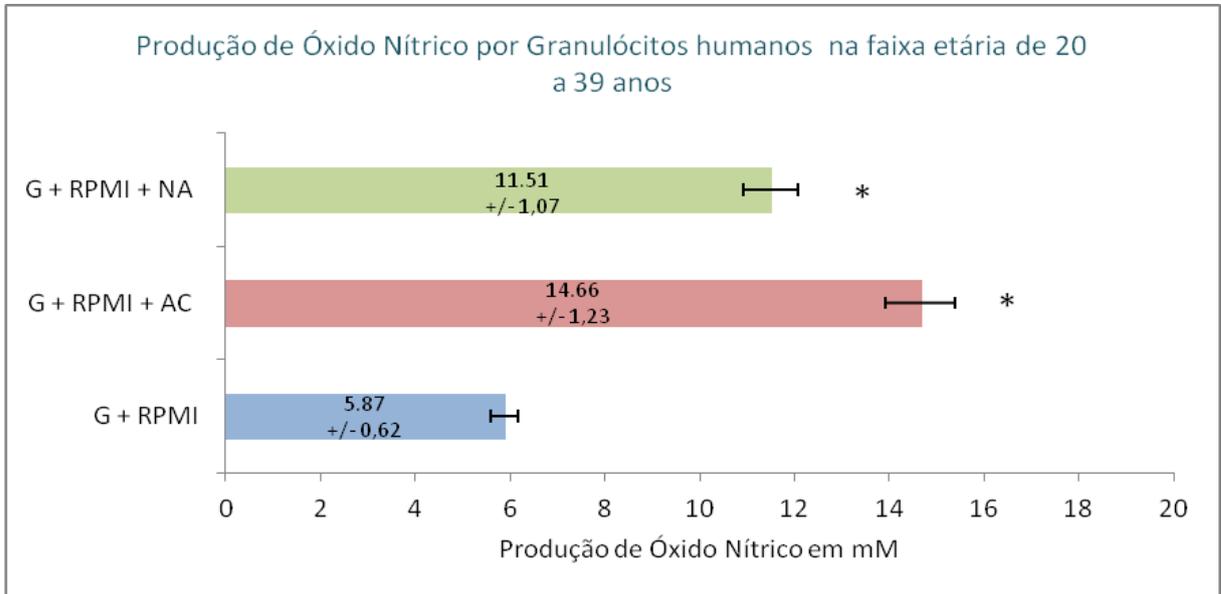
**Tabela 6:** Avaliação da modulação do ácido caféico sobre a noradrenalina no processo de fagocitose, em granulócitos humanos na faixa etária de 20 a 39 anos.

Faixa Etária: 20-39 anos	Fagocitose (MÉDIA <sup>+/-</sup> EP)	% Ativação	% Inibição
G + NA + ZC3b	83,56 +/- 2,76	-	-
G + AC +NA +ZC3b	56,40 +/- 7,48 *	-	32

\* = significativo  $p < 0,05$  pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney quando comparado ao grupo controle (G +NA+ZC3b) G+ NA + ZC3b = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Noradrenalina (NA)  $170 \times 10^{-9}$  M e Zimosan opsonizado (ZC3b).G+AC+NA+ZC3b = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Ácido Caféico (AC) 500uM , Noradrenalina (NA)  $170 \times 10^{-9}$  M e Zimosan opsonizado (ZC3b).

A figura 4 demonstra o perfil de produção de óxido nítrico por granulócitos humanos, incubados com ácido caféico e noradrenalina, separadamente. Nossos resultados mostraram que houve um aumento estatisticamente significativo na produção de óxido nítrico (medido em mM) por essas células de defesa, quando as mesmas foram estimuladas por ácido caféico, quando comparadas ao grupo controle (granulócitos + RPMI). Havendo também, aumento significativo na produção de NO, quando os granulócitos foram incubados com noradrenalina em relação ao grupo controle.

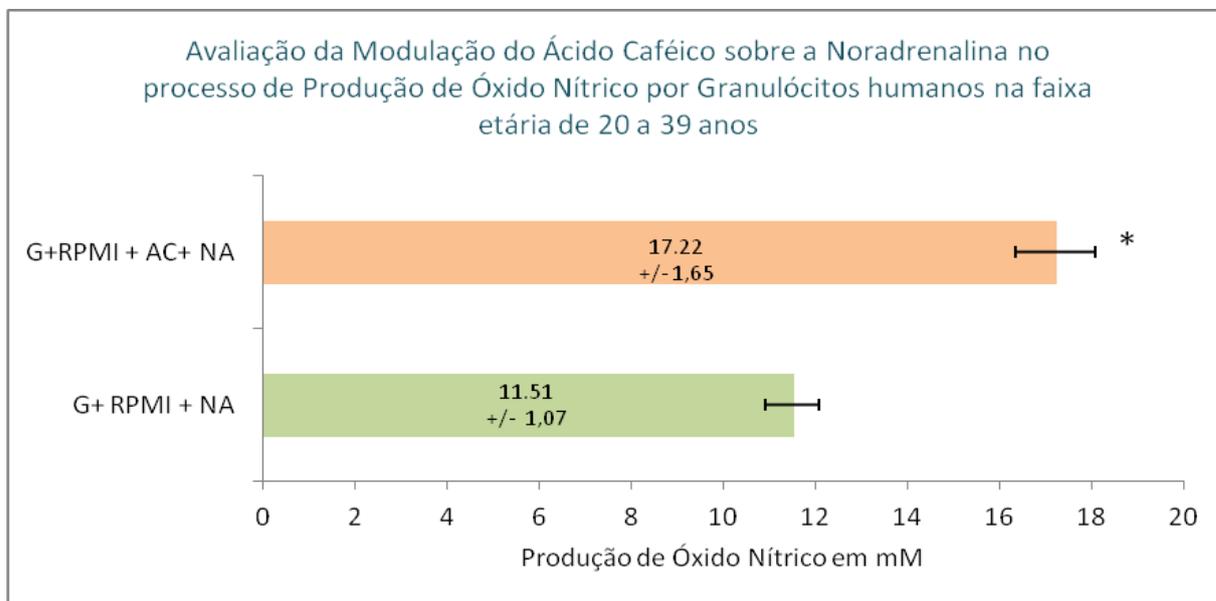
**Figura 4** – Comparação da produção de óxido nítrico por granulócitos humanos estimulados com ácido caféico e noradrenalina na faixa etária de 20-39 anos.



\* = significativo  $p < 0,05$  pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney quando comparado ao grupo controle (G +RPMI). G+RPMI = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  + meio de cultura (RPMI) [em estado basal]. G+RPMI +AC = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Ácido Caféico (AC) 500uM. G+ RPMI + NA = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Noradrenalina (NA)  $170 \times 10^{-9}$  M. Valores expressos estatisticamente em forma de média +/- EP.

A figura 5 ilustra o perfil de produção de óxido nítrico por granulócitos humanos quando o objetivo é avaliar a modulação do ácido caféico sobre a ação da noradrenalina, na produção de NO. Nossos resultados demonstraram que houve diferença significativa da capacidade de produção de óxido nítrico quando o ácido caféico é incubado com a noradrenalina. Ou seja, o ácido caféico foi capaz de modular a atividade da noradrenalina,  **aumentando em 49%** a produção da molécula de NO.

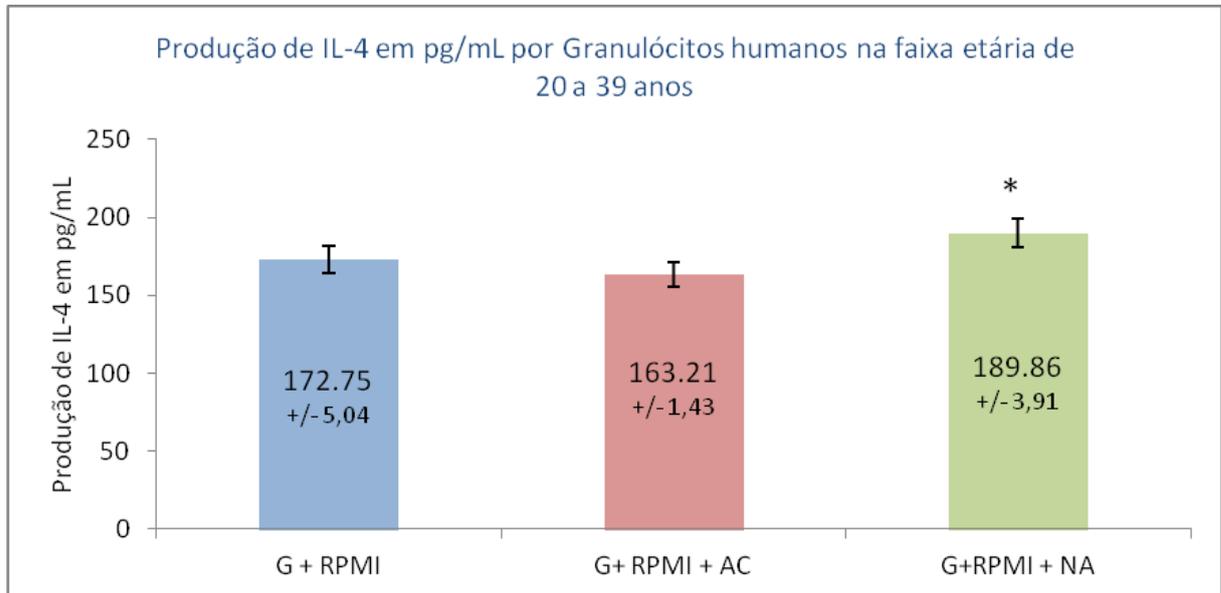
**Figura 5** – Avaliação da modulação do ácido caféico sobre a noradrenalina no processo de produção de óxido nítrico, por granulócitos humanos na faixa etária de 20-39 anos.



G+RPMI + NA = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Noradrenalina (NA)  $170 \times 10^{-9}$  M . G+RPMI +AC+NA = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Ácido Caféico (AC) 500uM e Noradrenalina (NA)  $170 \times 10^{-9}$  M . \* = significativo  $p < 0,05$  pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. Valores expressos estatisticamente em forma de média +/- EP.

A figura 6 ilustra o perfil de produção de IL-4 por granulócitos humanos, estimulados de formas diferentes, como aconteceu para o teste de fagocitose e produção de óxido nítrico. Nossos resultados mostraram que houve um aumento estatisticamente significativo na produção de IL-4 (medida em pg/mL) pelos granulócitos, quando os mesmos foram estimulados por noradrenalina, quando comparados ao grupo controle (granulócitos + RPMI). Porém, não foi observado diferença significativa na produção de interleucina-4, quando os granulócitos foram incubados com ácido caféico em relação ao mesmo grupo controle.

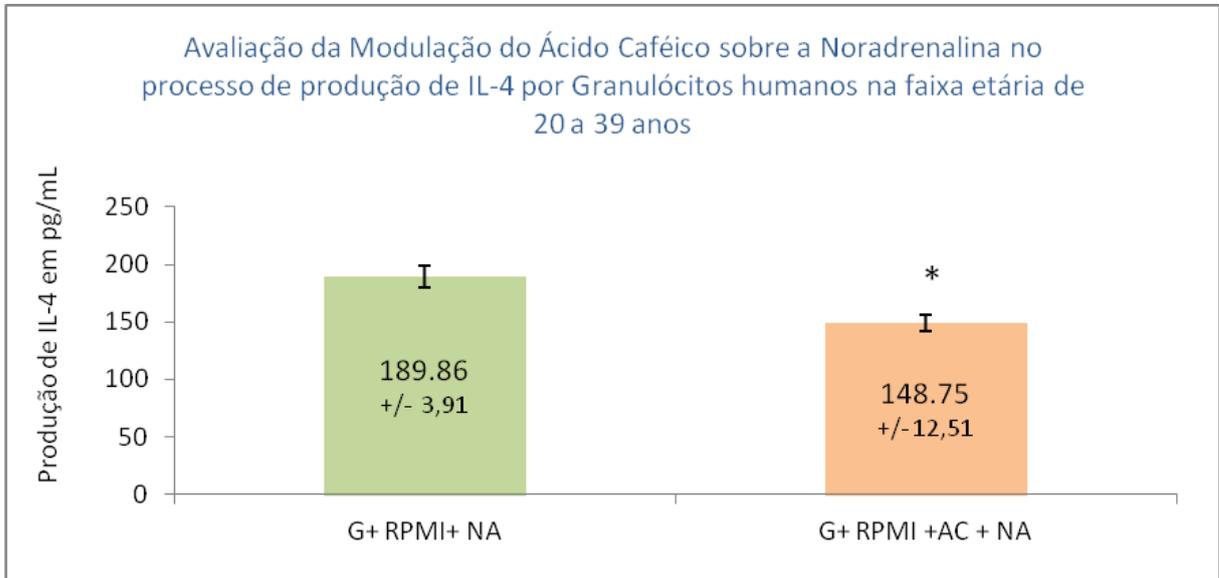
**Figura 6** – Avaliação da produção de IL-4 por granulócitos humanos estimulados por Ácido Caféico e Noradrenalina na faixa etária de 20-39 anos.



N.S. = não significativo  $p > 0,05$  pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney quando comparado ao grupo controle (G +RPMI). G+RPMI = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  meio de cultura (RPMI) (em estado basal). G+RPMI +AC = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Ácido Cafáico (AC) 500uM. G+ RPMI + NA = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Noradrenalina (NA)  $170 \times 10^{-9}$  M. Valores expressos estatisticamente em forma de média +/- EP.

A figura 7 ilustra o perfil de produção de IL-4 por granulócitos humanos quando o objetivo foi avaliar a modulação do ácido cafáico sobre a ação desempenhada pela noradrenalina, dentro do processo de produção da interleucina-4, no grupo de 20-39 anos. Nossos resultados demonstraram que houve diferença significativa da capacidade de produção da IL-4 quando o ácido cafáico é incubado com a noradrenalina, quando comparado aos granulócitos estimulados isoladamente pela catecolamina em questão. Ou seja, o ácido cafáico foi capaz de modular a atividade da noradrenalina, **diminuindo a produção de IL-4, em 22%**.

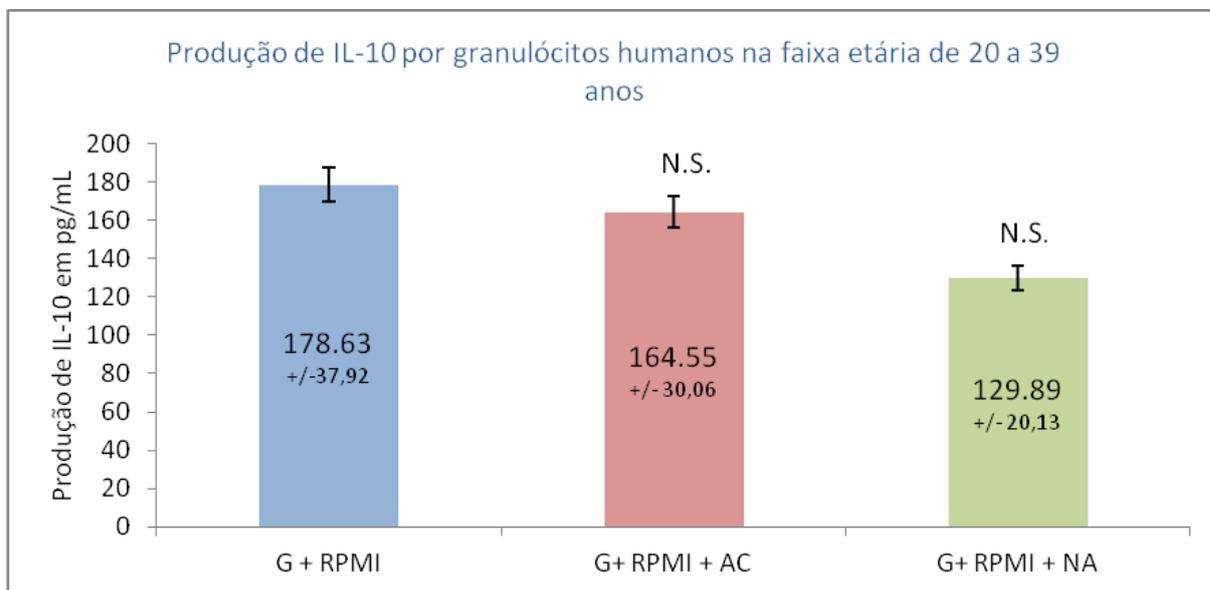
**Figura 7** – Avaliação da modulação do ácido caféico sobre a noradrenalina no processo de produção da IL-4, por granulócitos humanos na faixa etária de 20-39 anos.



G+RPMI + NA = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Noradrenalina (NA)  $170 \times 10^{-9}$  M . G+RPMI +AC+NA = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Ácido Caféico (AC) 500uM e Noradrenalina (NA)  $170 \times 10^{-9}$  M. \* = significativo  $p < 0,05$  pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. Valores expressos estatisticamente em forma de média +/- EP.

A figura 8 ilustra o perfil de produção de IL-10 por granulócitos humanos. Nossos resultados mostraram que não houve diferença significativa na produção de IL-10 (medida em pg/mL) pelos granulócitos, quando os mesmos foram estimulados por noradrenalina na concentração em uso ou por ácido caféico; ambos comparados ao grupo controle (granulócitos + RPMI).

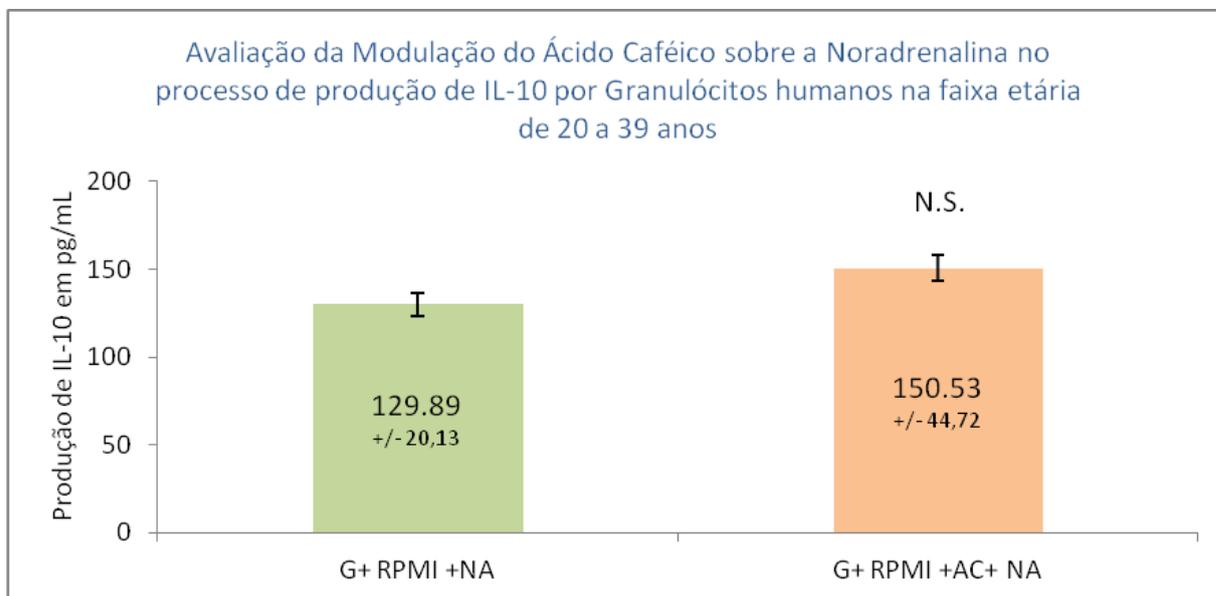
**Figura 8** – Avaliação da produção de IL-10 por granulócitos humanos estimulados por ácido caféico e noradrenalina na faixa etária de 20-39 anos.



N.S. = não significativo  $p > 0,05$  pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney quando comparado ao grupo controle (G +RPMI). G+RPMI = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  meio de cultura (RPMI) (em estado basal). G+RPMI +AC = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Ácido Caféico (AC) 500uM. G+ RPMI + NA = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Noradrenalina (NA)  $170 \times 10^{-9}$  M. Valores expressos estatisticamente em forma de média +/- EP.

A figura 9 ilustra o perfil de produção de IL-10 por granulócitos humanos, objetivando avaliar a modulação do ácido caféico sobre a ação desempenhada pela noradrenalina na produção desta interleucina. Nossos resultados demonstraram que não houve diferença significativa da capacidade de produção de IL-10 quando o ácido caféico é incubado com a noradrenalina.

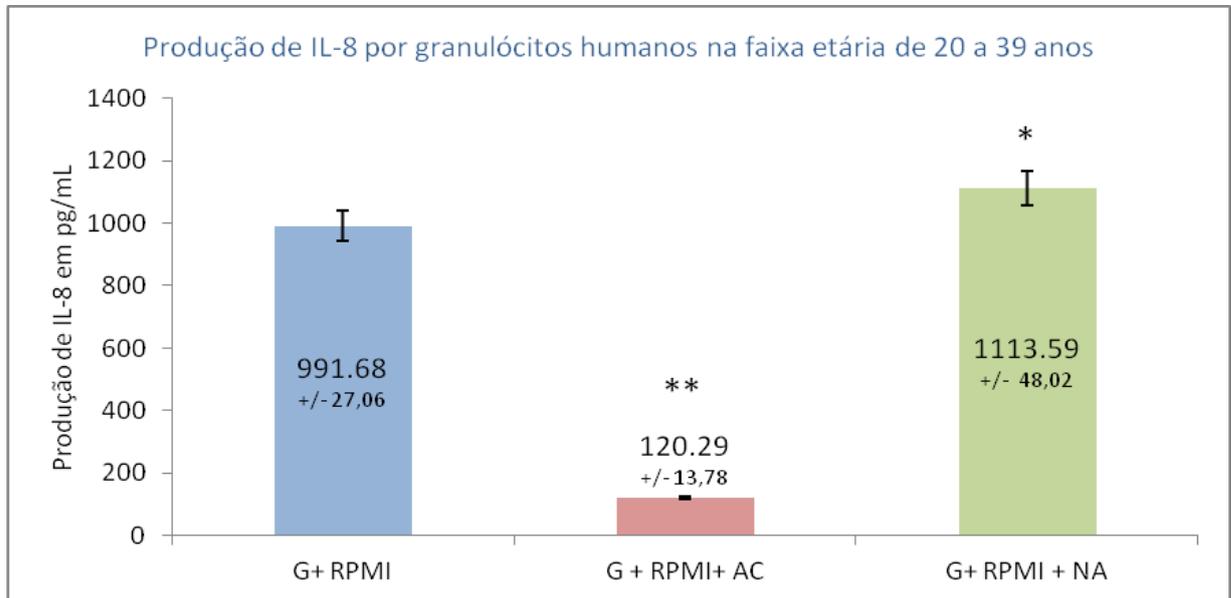
**Figura 9** – Avaliação da modulação do ácido caféico sobre a noradrenalina no processo de produção de IL-10, por granulócitos humanos na faixa etária de 20-39 anos.



G+RPMI + NA = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Noradrenalina (NA)  $170 \times 10^{-9}$  M. G+RPMI +AC+NA = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Ácido Caféico (AC) 500uM e Noradrenalina (NA)  $170 \times 10^{-9}$  M . N.S. = não significativo  $p > 0,05$  pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. Valores expressos estatisticamente em forma de média +/- EP.

A figura 10 fornece o perfil de produção de IL-8 por granulócitos humanos incubados sob estimulações distintas como relatado até o momento. Nossos resultados mostraram que houve diferença estatisticamente significativa na produção de IL-8 (medida em pg/mL) pelos granulócitos, quando os mesmos foram estimulados por ácido caféico quando comparados ao grupo controle (granulócitos + RPMI). **A produção de IL-8 na estimulação dos granulócitos com ácido caféico diminuiu 88%**. Ao contrário do que foi relatado pela estimulação com o ácido fenólico em questão, observamos também, que a incubação desses mesmos granulócitos com noradrenalina, apresentou diferença estatisticamente significativa quando comparada ao controle; onde temos, uma **ativação de 12%** na produção dessa citocina pró-inflamatória.

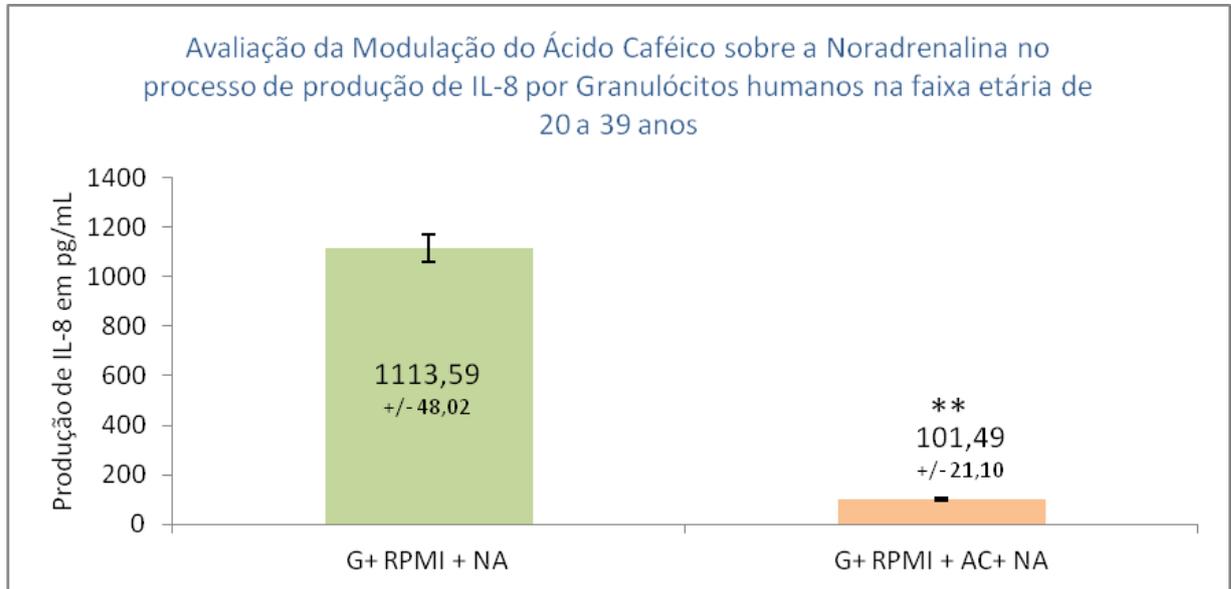
**Figura 10** – Avaliação da produção de IL-8 por granulócitos humanos estimulados por ácido caféico e noradrenalina na faixa etária de 20-39 anos.



\* = significativo  $p < 0,05$  pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney quando comparado ao grupo controle (G +RPMI) \*\* = significativo  $p < 0,01$  pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney quando comparado ao grupo controle (G +RPMI) G+RPMI = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  + meio de cultura (RPMI) (em estado basal). G+RPMI +AC = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Ácido Caféico (AC) 500uM. G+RPMI + NA = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Noradrenalina (NA)  $170 \times 10^{-9}$  M. Valores expressos estatisticamente em forma de média +/- EP

A figura 11 ilustra o perfil de produção da IL-8 por granulócitos humanos quando o objetivo foi avaliar a modulação do ácido caféico sobre a ação desempenhada pela noradrenalina, dentro do processo de produção de interleucina-8, no grupo de 20-39 anos. Nossos resultados demonstraram que houve diferença significativa da capacidade de produção de IL-8 quando o ácido caféico é incubado com a noradrenalina. Tal ácido, modula negativamente a ação da noradrenalina, **diminuindo em 91%** a produção da citocina pró-inflamatória IL-8.

**Figura 11** – Avaliação da modulação do ácido caféico sobre a noradrenalina no processo de produção de IL-8, por granulócitos humanos na faixa etária de 20-39 anos.



G+RPMI + NA = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Noradrenalina (NA)  $170 \times 10^{-9}$  M. G+RPMI +AC+NA = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Ácido Caféico (AC) 500uM e Noradrenalina (NA)  $170 \times 10^{-9}$  M. \*\* = significativo  $p < 0,01$  pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. Valores expressos estatisticamente em forma de média +/- EP.

#### 4.1.2 Faixa etária de 40 a 59 anos

A tabela 7 ilustra o perfil fagocítico dos granulócitos humanos incubados de 3 (três) formas diferentes, a saber: em estado basal; estimulados com ácido caféico e por último, estimulados com noradrenalina (essas três maneiras de incubação são as mesmas da faixa etária anterior, e irá se repetir ao longo de todos os testes realizados). Todos esses, na faixa etária de 40 a 59 anos. Nossos resultados mostraram que houve um aumento da capacidade de fagocitose dessas células de defesa, quando as mesmas foram estimuladas por noradrenalina, quando comparadas ao grupo controle (granulócitos em estado basal). A **ativação foi de 34%**; entretanto, não foram observadas alterações quando os granulócitos foram incubados com ácido caféico.

**Tabela 7:** Comparação da porcentagem de fagocitose em granulócitos humanos estimulados com ácido caféico e noradrenalina na faixa etária de 40-59 anos.

Faixa Etária: 40-59 anos	Fagocitose (MÉDIA <sup>+/-</sup> EP)	% Ativação	% Inibição
G + ZC3b	51,63 +/- 4,11	-	-
G + AC + ZC3b	46,00 +/- 6,76	-	-
G + NA + ZC3b	69,38 +/- 2,20 *	34	-

\* = significativo  $p < 0,05$  pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney quando comparado ao grupo controle (G +ZC3b) G+ZC3b = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Zimozam opsonizado (ZC3b). G+AC+ZC3b = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Ácido Caféico (AC) 500uM e Zimosan opsonizado (ZC3b). G+ NA + ZC3b = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Noradrenalina (NA)  $170 \times 10^{-9}$  M e Zimosan opsonizado (ZC3b).

A tabela 8 mostra o perfil fagocítico dos granulócitos humanos quando o objetivo foi avaliar a modulação do ácido caféico sobre a ação desempenhada pela

noradrenalina dentro do processo de fagocitose. Nossos resultados demonstraram que quando tal ácido foi incubado com a NA houve uma **inibição de 20%** da capacidade fagocítica desempenhada pelos granulócitos.

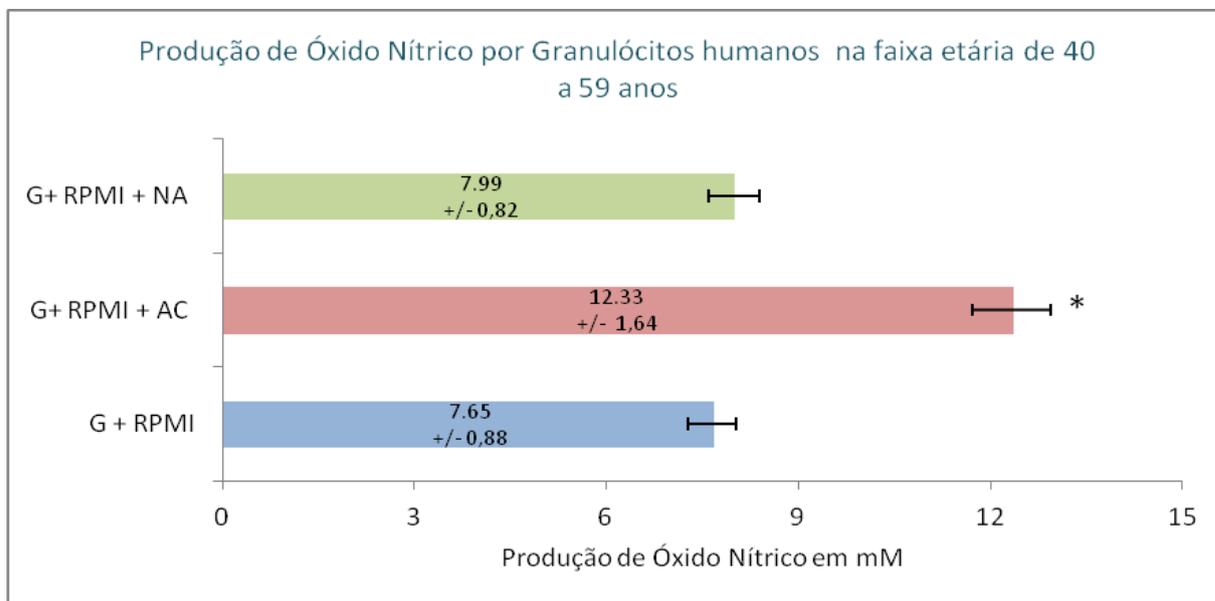
**Tabela 8:** Avaliação da Modulação do ácido caféico sobre a noradrenalina no processo de fagocitose, em granulócitos humanos na faixa etária de 40 a 59 anos.

Faixa Etária: 40-59 anos	Fagocitose (MÉDIA <sup>+/-</sup> EP)	% Ativação	% Inibição
G + NA + ZC3b	69,38 +/- 2,20	-	-
G + AC +NA +ZC3b	55,5 +/- 5,83 *	-	20

\* = significativo  $p < 0,05$  pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney quando comparado ao grupo controle (G +NA+ZC3b) G+ NA + ZC3b = Granulócitos(G) $1 \times 10^6$  estimulados com Noradrenalina (NA) $170 \times 10^{-9}$ M e Zimosan opsonizado (ZC3b).G+AC+NA+ZC3b = Granulócitos (G) $1 \times 10^6$  estimulados com Ácido Caféico (AC) 500uM , Noradrenalina (NA)  $170 \times 10^{-9}$  M e Zimosan opsonizado (ZC3b).

A figura 12 demonstra o perfil de produção de óxido nítrico por granulócitos humanos incubados das três formas já mencionadas. Nossos resultados mostraram que houve um aumento estatisticamente significativo na produção de óxido nítrico (medido em mM) por essas células de defesa, quando as mesmas foram estimuladas por ácido caféico, quando comparadas ao grupo controle (granulócitos + RPMI). Já quando analisamos os granulócitos estimulados com noradrenalina, não se percebeu diferença significativa em relação ao controle.

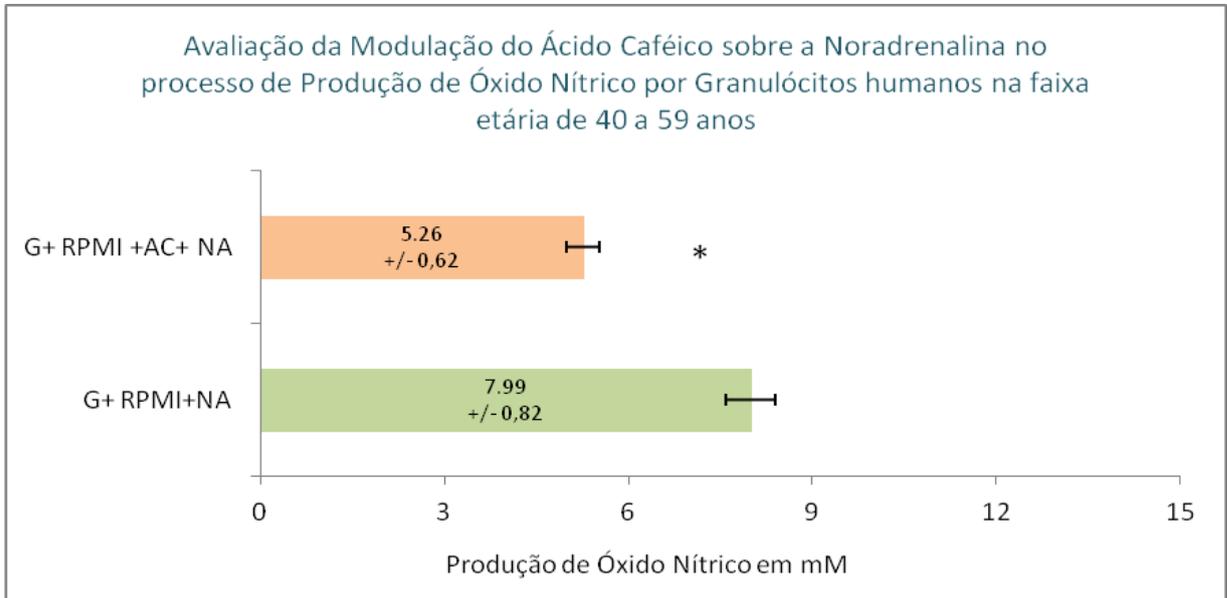
**Figura 12** – Comparação da produção de óxido nítrico por granulócitos humanos estimulados com ácido Caféico e noradrenalina na faixa etária de 40-59 anos.



\* = significativo  $p < 0,05$  pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney quando comparado ao grupo controle (G +RPMI) G+RPMI = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  + meio de cultura (RPMI) [em estado basal]. G+RPMI +AC = Granulócitos (G) $1 \times 10^6$  estimulados com Ácido Caféico (AC) 500uM. G+ RPMI + NA = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Noradrenalina (NA)  $170 \times 10^{-9}$  M. Valores expressos estatisticamente em forma de média +/- EP.

A figura 13 ilustra o perfil de produção de óxido nítrico por granulócitos humanos com o objetivo de avaliar a modulação do ácido caféico sobre a ação da noradrenalina, na produção deste neuroprotetor. Nossos resultados demonstraram que houve diferença significativa da capacidade de produção de NO quando o ácido caféico foi incubado com a noradrenalina. Ou seja, o ácido caféico modulou negativamente a geração de NO, ocorrendo portanto, uma **diminuição a produção de óxido nítrico em 34%**.

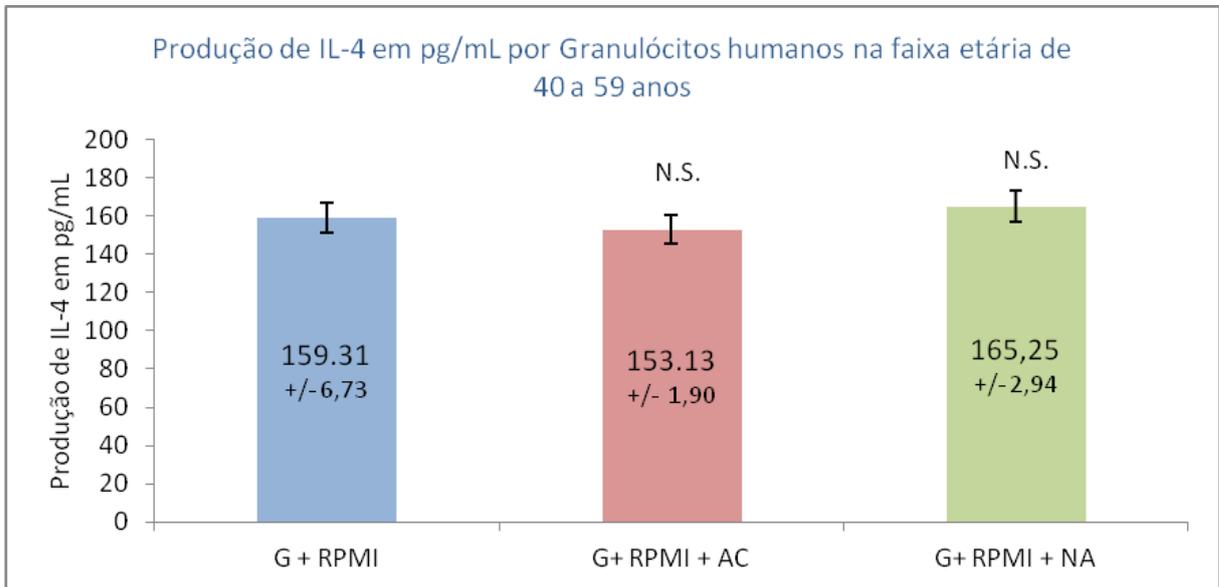
**Figura 13** – Avaliação da modulação do ácido caféico sobre a noradrenalina no processo de produção de óxido nítrico por granulócitos humanos na faixa etária de 40-59 anos.



G+RPMI + NA = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Noradrenalina (NA)  $170 \times 10^{-9}$  M . G+RPMI +AC+NA = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Ácido Caféico (AC) 500uM e Noradrenalina (NA)  $170 \times 10^{-9}$  M . \* = significativo  $p < 0,05$  pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. Valores expressos estatisticamente em forma de média +/- EP.

A figura 14 ilustra o perfil de produção da IL-4 por granulócitos humanos. Nossos resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa na produção de IL-4 (medida em pg/mL) pelos granulócitos, quando os mesmos foram estimulados por noradrenalina, quando comparadas ao grupo controle (granulócitos + RPMI). Também, não encontramos nenhuma alteração na produção dessa citocina anti-inflamatória, ao estimular os granulócitos com ácido caféico.

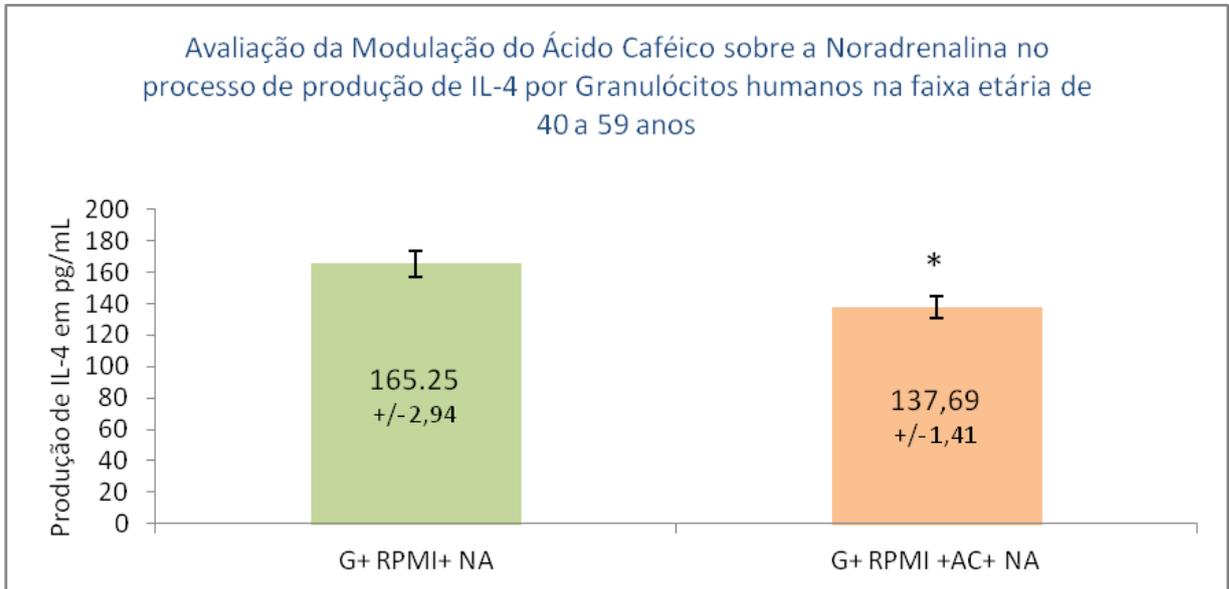
**Figura 14** – Avaliação da produção de IL-4 por granulócitos humanos estimulados por ácido caféico e noradrenalina na faixa etária de 40-59 anos.



N.S. = não significativo  $p > 0,05$  pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney quando comparado ao grupo controle (G +RPMI) G+RPMI = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  meio de cultura (RPMI) [em estado basal]. G+RPMI +AC = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Ácido Caféico (AC) 500uM. G+ RPMI + NA = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Noradrenalina (NA)  $170 \times 10^{-9}$ M. Valores expressos estatisticamente em forma de média +/- EP.

A figura 15 ilustra o perfil de produção de IL-4 por granulócitos humanos quando o objetivo é avaliar a modulação do ácido caféico sobre a ação da noradrenalina na produção de interleucina-4. Nossos resultados demonstraram que houve diferença significativa da capacidade produtiva de IL-4 quando o ácido caféico foi incubado com a noradrenalina. Ou seja, o ácido caféico foi capaz de modular a atividade da noradrenalina, **diminuindo a produção de IL-4, em 17%.**

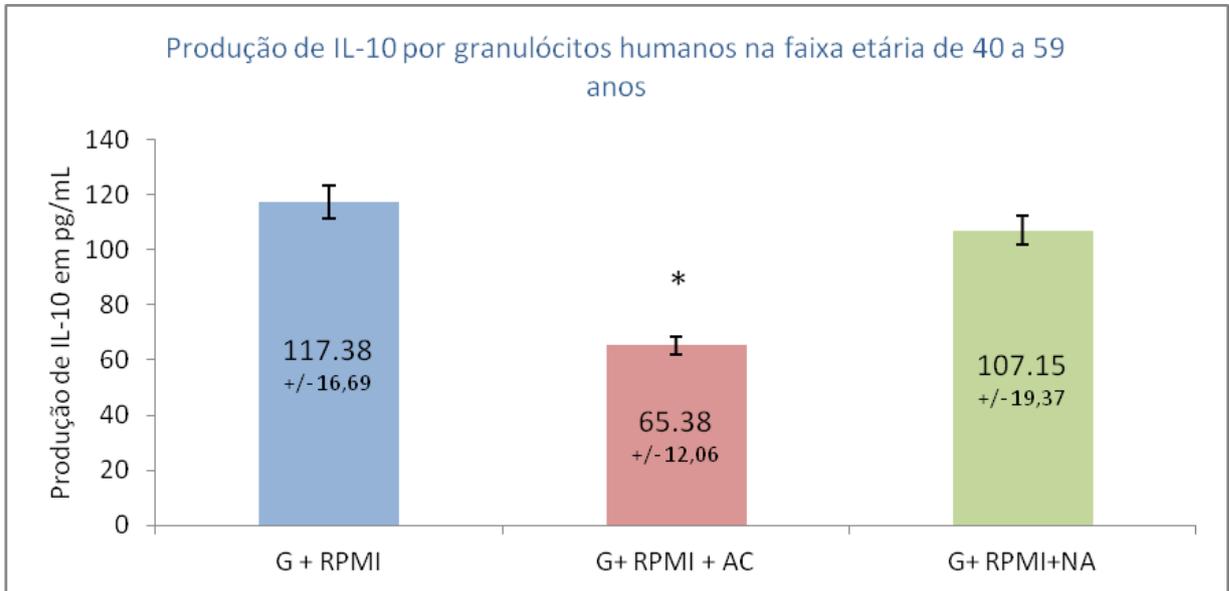
**Figura 15** – Avaliação da modulação do ácido caféico sobre a noradrenalina no processo de expressão de IL-4, por granulócitos humanos na faixa etária de 40-59 anos.



G+RPMI + NA = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Noradrenalina (NA)  $170 \times 10^{-9}$  M. G+RPMI +AC+NA = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Ácido Caféico (AC) 500uM e Noradrenalina (NA)  $170 \times 10^{-9}$  M. \* = significativo  $p < 0,05$  pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. Valores expressos estatisticamente em forma de média +/- EP.

A figura 16 ilustra o perfil de produção de IL-10 por granulócitos humanos. Nossos resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa na produção de IL-10 (medida em pg/mL) pelos granulócitos, quando os mesmos foram estimulados por noradrenalina, quando comparadas ao grupo controle (granulócitos + RPMI). Porém, observamos diferença significativa na produção de interleucina-10, quando os granulócitos foram incubados com ácido caféico, em relação ao grupo controle. Percebendo-se uma **inibição na produção de IL-10 de 44%**.

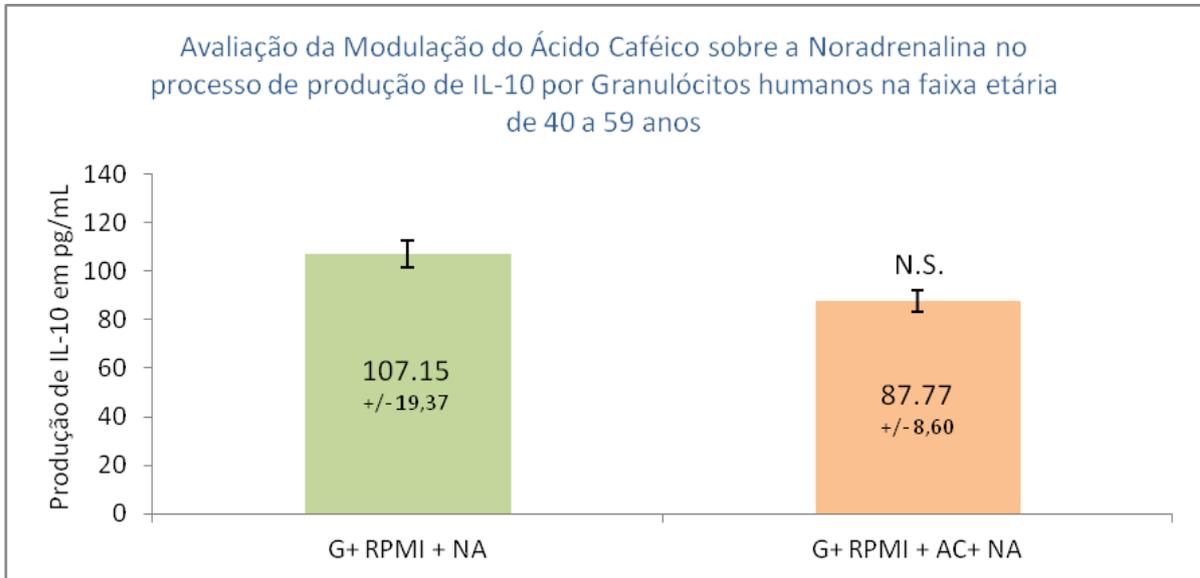
**Figura 16** – Avaliação da produção de IL-10 por granulócitos humanos estimulados por ácido caféico e noradrenalina na faixa etária de 40-59 anos.



\* = significativo  $p < 0,05$  pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney quando comparado ao grupo controle (G +RPMI) G+RPMI = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  + meio de cultura (RPMI) [em estado basal]. G+RPMI +AC = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Ácido Caféico (AC) 500uM. G+ RPMI + NA = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Noradrenalina (NA)  $170 \times 10^{-9}$  M. Valores expressos estatisticamente em forma de média +/- EP.

A figura 17 ilustra o perfil de produção de IL-10 por granulócitos humanos quando o objetivo foi avaliar a modulação do ácido caféico sobre a ação da noradrenalina, na produção de interleucina-10. Nossos resultados demonstraram que o ácido caféico não foi capaz de modular a ação da noradrenalina nessa faixa etária.

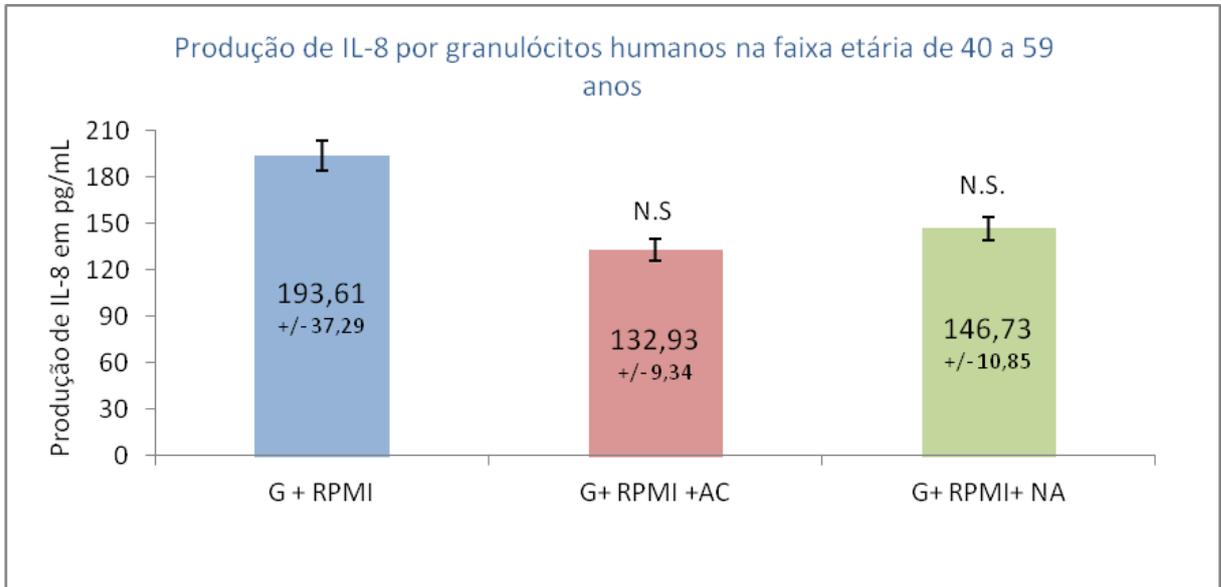
**Figura 17** – Avaliação da modulação do ácido caféico sobre a noradrenalina na produção de IL-10, por granulócitos humanos na faixa etária de 40-59 anos.



G+RPMI + NA = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Noradrenalina (NA)  $170 \times 10^{-9}$  M. G+RPMI +AC+NA = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Ácido Caféico (AC) 500uM e Noradrenalina (NA)  $170 \times 10^{-9}$  M. N.S. = não significativo  $p > 0,05$  pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. Valores expressos estatisticamente em forma de média +/- EP.

A figura 18 mostra o perfil de produção de IL-8 por granulócitos humanos incubados das três formas já citadas anteriormente. Nossos resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa na produção de IL-8 (medida em pg/mL) pelos granulócitos, quando os mesmos foram estimulados por ácido caféico, ou por noradrenalina.

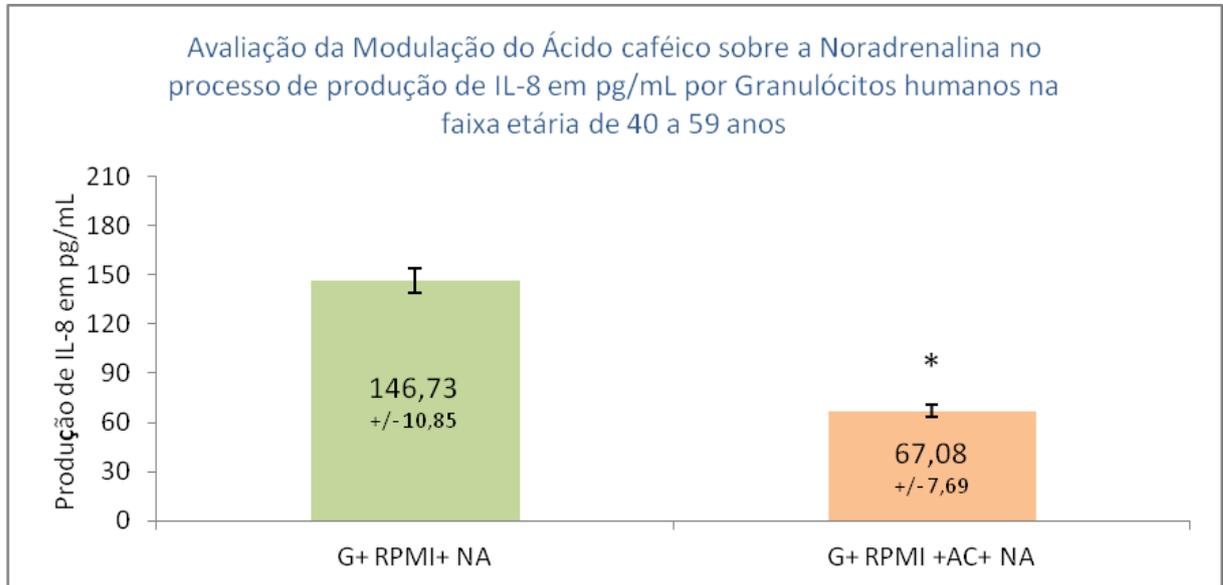
**Figura 18** – Avaliação da produção de IL-8 por granulócitos humanos estimulados por ácido caféico e noradrenalina na faixa etária de 40-59 anos.



N.S. = não significativo  $p > 0,05$  pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney quando comparado ao grupo controle (G + RPMI). G + RPMI = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  meio de cultura (RPMI) [em estado basal]. G + RPMI + AC = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Ácido Caféico (AC) 500uM. G + RPMI + NA = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Noradrenalina (NA)  $170 \times 10^{-9}$  M. Valores expressos estatisticamente em forma de média +/- EP.

A figura 19 ilustra o perfil de produção de IL-8 por granulócitos humanos objetivando avaliar a modulação do ácido caféico sobre a ação da noradrenalina na produção de interleucina-8. Nossos resultados demonstraram que houve diferença significativa da capacidade produtiva de IL-8, quando o ácido caféico é incubado com a noradrenalina. Tal ácido modula negativamente a ação dessa catecolamina. **Diminuindo em 54%**, a produção da citocina pró-inflamatória IL-8.

**Figura 19** – Avaliação da modulação do ácido caféico sobre a noradrenalina na produção de IL-8 por granulócitos humanos na faixa etária de 40-59 anos.



G+RPMI + NA = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Noradrenalina (NA)  $170 \times 10^{-9}$  M. G+RPMI +AC+NA = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Ácido Caféico (AC) 500uM e Noradrenalina (NA)  $170 \times 10^{-9}$  M. \* = significativo  $p < 0,05$  pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. Valores expressos estatisticamente em forma de média +/- EP.

#### 4.1.3 Faixa etária de 60 a 80 anos

A tabela 9 ilustra o perfil fagocítico dos granulócitos humanos incubados de 3 (três) formas diferentes, a saber: em estado basal; estimulados com ácido caféico e por fim, estimulados com noradrenalina. Todos esses, na faixa etária de 60 a 80 anos. Nossos resultados mostraram que não houve diferença significativa da capacidade de fagocitose dessas células de defesa, quando as mesmas foram estimuladas por noradrenalina ou ácido caféico, quando comparadas ao grupo controle (granulócitos em estado basal).

**Tabela 9:** – Comparação da porcentagem de fagocitose em granulócitos humanos estimulados com ácido caféico e noradrenalina na faixa etária de 60-80 anos.

Faixa Etária: 60-80 anos	Fagocitose (MÉDIA <sup>+/-</sup> EP)	% Ativação	% Inibição
G + ZC3b	67,80 +/- 1,88	-	-
G + AC + ZC3b	72,70 +/- 1,66	-	-
G + NA + ZC3b	70,40 +/- 2,09	-	-

G+ZC3b = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Zimozam opsonizado (ZC3b). G+AC+ZC3b = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Ácido Caféico (AC) 500uM e Zimosan opsonizado (ZC3b). G+ NA + ZC3b = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Noradrenalina (NA)  $170 \times 10^{-9}$  M e Zimosan opsonizado (ZC3b).

A tabela 10 mostra o perfil fagocítico dos granulócitos humanos na avaliação da modulação do ácido caféico sobre a ação da noradrenalina no processo fagocítico, como foi realizado para as faixas etárias anteriores. Nossos resultados demonstraram que houve diferença significativa da capacidade fagocítica quando o ácido caféico foi incubado com a noradrenalina. Ou seja, o ácido caféico foi capaz de modular a atividade da noradrenalina, **diminuindo em 6%** a capacidade de fagocitose dos granulócitos.

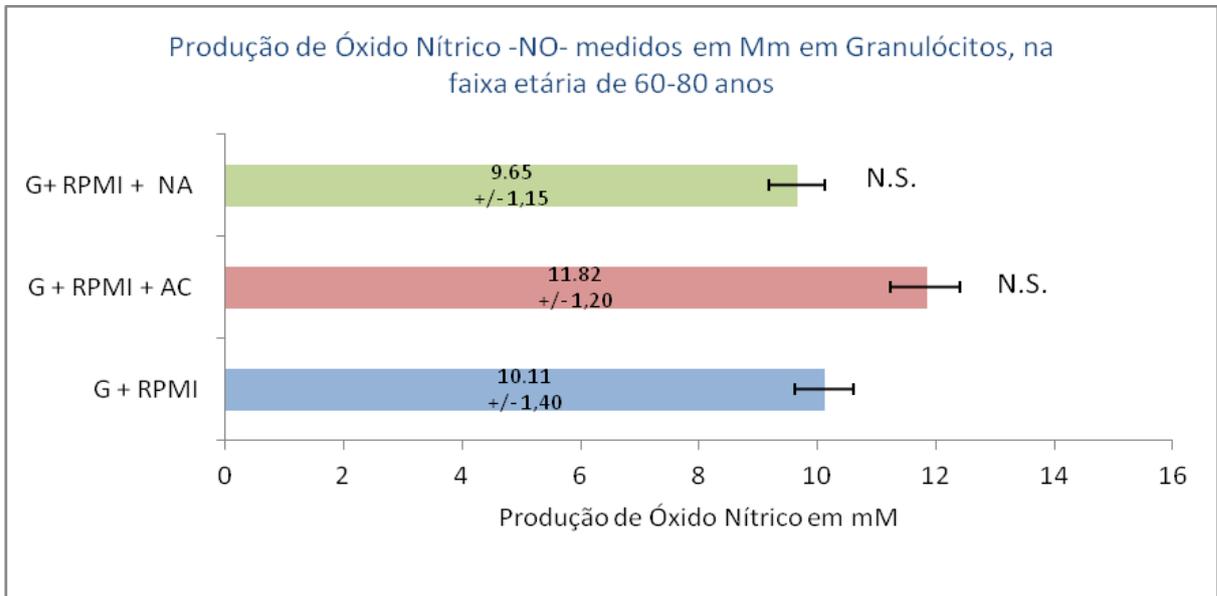
**Tabela 10:** Avaliação da modulação do ácido caféico sobre a noradrenalina no processo de fagocitose, em granulócitos humanos na faixa etária de 60 a 80 anos.

Faixa Etária: 60-80 anos	Fagocitose (MÉDIA <sup>+/-</sup> EP)	% Ativação	% Inibição
G + NA + ZC3b	70,40 +/- 2,09	-	-
G + AC +NA +ZC3b	66,10 +/- 2,22	-	06

G+ NA + ZC3b = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Noradrenalina (NA)  $170 \times 10^{-9}$  M e Zimosan opsonizado (ZC3b). G+AC+NA+ZC3b = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Ácido Caféico (AC) 500uM, Noradrenalina (NA)  $170 \times 10^{-9}$  M e Zimosan opsonizado (ZC3b).

A figura 20 ilustra o perfil de produção de óxido nítrico por granulócitos humanos estimulados igualmente como na fagocitose (em estado basal; estimulados com ácido caféico e por fim, estimulados com noradrenalina). Nossos resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa na produção de óxido nítrico (medido em mM) por essas células de defesa, quando as mesmas foram estimuladas tanto por ácido caféico, quanto por noradrenalina.

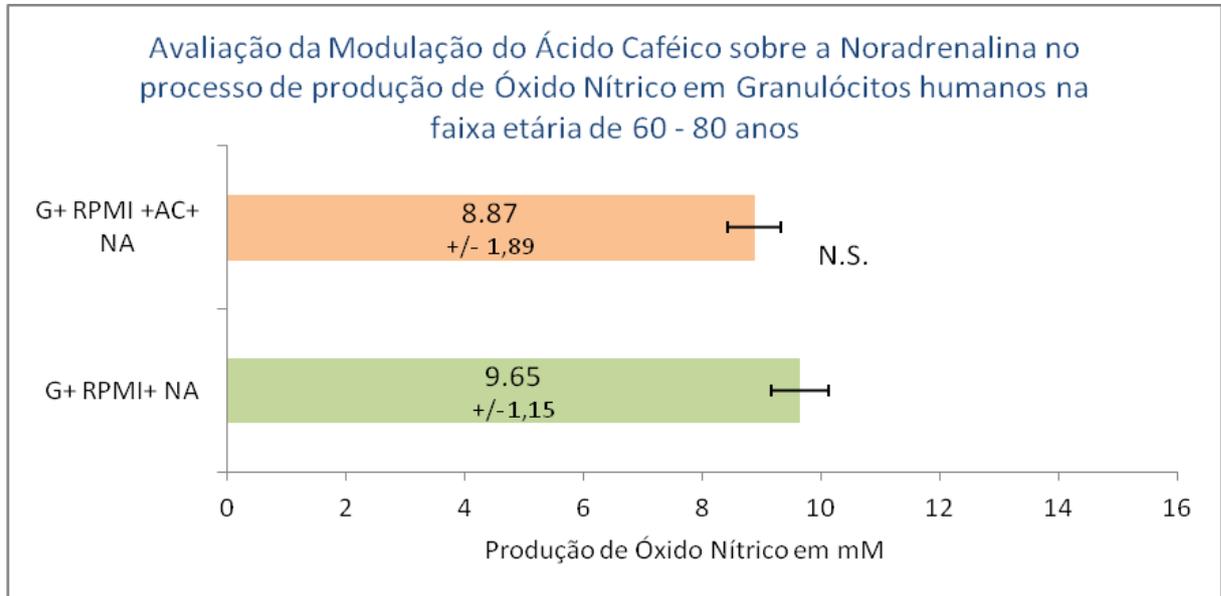
**Figura 20** – Comparação da produção de óxido nítrico por granulócitos humanos na faixa etária de 60-80 anos.



N.S. = não-significativo  $p > 0,05$  pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney quando comparado ao grupo controle (G +RPMI) G+RPMI = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  meio de cultura (RPMI) [em estado basal]. G+RPMI +AC = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Ácido Caféico (AC) 500uM. G+ RPMI + NA = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Noradrenalina (NA)  $170 \times 10^{-9}$  M. Valores expressos estatisticamente em forma de média +/- EP.

A figura 21 ilustra o perfil de produção de óxido nítrico por granulócitos humanos para a avaliação da modulação do ácido caféico sobre a noradrenalina. Nossos resultados demonstraram que não houve diferença significativa da capacidade de produção de NO quando o ácido caféico foi incubado com a noradrenalina. Ou seja, o ácido caféico não demonstrou capacidade efetiva em modular a atividade da noradrenalina.

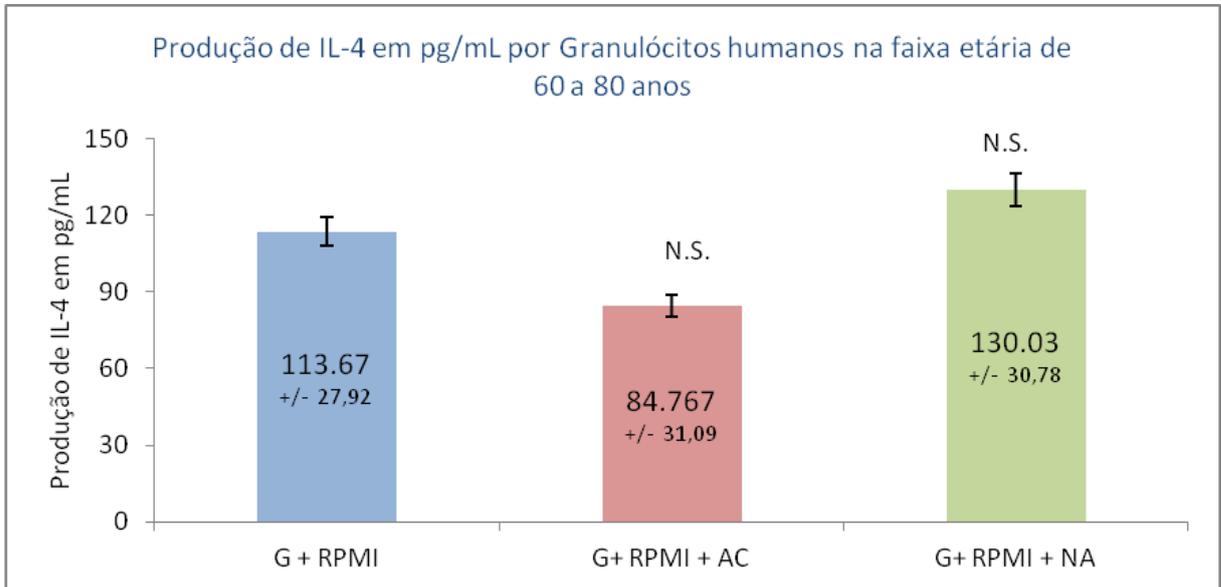
**Figura 21** – Avaliação da modulação do ácido caféico sobre a noradrenalina no processo de produção de óxido nítrico por granulócitos humanos na faixa etária de 60-80 anos.



G+RPMI + NA = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Noradrenalina (NA)  $170 \times 10^{-9}$  M. G+RPMI +AC+NA = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Ácido Caféico (AC) 500uM e Noradrenalina (NA)  $170 \times 10^{-9}$  M. N.S. = não significativo  $p > 0,05$  pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. Valores expressos estatisticamente em forma de média +/- EP.

A figura 22 ilustra o perfil de produção da IL-4 por granulócitos humanos incubados com os 3 (três) protocolos de referência. Nossos resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa na produção de IL-4 (medida em pg/mL) pelos granulócitos, quando os mesmos foram estimulados por noradrenalina, quando comparados ao grupo controle (granulócitos + RPMI). Também, não foi observada diferença significativa na produção de interleucina-4, quando os granulócitos foram incubados com ácido caféico em relação ao grupo controle.

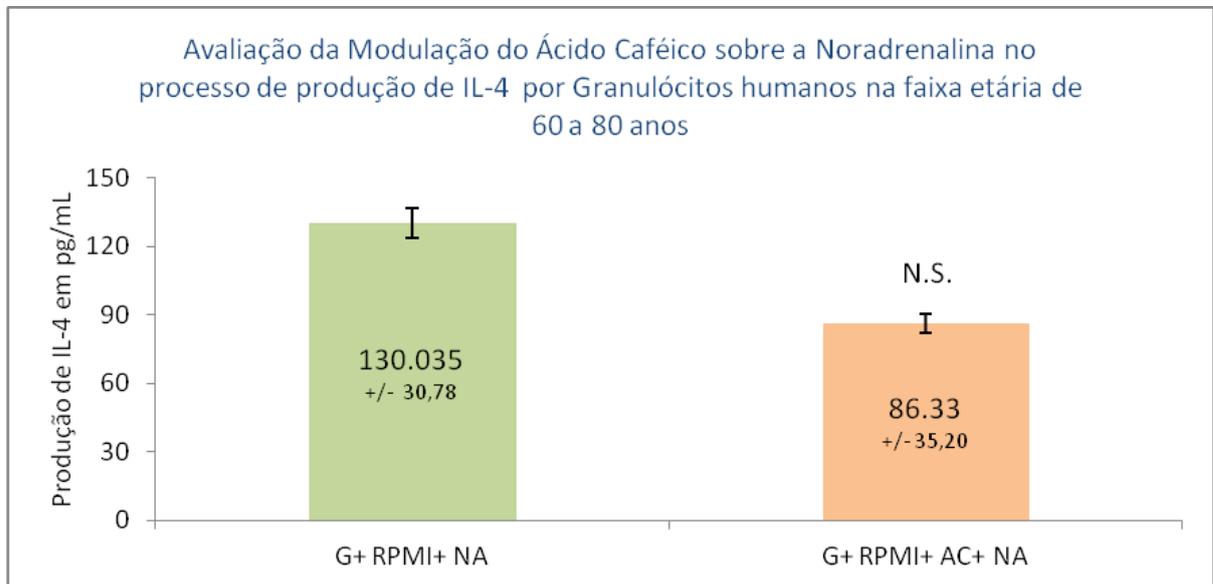
**Figura 22** – Avaliação da produção de IL-4 por granulócitos humanos estimulados por ácido caféico e noradrenalina na faixa etária de 60-80 anos.



N.S. = não significativo  $p > 0,05$  pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney quando comparado ao grupo controle (G +RPMI) G+RPMI = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  meio de cultura (RPMI) [em estado basal]. G+RPMI +AC = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Ácido Caféico (AC) 500uM. G+ RPMI + NA = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Noradrenalina (NA)  $170 \times 10^{-9}$  M. Valores expressos estatisticamente em forma de média +/- EP

A figura 23 ilustra o perfil de produção de IL-4 por granulócitos humanos para avaliar a modulação do ácido caféico sobre a ação da noradrenalina. Nossos resultados demonstraram que não houve diferença significativa da capacidade de produção de IL-4 quando o ácido caféico é incubado com a noradrenalina.

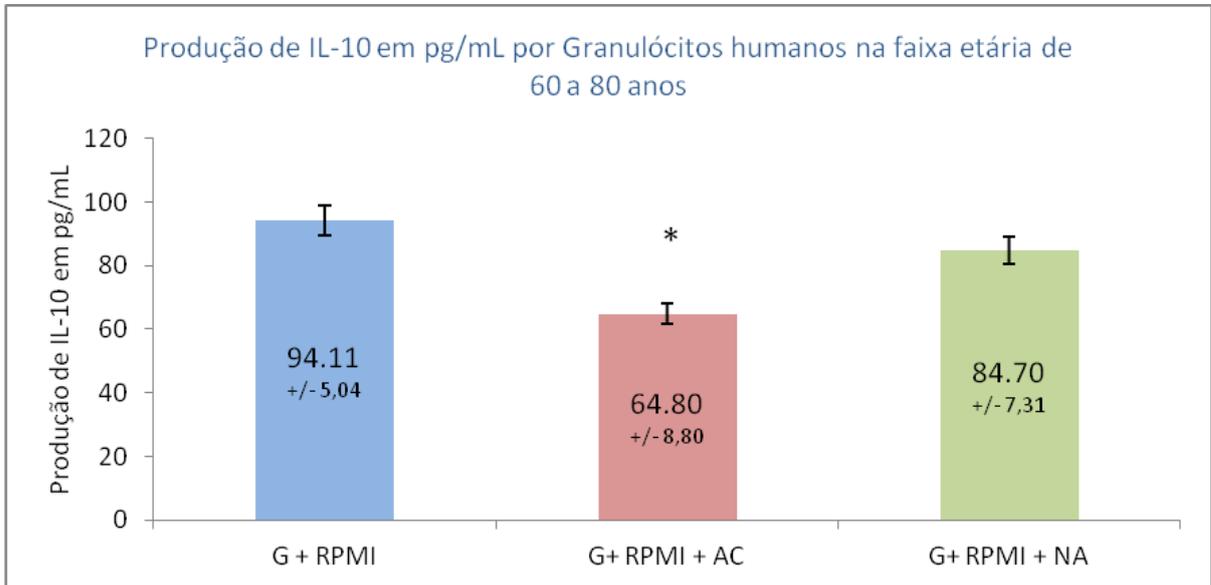
**Figura 23** – Avaliação da modulação do ácido caféico sobre a noradrenalina na produção de IL-4 por granulócitos humanos na faixa etária de 60-80 anos.



G+RPMI + NA = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Noradrenalina (NA)  $170 \times 10^{-9}$  M. G+RPMI +AC+NA = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Ácido Caféico (AC) 500uM e Noradrenalina (NA)  $170 \times 10^{-9}$  M. N.S. = não significativo  $p > 0,05$  pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. Valores expressos estatisticamente em forma de média +/- EP.

A figura 24 ilustra o perfil de produção de IL-10 por granulócitos humanos. Nossos resultados mostraram que houve diferença estatisticamente significativa na produção de IL-10 (medida em pg/mL) pelos granulócitos, quando os mesmos foram estimulados por ácido caféico, quando comparados ao grupo controle (granulócitos + RPMI); percebe-se que houve uma **diminuição de 31%** na produção dessa citocina antiinflamatória. Porém, não foi observada diferença significativa na produção de interleucina-10, quando os granulócitos foram incubados com noradrenalina em relação ao grupo controle.

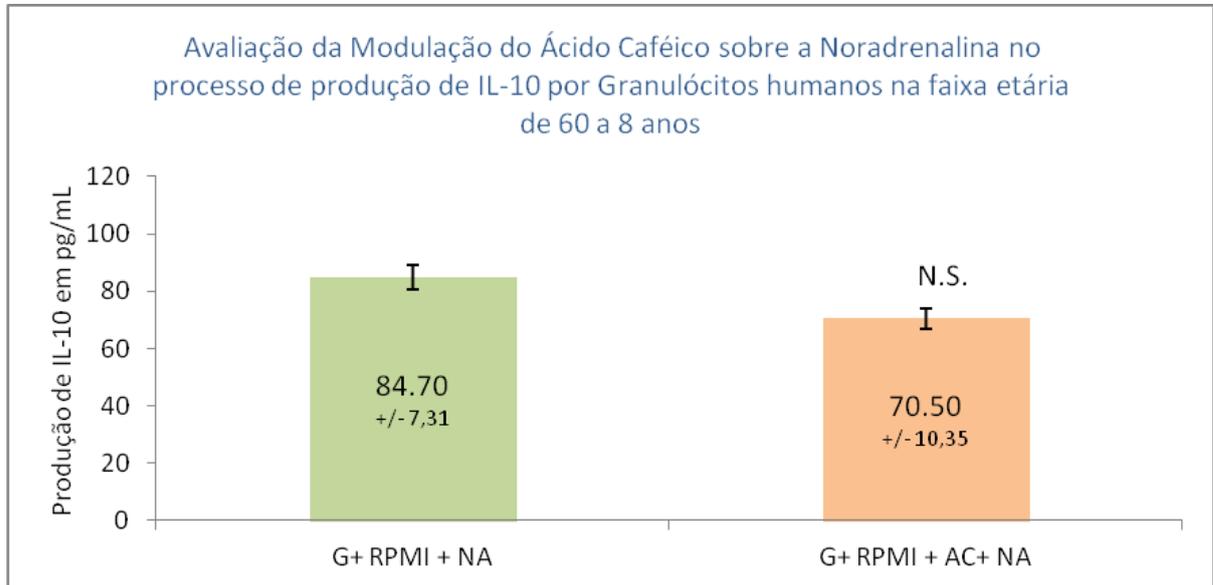
**Figura 24** – Avaliação da produção de IL-10 por granulócitos humanos estimulados por ácido caféico e noradrenalina na faixa etária de 60-80 anos.



\* = significativo  $p < 0,05$  pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney quando comparado ao grupo controle (G +RPMI) G+RPMI = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  + meio de cultura (RPMI) [em estado basal]. G+RPMI +AC = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Ácido Caféico (AC) 500uM. G+ RPMI + NA = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Noradrenalina (NA)  $170 \times 10^{-9}$  M. Valores expressos estatisticamente em forma de média +/- EP

A figura 25 ilustra o perfil de produção de IL-10 por granulócitos humanos quando o objetivo foi avaliar a modulação do ácido caféico sobre a ação da noradrenalina. Nossos resultados demonstraram que não houve diferença significativa da produção de IL-10 quando ambos foram incubados conjuntamente..

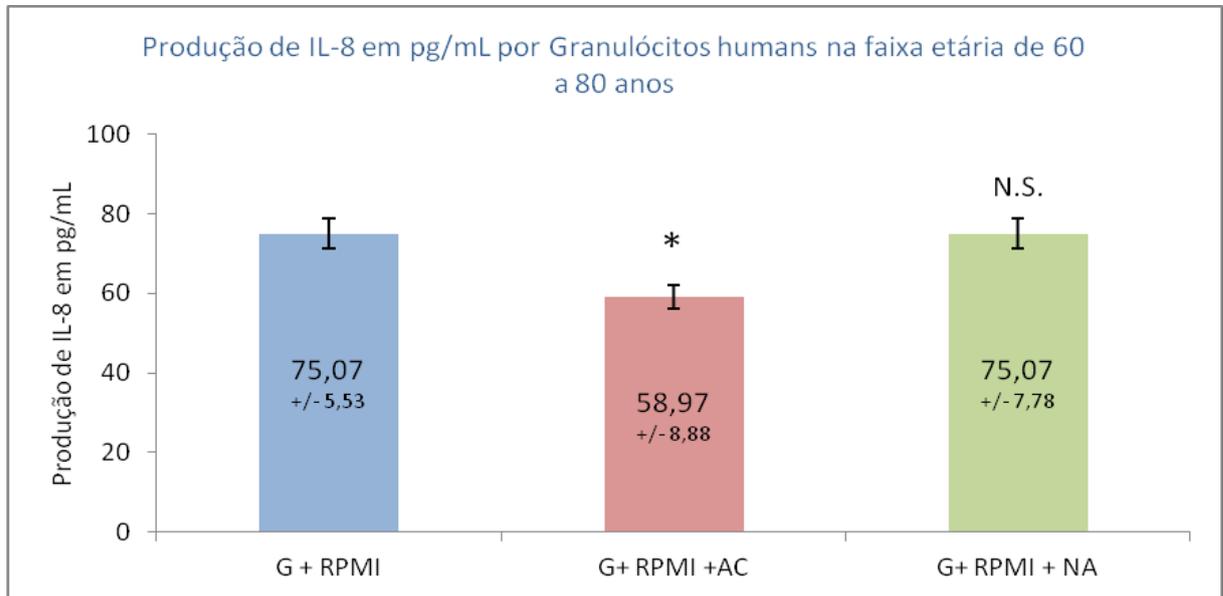
**Figura 25** – Avaliação da modulação do ácido caféico sobre a noradrenalina na de produção de IL-10, por granulócitos humanos na faixa etária de 60-80 anos.



G+RPMI + NA = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Noradrenalina (NA)  $170 \times 10^{-9}$  M. G+RPMI +AC+NA = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Ácido Caféico (AC) 500uM e Noradrenalina (NA)  $170 \times 10^{-9}$  M. N.S. = não significativo  $p > 0,05$  pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. Valores expressos estatisticamente em forma de média +/- EP.

A figura 26 fornece o perfil de produção da IL-8 por granulócitos humanos incubados com ácido caféico e noradrenalina. Nossos resultados mostraram que houve diferença estatisticamente significativa na produção de IL-8 (medida em pg/mL) pelos granulócitos, quando os mesmos foram estimulados por ácido caféico; mas não por noradrenalina, quando comparados ao grupo controle (granulócitos + RPMI).

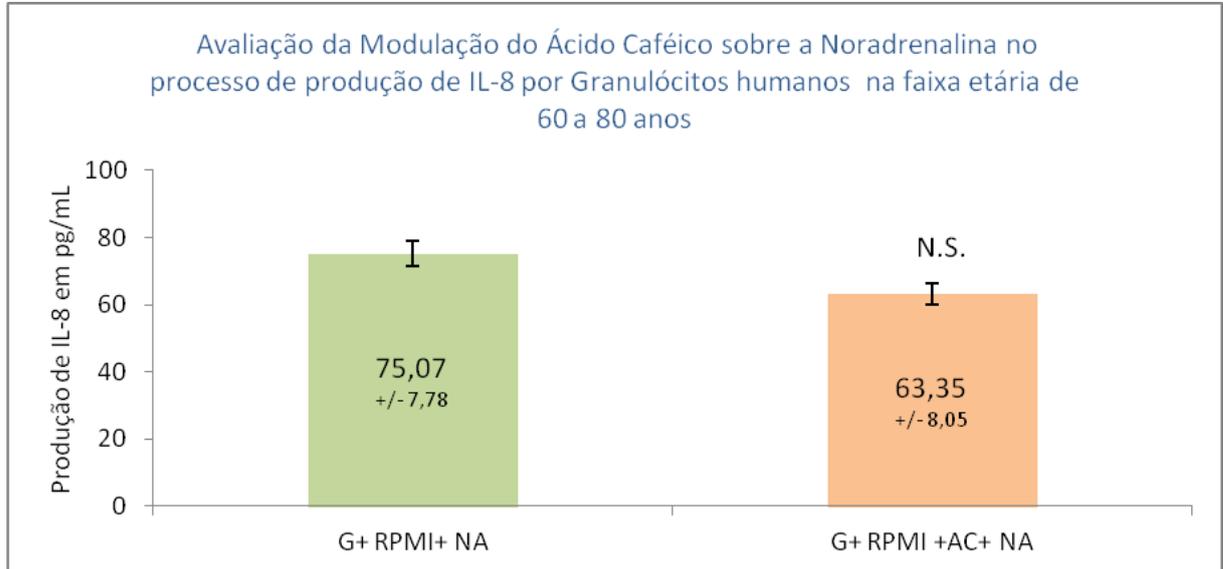
**Figura 26** – Avaliação da produção de IL-8 por granulócitos humanos estimulados por ácido caféico e noradrenalina na faixa etária de 60-80 anos.



N.S. = não significativo  $p > 0,05$  pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney quando comparado ao grupo controle (G +RPMI). G+RPMI = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  + meio de cultura (RPMI) [em estado basal]. \* = significativo  $p > 0,05$  pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney quando comparado ao grupo controle (G +RPMI). G+RPMI +AC = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Ácido Caféico (AC) 500uM. G+ RPMI + NA = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Noradrenalina (NA)  $170 \times 10^{-9}$  M. Valores expressos estatisticamente em forma de média +/- EP.

A figura 27 ilustra o perfil de produção de IL-8 por granulócitos humanos, com objetivo de avaliar a modulação do ácido caféico sobre a ação da noradrenalina. Nossos resultados demonstraram que não houve diferença significativa da capacidade de produção de IL-8 quando o ácido caféico foi incubado com a noradrenalina.

**Figura 27** – Avaliação da modulação do ácido caféico sobre a noradrenalina na produção de IL-8 por granulócitos humanos na faixa etária de 60-80 anos.

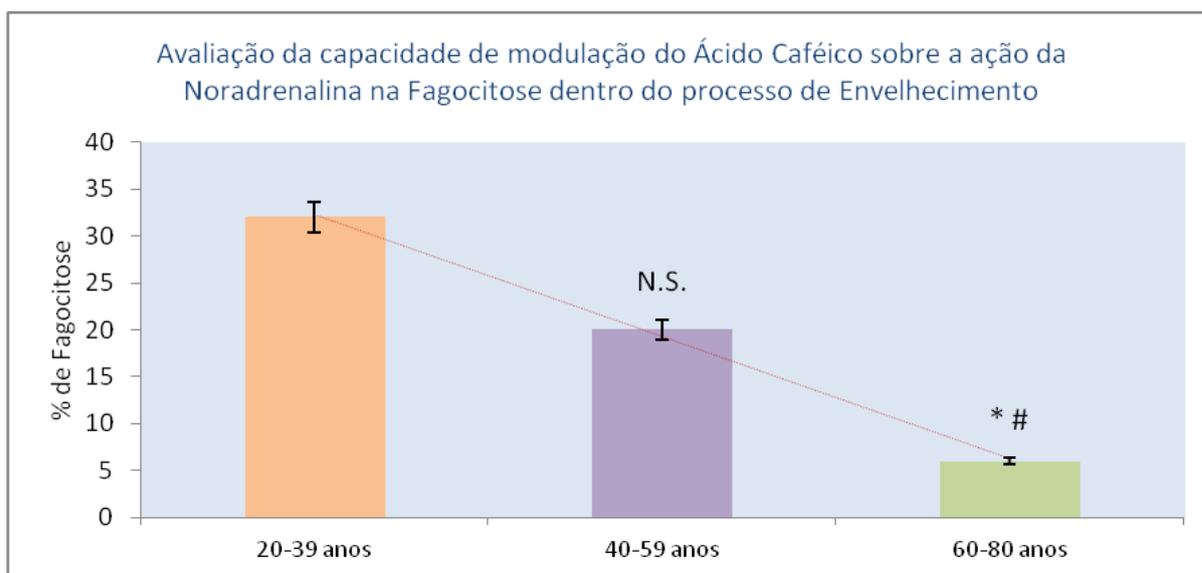


G+RPMI + NA = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Noradrenalina (NA)  $170 \times 10^{-9}$  M. G+RPMI +AC+NA = Granulócitos (G)  $1 \times 10^6$  estimulados com Ácido Caféico (AC) 500uM e Noradrenalina (NA)  $170 \times 10^{-9}$  M. N.S. = não significativo  $p > 0,05$  pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. Valores expressos estatisticamente em forma de média +/- EP.

#### 4.2 Avaliação comparativa do processo de fagocitose por microscopia óptica, geração de óxido nítrico e produção de interleucinas pro e antiinflamatórias por granulócitos humanos, durante o processo de envelhecimento.

A figura 28 ilustra comparativamente a ação moduladora do ácido caféico sobre a noradrenalina dentro do processo fagocítico, durante o envelhecimento. Trata-se de uma comparação entre as três (3) faixas etárias em estudo. Percebe-se claramente uma diminuição da capacidade inibitória do ácido caféico sobre a noradrenalina na fagocitose. Nossos resultados mostraram na faixa de 20-39 anos (32%), 40-59 anos (20%) e 60-80 anos (6%) de inibição do efeito do ácido caféico sobre a noradrenalina em granulócitos humanos.

**Figura 28** – Avaliação comparativa do efeito modulador do ácido caféico sobre a noradrenalina na capacidade fagocítica dos granulócitos humanos durante o processo de envelhecimento.

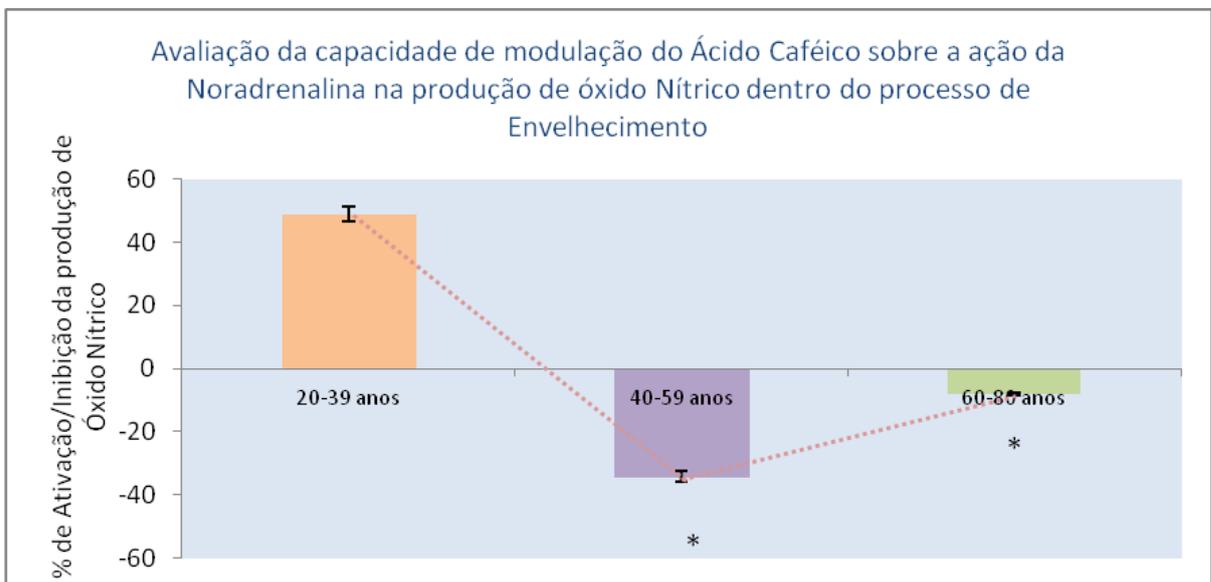


20-39= faixa etária entre 20 e 39 anos; 40-59 = faixa etária entre 40 e 59 anos; 60-80= faixa etária entre 60 e 80 anos. \* = significativo pelo teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, onde  $p < 0,05$  em relação à faixa etária de 20-39 anos. # = significativo pelo teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, onde  $p < 0,05$  em relação à faixa etária de 40-59 anos.

Na figura 29 temos uma ilustração comparativa da ação moduladora do ácido caféico sobre a noradrenalina na produção de óxido nítrico (NO), durante o processo de envelhecimento. Verificamos claramente uma diminuição da ação estimulatória do ácido

caféico sobre a noradrenalina, na produção de NO. Nossos resultados mostraram que ocorreu na faixa de 20-39 anos (**49% ativação**), 40-59 anos (**34% inibição**) e 60-80 anos (**8% inibição**) do efeito do ácido caféico sobre a noradrenalina, em granulócitos humanos.

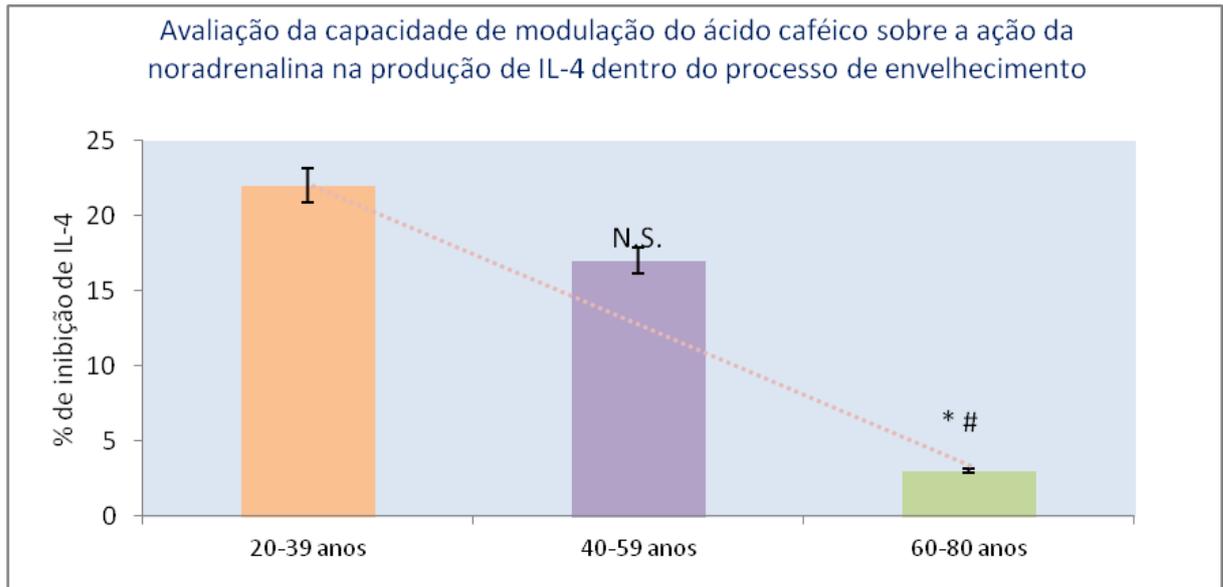
**Figura 29** – Avaliação comparativa do efeito modulador do ácido caféico sobre a noradrenalina sobre a produção de óxido nítrico por granulócitos humanos durante o processo de envelhecimento.



20-39= faixa etária entre 20 e 39 anos; 40-59 = faixa etária entre 40 e 59 anos; 60-80= faixa etária entre 60 e 80 anos. \* = significativo pelo teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, onde  $p < 0,05$  em relação à faixa etária de 20-39 anos.

A figura 30 mostra comparativamente a ação moduladora do ácido caféico sobre a noradrenalina na produção de interleucina-4, durante o processo de envelhecimento. Verificamos uma diminuição da ação inibitória do ácido caféico sobre a NA, na produção da interleucina 4 (IL-4). Nossos resultados mostraram que ocorreu na faixa de 20-39 anos (**22%**), 40-59 anos (**17%**) e 60-80 anos (**3%**) de inibição da ação do ácido caféico sobre a noradrenalina, em granulócitos humanos.

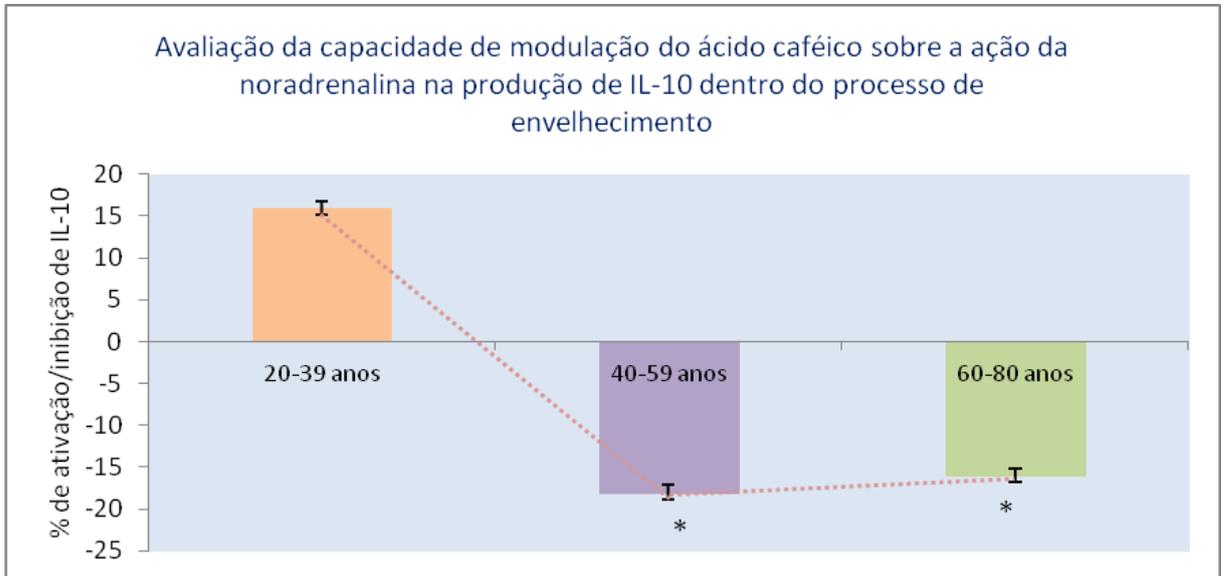
**Figura 30** – Avaliação comparativa do efeito modulador do ácido caféico sobre a noradrenalina sobre a produção de interleucina 4 (IL-4) por granulócitos humanos durante o processo de envelhecimento.



20-39= faixa etária entre 20 e 39 anos; 40-59 = faixa etária entre 40 e 59 anos; 60-80= faixa etária entre 60 e 80 anos. \* = significativo pelo teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, onde  $p < 0,05$  em relação à faixa etária de 20-39 anos. # = significativo pelo teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, onde  $p < 0,05$  em relação à faixa etária de 40-59 anos.

A figura 31 mostra comparativamente a ação moduladora do ácido caféico sobre a noradrenalina na produção de interleucina-10 durante o processo de envelhecimento. Nossos resultados mostraram uma diminuição da ação estimulatória do ácido caféico sobre a NA na produção da IL-10. Nossos resultados mostraram que ocorreu na faixa de 20-39 anos (**16% ativação**), 40-59 anos (**18% de inibição**) e 60-80 anos (**16% de inibição**) do efeito do ácido caféico sobre a noradrenalina, em granulócitos humanos.

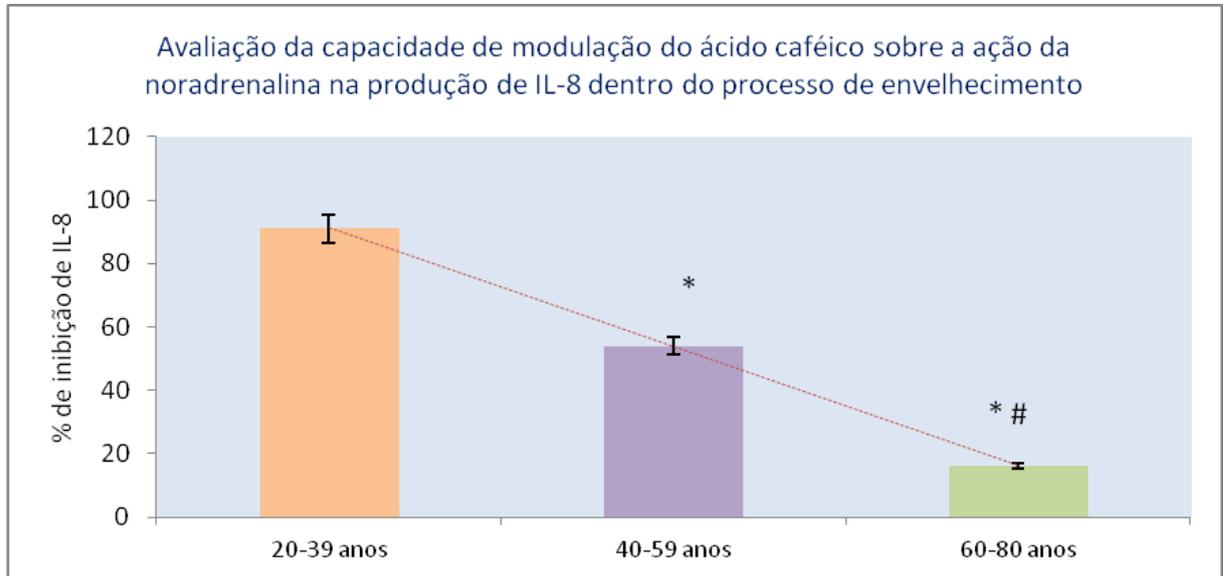
**Figura 31** – Avaliação comparativa do efeito modulador do ácido caféico sobre a noradrenalina sobre a produção de interleucina 10 (IL-10) por granulócitos humanos durante o processo de envelhecimento.



20-39= faixa etária entre 20 e 39 anos; 40-59 = faixa etária entre 40 e 59 anos; 60-80= faixa etária entre 60 e 80 anos. \* = significativo pelo teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, onde  $p < 0,05$  em relação à faixa etária de 20-39 anos.

A figura 32 mostra comparativamente a ação moduladora do ácido caféico sobre a noradrenalina na produção de interleucina-8 durante o processo de envelhecimento. Ocorre uma diminuição da ação inibitória desse ácido, sobre a ação da NA na produção da IL-8. Nossos resultados mostraram que ocorreu na faixa de 20-39 anos (**91%**), 40-59 anos (**54%**) e 60-80 anos (**16%**) de inibição do efeito do ácido caféico sobre a noradrenalina em granulócitos humanos.

**Figura 32** – Avaliação comparativa do efeito modulador do ácido caféico sobre a noradrenalina sobre a produção de interleucina 8 (IL-8) por granulócitos humanos durante o processo de envelhecimento.



20-39= faixa etária entre 20 e 39 anos; 40-59 = faixa etária entre 40 e 59 anos; 60-80= faixa etária entre 60 e 80 anos. \* = significativo pelo teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, onde  $p < 0,05$  em relação à faixa etária de 20-39 anos. # = significativo pelo teste ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey, onde  $p < 0,05$  em relação à faixa etária de 40-59 anos.

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Faixa etária de 20- 39 anos

No sistema imunológico os granulócitos são as células leucocitárias mais abundantes. Pertencem à família dos neutrófilos, que constituem a linha de frente de defesa do sistema imunitário, onde servem para destruir agentes patogênicos invasores (ESMANN *et.al.*,2010).

Quando esses mesmos granulócitos são estimulados por algum agente nocivo, o processo fagocítico inicia-se. Os microorganismos podem ser fagocitados através da ligação em diferentes receptores de membrana dos fagócitos. Alguns se ligam aos microorganismos em si, e outros a microorganismos opsonizados. Eles são internalizados para dentro dos fagossomos, aos quais se unem aos lisossomos, para formar os fagolisossomos; onde tais microorganismos são destruídos por intermediários reativos de oxigênio, nitrogênio e enzimas proteolíticas (ABBAS *et.al.*,2008).

Portanto percebemos o quanto o processo de fagocitose é importante como um dos mecanismos mantenedores da homeostase em nosso organismo.

Como foi relatado em momentos anteriores, um equilíbrio entre os sistemas imunológico, neural e endócrino se faz necessário. Então buscamos através do nosso estudo observar se existe alteração no comportamento fagocítico dos granulócitos, quando os mesmos foram estimulados pela noradrenalina; um neuro-hormônio que influencia significativamente a função imune, e também é capaz de regular o eixo HPA (permite a ligação entre os três sistemas adaptativos citados no início do parágrafo).

Estudos de MADDEN e cols.,2003 e GOSAIN e cols.,2009 utilizando sangue periférico, demonstraram alterações na fagocitose e explosão respiratória, em resposta a um elevado nível de catecolaminas circulantes.

Quando avaliamos o perfil fagocítico dos citados granulócitos, estimulados com noradrenalina, verificamos que esta foi capaz de gerar aumento da fagocitose pelos granulócitos na faixa etária em questão: 20-39 (**Tabela 5**). Tais achados corroboram com os estudos de GOSAIN e cols. (2009), sobre o tratamento de catecolaminas exógenas em neutrófilos. Estes estudos demonstram que a noradrenalina estimula a fagocitose, e que tal estimulação envolve a ativação de receptores  $\alpha$  e  $\beta$ - adrenérgicos (GOSAIN *et.al.*,2009).

Nossos resultados sugerem que o eixo HPA e o sistema neuroimune estão funcionando em harmonia em um indivíduo jovem, livre de doenças metabólicas. Pois a noradrenalina conseguiu desempenhar seu papel eficientemente. No caso, sendo uma molécula ativadora da fagocitose, por aumentar a formação de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, que têm papel importante no combate aos agentes invasores.

Seguindo a ordem do nosso estudo, analisamos o poder do ácido caféico sobre o processo fagocítico em granulócitos humanos. Primeiramente, é sabido que espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) podem ser geradas endogenamente por reações metabólicas, na cadeia transportadora de elétrons mitocondrial ou durante ativação de fagócitos ou células inflamatórias. (KIRKHAM & RAHMAN, 2006).

Como descrito anteriormente, as ERO e ERN são úteis dentro do contexto da fagocitose. Entretanto, quando a geração de ERO e ERN ultrapassa a capacidade antioxidante da célula, têm-se o que chamamos: estresse oxidativo. Os prejuízos causados por esse acúmulo de espécies reativas são inúmeros, não se limitando às mitocôndrias. Pode-se citar também: dano às estruturas celulares incluindo lipídeos de membrana, danos aos ácidos nucleicos e às proteínas (COSTA *et al.*, 2011; COYLE & PUTTFARCKEN, 1993; RIZZO *et al.*, 2011; SATOH *et al.*, 2004; VALKO *et al.*, 2006).

Dentro desse contexto imunológico, onde podem ocorrer injúrias celulares durante a fagocitose, é necessário que os mecanismos antioxidantes do organismo não estejam falhos, e dessa forma, o dano tecidual possa ser o menor possível.

Testamos então, se o ácido caféico (AC) seria um bom modulador do estresse oxidativo gerado durante o processo fagocítico em adultos jovens, quando incubado isoladamente com os granulócitos desses indivíduos.

É preciso ressaltar que diversos estudos mostraram propriedades antioxidantes do AC (AMORATI *et al.*, 2006; KONO *et al.*, 1997). NARDINI e cols. (1995) evidenciaram que o AC inibiu, de maneira dose-dependente, a peroxidação lipídica induzida por íons cúpricos. Neste mesmo estudo, os autores mostraram que o AC é capaz de reduzir radicais lipoperoxil (por meio da doação de um hidrogênio) e impedir a propagação da peroxidação lipídica.

Nossos resultados mostraram que em granulócitos de indivíduos de 20-39 anos, o ácido caféico não alterou a fagocitose (**Tabela 5**). O que pode ser explicado pela eficiência dos mecanismos antioxidantes endógenos enzimáticos e não-enzimáticos em jovens adultos que se encontram em equilíbrio com os mecanismos pró-oxidantes como verificado por CHAVES *et.al.* (1998).

Como visto anteriormente, a noradrenalina tem o poder de aumentar a fagocitose. Com isso, aumenta-se também a possibilidade de geração de estresse oxidativo. Desse modo, avaliamos a interferência do ácido caféico sobre a noradrenalina dentro do processo fagocítico.

Nossos resultados mostraram que o ácido caféico incubado juntamente com a noradrenalina foi capaz de reduzir a fagocitose, se comparado àqueles granulócitos estimulados apenas com NA (**Tabela 6**). Assim, podemos inferir, que o ácido caféico conseguiu reduzir o número de moléculas oxidantes produzidas em excesso pelo estímulo noradrenérgico, efetivando assim seu papel como antioxidante e consequentemente, citoprotetor.

Concluído os testes de fagocitose, passamos aos experimentos de produção de óxido nítrico. Como já visto anteriormente, o óxido nítrico é uma molécula que atua na modulação de respostas imunes e neurotransmissão, sendo sintetizado por uma classe de NO sintase (NO<sub>s</sub>) (LIU *et.al.*,2003).

A geração de NO pelos neutrófilos está envolvida em sua função antimicrobiana. Esta molécula foi identificada como moduladora de diversas cascatas de sinalização que regulam várias funções como: adesão, quimiotaxia, fagocitose, explosão respiratória, apoptose e modulação da geração de radicais livres (KOBAYASHI *et.al.*,2009).

O óxido nítrico é uma molécula de sinalização que contribui para a regulação do eixo HPA (GADEK-MICHALSKA & BUGAGISKI, 2008). A capacidade do NO em libertar uma variedade de neurotransmissores, incluindo a noradrenalina, é bem reconhecida e, não surpreendentemente, alguns deles têm sido investigados como mediadores supostos da influência do NO no eixo HPA. A influência exercida pelas catecolaminas no eixo HPA é tanto estressor-específica, quanto modulada por múltiplos receptores adrenérgicos, localizados em sítios pré e pós sinápticos (DAS & KING, 2007).

Canais de cálcio e íons cálcio são envolvidos de maneira significativa na estimulação do eixo HPA através de diferentes receptores, incluindo adrenoreceptores e neuropeptídeos. Em geral, ativação de receptores  $\alpha$ -1 adrenérgicos estimula o eixo HPA, enquanto o bloqueio dos mesmos, inibe este eixo. Os receptores adrenérgicos são envolvidos na modulação de L-arginina (DAS & KING, 2007; GADEK-MICHALSKA & BUGAGISKI, 2008). Percebemos então, uma relação intrínseca e íntima entre o eixo HPA e o NO, se considerarmos que este último é sintetizado pela conversão de L-arginina em L-citrulina.

O NO tem um papel fisiológico complexo no sistema nervoso central e na regulação de funções neuroendócrinas. Ele tem uma capacidade substancial em afetar a neurotransmissão dopaminérgica, serotoninérgica e noradrenérgica. (GADEK-MICHALSKA & BUGAGISKI, 2008).

De fato, NO pode liberar noradrenalina, enquanto, reciprocamente, NA é relatada no aumento dos níveis de Nosintetase, enzima responsável pela formação do NO (DAS & KING 2007). Em contrapartida, estudos de BARROS e colaboradores (2012), mostram que a noradrenalina deprime a produção de óxido nítrico por hemócitos de ascídias.

Em meio a tantas evidências da influência da noradrenalina sob a produção de óxido nítrico e vice-versa, o nosso próximo passo foi verificar como essa catecolamina poderia interferir na produção de NO pelos granulócitos humanos.

Os nossos resultados mostraram que houve um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) na produção de NO na faixa etária de 20-39 anos quando os granulócitos foram incubados com noradrenalina (NA) (**Figura 4**). Estes achados são compatíveis com os estudos de GADEK-MICHALSKA & BUGAGISKI, 2008, estes autores observaram que agonistas simpatomiméticos aumentam a liberação basal de óxido nítrico e a NA aumenta a síntese de NO *in vitro* no hipotálamo medial basal através de receptores  $\alpha 1$ -adrenérgicos.

Este aumento de NO é mais uma evidência de que os sistemas adaptativos (imune, neural e endócrimo), estão em equilíbrio no indivíduo jovem. Não podemos negligenciar também, a capacidade neuroprotetora do NO. Então, se através do estímulo noradrenérgico há um aumento na síntese dessa molécula, temos aqui mais um mecanismo de proteção tecidual inerente aos adultos jovens.

Na intenção de verificar se a liberação de óxido nítrico poderia ser influenciada pelo ácido caféico, verificamos que o mesmo aumentou (98 %) ( $p < 0,05$  pelo teste de Mann-Whitney) a produção de NO na faixa etária de 20-39 anos (**Figura 4**). Estudos de JEONG e cols. (2011) com a planta *Erigeron Annuus*, que possui grandes concentrações de ácido caféico indicaram que a mesma teve excelentes efeitos antioxidantes e neuroprotetores. Assim podemos de forma hipotética, pensar, que um dos possíveis mecanismos pelos quais o AC possa desempenhar seu papel neuroprotetor, seja pelo aumento da síntese de NO.

Quando analisamos a ação do ácido caféico juntamente com a noradrenalina sobre a produção de NO, observamos que na faixa etária de 20-39 anos houve um aumento significativo na produção desse mensageiro celular (**Figura 5**). Nesse momento, obtivemos uma ampliação do poder de citoproteção desempenhado pelo NO. O que é justificado possivelmente, pelo fato de que a NA e o ácido caféico atuariam conjuntamente, estimulando a NO *sintetase*.

Perseguindo na tentativa de responder aos objetivos de nosso trabalho, partimos para a dosagem de citocinas anti e pró-inflamatórias. Retomando conceitos anteriores, as citocinas são os principais mediadores da resposta imune e controlam diferentes funções celulares, seja diretamente por meio de eventos que se seguem ao engajamento de seus receptores específicos na superfície celular, ou indiretamente pela indução da expressão de numerosos genes (EWERS, RIZZO e FILHO, 2008).

Podemos classificar algumas das citocinas como pró-inflamatórias, derivadas principalmente de células da resposta imune inata e de células Th1 e Th17, tais como interferon-gama (IFN- $\gamma$ ), fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), interleucinas (IL) IL-1, IL-6, IL-12, e IL-18. Ou podemos classificá-las como antiinflamatórias, sintetizadas principalmente por Th2, Th3 e família de células T regulatórias (TREGs): fator e transformação e crescimento beta (TGF- $\beta$ ), IL-10, e IL-5). (EWERS, RIZZO e FILHO, 2008).

Quando uma célula do sistema imune entra em contato com agentes exógeno ou endógeno, existe uma interação ligante receptor que ativa resposta imune inata, que está relacionada também com o processo de fagocitose pelos neutrófilos. Essa interação estimula a secreção de citocinas pró-inflamatórias.

As citocinas prolongam o tempo de sobrevivência dos neutrófilos, elas geram um sinal que trafega através do nervo vago até o tronco cerebral, onde ocorre uma integração desse sinal que ativa uma via antiinflamatória colinérgica levando a diminuição NF- $\kappa$ B e diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias.

(ELENKOV *et.al.*,2000, MATTHAY & WARE, 2004 ROSAS-BALLINA & TRACEY, 2009;TRACEY, 2009).

A partir do estímulo que chega ao núcleo do trato solitário, o eixo HPA é ativado, através de neurônios simpáticos excitatórios. Esses sinais estimulam a glândula supra-renal que libera noradrenalina que interage, seja com os receptores  $\beta$ -adrenérgicos, (essa interação ligante receptor levam a uma diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias e aumento de citocinas antiinflamatórias), ou com receptores alfa-adrenérgicos (nessa ligação teremos efeitos pró-inflamatórios) (ELENKOV *et.al.*,2000, ROSAS-BALLINA & TRACEY, 2009; TRACEY, 2009).

Estudos *in vitro*, demonstraram que hormônios adrenérgicos podem alterar todas as fases de uma resposta imune, modificando funções como: produção de citocinas e proliferação de linfócitos. Esses resultados ilustram a importância do Sistema Nervoso Simpático na modulação imunológica em condições patológicas e não patológicas (CHRISTO *et.al.*, 1996).

Neste contexto, nossos resultados mostraram que quando granulócitos foram estimulados com noradrenalina, esta aumentou a produção da interleucina 4 (IL-4) mas não da interleucina 10 (IL-10), na faixa etária de 20-39 anos (**Figura 6**),ou seja, não observamos então alteração do perfil de produção de IL-10 (**Figura 8**). Estes resultados nos mostram também, que nesta faixa etária, a IL-4 é quem participa mais ativamente dos mecanismos anti-inflamatórios. Já na dosagem de IL-8 (citocina pró-inflamatória), houve também, um aumento na produção desta (**Figura 10**).

Concluimos que realmente as catecolaminas podem modular o perfil inflamatório em indivíduos jovens. Percebemos um equilíbrio entre citocinas pro e anti-inflamatórias, demonstrando portanto, uma comunicação eficiente entre o sistema imune e a regulação do eixo HPA por neuro-hormônios como a noradrenalina, importante na manutenção do equilíbrio pro e anti-inflamatório.

Nosso próximo passo foi analisar o poder antioxidante e/ou antiinflamatório do ácido caféico na produção de citocinas. Durante o processo inflamatório, moléculas oxidantes aumentam a produção de interleucinas (IL-8 e IL-6) e TNF em resposta a

estímulos inflamatórios, e as citocinas aumentam a produção dos mesmos oxidantes gerando um ciclo de reações. A IL-1 $\beta$ , IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , por exemplo, induzem a produção de superóxido via NADPH oxidase, o qual, em contrapartida aumenta a expressão dessas mesmas citocinas (BIANCA *et.al.*, 1999).

Em adição, a defesa antioxidante atua direta ou indiretamente protegendo o organismo dos ataques das citocinas e espécies oxidantes. Estudos têm demonstrado que as vitaminas antioxidantes podem inibir a produção de citocinas inflamatórias (CINDROVA-DAVIES *et.al.*, 2007, OLIVEIRA *et.al.*, 2012). Acredita-se em uma proteção indireta dos antioxidantes, através da redução da ativação de vias de sinalização, prevenindo, portanto, a estimulação de citocinas por oxidantes (GRIMBLE,1994).

Na tentativa de verificar se o ácido caféico exerceria um papel semelhante ao das vitaminas antioxidantes citadas por CINDROVA-DAVIES e cols. (2007), nossos resultados demonstraram que o ácido em questão, influencia o perfil de IL-8, diminuindo excessivamente a produção desta citocina na faixa etária em questão (20-39 anos) (**Figura 10**). Porém, não percebemos aumento ou diminuição de IL-4 (**Figura 6**) e IL-10 (**Figura 8**).

Tais achados mostram os benefícios do ácido caféico como um antiinflamatório potente; já que esse ácido fenólico conseguiu reduzir em mais de 90% a produção de IL-8 em indivíduos jovens. Não foi possível verificar aqui, seus efeitos antioxidantes.

Quando o nosso objetivo foi o de avaliar o efeito modulatório do ácido caféico sobre a noradrenalina, verificamos que o ácido caféico conseguiu modular a ação da noradrenalina diminuindo a produção de IL-4 (**Figura 7**). Não foi verificada modulação desse ácido fenólico sobre a NA quando foi dosada a segunda citocina anti-inflamatória (IL-10) (**Figura 9**). Já na dosagem de (IL-8), o AC modula a NA, diminuindo a produção dessa citocina pro-inflamatória (**Figura 11**).

Essas quedas tanto de citocina anti-inflamatória (IL-4), como de pró inflamatória (IL-8), podem ser decorrentes do efeito antioxidante do ácido caféico. A

ação de modulação do ácido caféico sobre a noradrenalina na diminuição de IL-4, não seria o desejado, tendo em vista seus efeitos antiinflamatórios. Entretanto, podemos pensar que esta diminuição poderia estar ocorrendo pela eficiência dos mecanismos anti-oxidantes existentes nesta faixa etária, o que poderia já estar modulando a produção de IL-4. Aliado a isto, o efeito sobre a queda de IL-8 é muito evidente e sob a óptica de se considerar um balanço entre a queda provocada sob IL-4 e gerada sob IL-8, seu efeito antiinflamatório estaria sendo preservado.

## 5.2 Faixa etária 40-59 anos

Seguindo a mesma lógica e a mesma ordem usada na faixa etária de 20-39 anos verificamos se, e qual seria o poder da noradrenalina em alterar o processo de fagocitose, naqueles indivíduos que estariam dentro de uma faixa de transição entre a juventude e sinais de envelhecimento.

Observamos que a noradrenalina conseguiu ativar a fagocitose (**Tabela 7**). Tais resultados coincidem com o observado para indivíduos entre 20 e 39 anos, e estão de acordo com os trabalhos da literatura que indicam que as catecolaminas têm poder de aumentar o processo fagocítico (MADDEN *et al.*2003 ; Gosain *et al.*.,2009).

Essas observações permitem raciocinar que indivíduos nessa faixa etária (40-59 anos) ainda mantêm um equilíbrio dos mecanismos de sinalização existentes entre os sistemas adaptativos.

Já na estimulação dos granulócitos pelo ácido caféico, não foi possível evidenciar quaisquer alterações no processo fagocítico (**Tabela 7**). Portanto, julgamos que os mecanismos antioxidantes estejam atuando de forma esperada nessa fase da vida, e consigam diminuir o estresse gerado no processo fagocítico, assim como o fazem em indivíduos de 20-39 anos.

Entretanto, quando o ácido caféico foi incubado com a noradrenalina, o mesmo conseguiu diminuir a fagocitose realizada pelos granulócitos (**Tabela 8**). Corroborando novamente com os resultados encontrados na faixa etária inicial (20-39 anos), percebemos que em uma situação de estresse oxidativo - causada pela noradrenalina - o ácido caféico mostra-se como um antioxidante eficiente.

Passando aos ensaios de óxido nítrico, podemos perceber que a noradrenalina não conseguiu alterar o perfil de produção dessa molécula sinalizadora (**Figura 12**), como o fez em indivíduos mais jovens. Neste momento, já percebe-se uma falha dos mecanismos reguladores do eixo HPA e uma possível ineficiência na sensibilização de alguns receptores, como o receptor  $\alpha$ -1 adrenérgicos. Possivelmente, também há um rebaixamento da estimulação da NA sobre a NO sintetase (enzima responsável pela síntese do NO).

Porém, positivamente o ácido caféico foi capaz de aumentar os níveis de NO (**Figura 12**). Evidenciando assim seu papel como protetor celular; principalmente neuroprotetor.

No próximo estágio, onde avaliamos o poder do ácido caféico em modular a ação da NA, encontramos outra quebra da homeostase nesses indivíduos em processo de envelhecimento. Isso porque, houve uma diminuição da produção do óxido nítrico (**Figura 13**), conseqüentemente, uma diminuição dos mecanismos protetores celulares.

Em relação à produção de citocinas inflamatórias, encontramos que a noradrenalina não interferiu no perfil de produção de IL-4 (**Figura 14**) ou IL-10 (**Figura 16**) (citocinas sabidamente antiinflamatórias), como também não alterou a produção de IL-8 (**Figura 18**). Este perfil encontrado, se opõe ao encontrado para indivíduos mais jovens, onde as catecolaminas realmente influenciam o perfil inflamatório do indivíduo.

Os resultados com o ácido caféico mostraram que este não alterou a produção de IL-4 (**Figura 14**). Mas, diminuiu a produção de IL-10 (**Figura 16**) e não alterou a IL-8 (**Figura 18**). Temos aqui instaurado um quadro negativo do ponto de vista imunológico. Estamos favorecendo o equilíbrio pró-inflamatório, um dos sinais evidentes da senescência, que é caracterizada como um processo inflamatório crônico.

Finalmente, quanto à modulação do ácido caféico sobre a noradrenalina, vimos que a produção de IL-4 é diminuída (**Figura 15**). E não encontramos diferenças significativas na dosagem de IL-10 (**Figura 17**). Encontramos também, diminuição de IL-8 (**Figura 19**). Esta última evidência é benéfica, pois o ácido caféico conseguiu modular a noradrenalina inibindo um perfil pro-inflamatório; apesar desta inibição já não ser tão evidente como nos indivíduos jovens.

### 5.3 Faixa etária 60-80 anos

A habilidade dos neutrófilos em neutralizar rapidamente agentes invasores é indispensável para a manutenção da saúde. Quaisquer alterações nessas células podem levar a um quadro inflamatório recorrente e a uma maior vulnerabilidade a algumas doenças, aumentando a morbidade e mortalidade, com o avanço da idade (FORTIN *et.al.*, 2008).

Portanto, os granulócitos estão envolvidos na resposta aguda aos agentes infecciosos, e algumas funções dessas células vão sendo comprometidas dentro do processo de envelhecimento (FORTIN *et.al.*,2008, LORD *et.al.*,2001). A associação entre mudanças metabólicas em granulócitos, relacionadas com a idade, são bem documentas, porém os mecanismos que as levam, ainda não são bem definidos (WESSELS *et.al.*,2010).

No idoso a habilidade fagocítica e explosão respiratória dos neutrófilos tem sido objeto de discussões, e na literatura resultados controversos são encontrados. Alguns estudos propõem que várias funções dos granulócitos estão comprometidas no idoso. Isso contribui para o aparecimento de algumas doenças (FORTIN *et.al.*, 2008). Porém, LARBI e cols, 2007 sugerem que o número e a capacidade fagocítica dos neutrófilos é bem preservada nos idosos. No entanto, algumas outras características funcionais dessas células nos indivíduos senis, tais como: produção de ânion superóxido, quimiotaxia e apoptose em resposta à certos estímulos, são reduzidas.

Diferentemente do perfil encontrado nas faixas etárias anteriores; entre 60 e 80 anos, verificamos que a noradrenalina não foi capaz de aumentar o processo fagocítico (**Tabela 9**). Este resultado corrobora com os estudos de AGUILERA e cols (2010) e BISHOP e cols (2010) que demonstram que o eixo HPA é uma das vias que coordena a liberação de alguns hormônios, entre eles a noradrenalina, mas com o envelhecimento, algumas dessas vias de sinalização estão alteradas.

Essas falhas de sinalização decorrentes do envelhecimento poderiam ser responsáveis por uma série de patologias e doenças que acometem indivíduos “mais velhos”.

O ácido caféico assim como a noradrenalina, não conseguiu aumentar ou diminuir a fagocitose em idosos (**Tabela 9**). Porém, quando incubado com a noradrenalina diminuiu o processo fagocítico (**Tabela 10**), em proporções diminutas com relação às demais faixas etárias.

O NO tem um papel importante em estimular a enzima guanilato ciclase solúvel (GCs) aumentando a concentração de (GMPc). O aumento de (GMPc) ativa as proteínas quinases dependentes de (GMPc) as quais catalisam a fosforilação das proteínas. Estudos sobre a via NMDA (Nmetil D aspartato)/NOS/ GMPc/ foram realizados através de hipocampo de ratos e foi observado que o fluxo de GMPc diminui 55% durante o processo de envelhecimento (VALLEBUONA *et.al.*,1995).

Como se sabe, existem três classificações da óxido nítrico sintase (NOS): a forma constitutiva, onde apresenta duas isoformas, neuronal (NOSn) e endotelial (NOSe); que são encontradas em diferentes células e tecidos, incluindo neurônios e veias, e são dependente de  $Ca^{+}$ . A forma indutiva (NOi) é expressa por células vasculares em resposta à quimiocinas e microorganismos invasores. E um terceiro subtipo é classificada de acordo com a sua localização subcelular, que é a forma mitocondrial. (NOSmt) (FORSTERMANN *et.al.*,1994; NAVARRO *et.al.*, 2008; CAU *et.al.*,2012).

O nível de NOSmt diminui em decorrência do envelhecimento, especialmente no cérebro, e têm sido apontado como biomarcador desse processo, isso talvez seja devido as alterações mitocondriais observadas nessa fase (YAP *et.al.*,2009).

Alterações na produção de NO leva a ativação da NOSi gerando uma resposta pró-inflamatória que pode ser uma dos fatores que contribuem para o envelhecimento e doenças neurodegenerativas (NAVARRO *et.al.*, 2008).

Nossos achados mostraram que a noradrenalina e o ácido caféico não foram capazes de alterar a produção desse neuroprotetor (**Figura 21**). E acima de tudo o ácido fenólico em estudo não modulou a ação da noradrenalina nos indivíduos idosos (**Figura 22**).

Esses resultados podem sinalizar que, durante o processo de senescência, ocorre uma diminuição da resposta simpática, que pode se justificar principalmente pelo decréscimo na sensibilização de receptores  $\alpha 1$  adrenérgicos; resultado da redução da competência adaptativa ao estresse, algo que é inerente ao envelhecimento. Acrescentando esse cenário, temos uma perda dos mecanismos neuroprotetores, o que deixa o organismo mais susceptível às doenças neurodegenerativas.

Partindo para a análise da produção de citocinas, dados da literatura nos mostram que a produção das citocinas pró-inflamatórias IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  está aumentada nos idosos. O que reflete uma alteração no padrão de regulação destas, que podem estar associados aos mecanismos desencadeadores de muitas das doenças típicas da idade como a aterosclerose, a demência e doenças auto-imunes. (EWERS, RIZZO e FILHO,2008; WOLF *et.al.*,2012.;

Cabe ressaltar que a produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  estimulam a liberação sistêmica de IL-6 e IL-8, amplificando, dessa forma, a resposta inflamatória. A liberação de citocinas como IL-8 possuem ação direta na manutenção do estímulo do eixo HPA (BASILE-FILHO *et. al.*, 2001). Lembrando aqui, que a IL-8 foi um dos objetos de nosso estudo.

Como vimos anteriormente o envelhecimento é considerado como um processo de inflamação crônica, o chamado “Inflam age”. E um processo inflamatório resulta na produção de quantidades marcadas de citocinas pró e anti-inflamatórias por neutrófilos e macrófagos. Vários estudos mostraram alterações na produção de citocinas pró-inflamatórias em resposta a catecolaminas (BASILE-FILHO *et. al.*,2001). Vários relatos da literatura indicam, que a NA e outros agonistas adrenérgicos podem modular muitos aspectos da resposta imune (iniciativa, proliferativa e de fases efetoras), alterando a produção de respostas celulares e de citocinas, a proliferação de linfócitos, a secreção de anticorpos, e a expressão do gene inflamatório (YANG *et al.*,2012).

Nossos resultados mostraram que tanto a noradrenalina quanto o ácido caféico, quando incubados isoladamente ou conjuntamente, não foram capazes de alterar a produção de IL-4 (**Figura 22 e 23**). Já o ácido caféico isoladamente diminuiu a produção de IL-10 (**Figura 24**), e nenhuma modificação foi percebida pela ação da noradrenalina (**Figura 24**) e nem por noradrenalina e ácido caféico juntos (**Figura 25**). Já na IL-8, que mede o perfil pró-inflamatório e foi intensamente modulado nas faixas etárias anteriores, verificamos que o ácido caféico conseguiu isoladamente exercer seu papel antiinflamatório. Porém em proporções inferiores quando comparado aos indivíduos mais novos (20-39/40-59 anos) (**Figura 26**).

Percebe-se que a noradrenalina não consegue mais modular o perfil antiinflamatório das citocinas. E que, há um decaimento expressivo da contribuição do ácido caféico como antioxidante e/ou antiinflamatório.

Para evidenciarmos mais claramente a deficiência da modulação do ácido caféico sobre a noradrenalina em granulócitos durante o processo de envelhecimento, fizemos figuras comparativas. Assim, observando estas figuras podemos inferir que o declínio do poder de modulação do ácido caféico sobre a noradrenalina na fagocitose, produção de óxido nítrico e citocinas inflamatórias no decorrer da idade, é característico da falência da comunicação neuro-imune-endócrina. E configura-se como uma ilustração da queda dos mecanismos homeostáticos do organismo, durante o que chamamos de senescência (**Figuras 28, 29, 30, 31, 32**).

Neste contexto, o envelhecimento é uma experiência que todo ser humano compartilha, mas nem sempre compreende. Não apenas o entendimento do processo de envelhecimento é fundamental como também determinar as causas e intervenções necessárias para o seu adiamento. (SPIRDUSO *et al.*, 2005).

Assim, sabemos que ocorre diminuição progressiva e geral das funções do organismo, diminuindo a habilidade de reagir às mudanças adaptativas, e manter a homeostase. Evidências apontam que o sistema imunológico, pode iniciar um estado oxidativo e um processo inflamatório não controlados; fatores esses que estão ligados ao processo de envelhecimento (DE LA FUENTE *et al.*, 2009) que afeta todas as células do organismo, mas especialmente as células do sistema neuroimunoendócrino.

Através dos dados obtidos com o nosso trabalho verificamos que durante o desenrolar da vida, há um desequilíbrio entre esses sistemas adaptativos que gera dificuldade em se manter efetivos os mecanismos imunes, neuroprotetores, antioxidantes e sinalizadores.

Portanto, os nossos resultados auxiliam na elucidação de pontos metabólicos importantes que fazem parte da regulação neuroimunoendócrina. O envelhecimento reflete o somatório de inúmeras mudanças que ocorrem no ser humano durante a vida. A associação entre idade e diminuição da função do sistema imunológico aumenta a suscetibilidade a várias doenças neurodegenerativas. Dentro desse contexto, o nosso trabalho levantou vários questionamentos nos quais demonstraram que há necessidade de um estudo mais aprofundado, nos mecanismos moleculares que estão envolvidos nos sistemas neuroimunoendócrino, principalmente no que se refere à via adrenérgica; pois a mesma demonstrou ser importante em manter a homeostase entre o sistema imune, endócrino e nervoso.

## 6 CONCLUSÃO

Após o desenvolvimento do nosso trabalho, concluímos que a noradrenalina e o ácido caféico exercem efeitos importantes no processo de envelhecimento. Alteram a fagocitose e os processos de produção de óxido nítrico, IL-4, IL-10 e IL-8. É relevante destacar também o papel modulatório do ácido caféico sobre a noradrenalina, que tende a declinar à medida que o indivíduo envelhece.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K; LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 564 p.

AGUILERA, G. *HPA axis responsiveness to stress implication for health aging*. *Exp Gerontology*, v.46, p 90-95, Mar, 2010.

ALVES, G.J.; JOÃO, P. *Neuroimunomodulação: sobre o diálogo entre o sistema nervoso e imune*. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, v.29, n.4, pp363-369 Dez, 2007.

AMORATI, R.; PEDULLI, G. F.; CABRINI, L.; ZAMBONIN, L.; LANDI, L. *Solvent an pH effects on the antioxidants activity of caffeic and other phenolic acids*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 2932-2937, 2006.

ASFAHA,S.;DUBLYKOVSKIY,NA.;TOMITA,H.;YANG,X.;STOKES,S.;SHIBATA,W.;FRIEDMAN,RA.;ARIYAMA,H.;DUBLYKOVSKIY,ZA.;MUTHUPALANI,S.;ERICKSEN,R.;FRUCHT,H.;FOX,SG.;WANG,TC. *Mice that express human interleukin 8 have increased mobilization of immature myeloid cells, which exacerbates inflammation*. *Gastroenterology*.2012

BARROS,M.C.;MELLO,A.A.;ALLOIDE,S. *Norepinephrine depresses the nitric oxide production in the ascidian hemocytes*. *Journal of Invertebrate Pathology*.2012

BASILE-FILHO,A.SUEN,V.MARTINS,M.COLETTTO,F.MARSON,F. *Monitoração da resposta orgânica ao trauma e à sepse*. *Medicina*. Ribeirão Preto , 2001.

BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. *Bioquímica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.1114 p.

BERTELLI,R.;VASCONCELOSRAPOSO,J.;BIANCHI,J.P.;FERNANDES,M.H.;CRUZ,C.E. *Associação entre a actividade física, envelhecimento e demência*. *Acta Méd Port*.2011.vol.24,n°5,Abril,2010.pp771-774.

BIANCA, V.D.; DUSI, S.; BIANCHINI, E. *Beta- amyloide activates the o-2 forming NADPHoxidase in microglia, monocytes,neutrophils. A possible inflammatory mechanism of neuronal damage in Alzheimer's disease*. *Journal Biology Chemical.*, v.274, p.15493-99, 1999.

BICALHO, H.M.S.; GONTIJO, M.C.; NOGUEIRA-MACHADO, J.A. *A simple technique for simultaneous human leockocytes separation*. *Journal of Immunology*, v.40, p115-116,1981.

BILATE.A.M.B. *Inflamação,citocinas,proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas*. *Temas de Reumatologia Clínica*. Vol.8,n° 2,junho de 2007.

BAUER,M.E. *Sress, glucocorticoids and ageing of the immune system stress*.vol.8,n°1,2005. pp69-83 *Stress*,2005.

BISHOP, N.; LU, T.;YANKNER, B.A. *Neural mechanisms of ageing and cognitive decline*. *Nature*, v.454, p 529-535,2010.

CALABRESE, V.; MANCUSO, C.; CALVANI, M.; RIZZARELLI, E.; BUTTERFIELD, D.A.; STELLA, A.M.G. *Nitric oxide in the central nervous system: neuroprotection versus neurotoxicity*. *Nature ReviewNeuroscience*, v.8, 2007.

CAU,S. CARNEIRO,F. *Differential modulation of nitric oxide syntases in aging: therapeutic opportunities.* **Frontiers in Physiology.** 25 june 2012.

CHAVES, M.M.; ROCHA-VIEIRA, E.; LIMA E SILVA, R.; REIS, A.P.; MACHADO-NOGUEIRA, J.A. *Host defenses in aged :evaluation of the balance between oxidizing species generation and reducing power in phagocytosing human granulocytes.* **Mechanisms of ageing an Development**, v.104, p.103-109, Aph,1998.

CHAVES, M.M.; ROCHA-VIEIRA, E.; REIS, A.P.; SILVA, R.L.;GERZSTEIN, N.C.; MACHADO-NOGUEIRA, J.A. *Increase of reative oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species generated by phagocytosing granulocytes related to aged .* **Mechanisms of Ageing an Development**, v.119, p.1-8,June , 2000.

CHRISTO, P.H.; WENISCH, BERNHAR, D.; PARSchAK, A.; et.al. *High-dose catecholamines treatment decreased polymorphonuclear leukocyte phagocytic capacity and reactive oxygen production.* **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology.**p 423-428, 1996.

CINDROVA-DAVIES, T., et al., *Nuclear factor-kappa B, p38, and stress-activated protein kinase mitogen-activated protein kinase signaling pathways regulate proinflammatory cytokines and apoptosis in human placental explants in response to oxidative stress: effects of antioxidant vitamins.* **Am J Pathol**, 2007. **170**(5): p. 1511-20.

COSTA, R. A. P.; ROMAGNA, C. D.; PEREIRA, J. L.; SOUZA-PINTO, N. C. *The role of mitochondrial DNA damage in the citotoxicity of reactive oxygen species.* **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 43, p. 25-29, 2011.

COYLE, J. T.; PUTTFARCKEN, P. *Oxidative stress.* **Science**, v. 262, p. 689-695, 1993.

CUMMINGS, S.R. *The biology of aging.***Journal Muscule Sckeletal Neuronal Interact**, v.7,n.4, p 340-341, 2007.

DARLEY-USMAR, V., WISEMAN, H. & HALLIWELL, B. *Nitric oxide and oxygen radicals: a question of balance.* **FEBS letters** 369, pp131-135 ,1995.

DAS,E.N.; KING,GL. *The role of protein kinase c activation and the vascular complications of diabetes.***Pharmacol.Res.** Jun;55(6):498-510. May 5. Epub 2007.

DE DEUS,D.M.V.;LUGO,K.A.;MUNIZ,M.T.C. *Influence of IL10 (G1082A) and TNFa (G308A) Polymorphisms on the survival of pediatric patients with ALL.* **Leukemia Research and Treatment.** Vol. 2012, article ID 692348,6 pages DOI:19.1155/2012.

DE LA FUENTE, M.; MIQUEL, J. *Um update the oxidation-inflammation theory of aging:the involvement of the immune system in oxi-inflamm-aging.* **Current Pharmacological Desease**, v.15, n.26, p.3003-26, 2009.

DUNN,A.J. *Mechanisms by wich cytokins signal the brain.* **Int.Rev.Neurobiology.** vol.52,pp 43-65,2002.

ELENKOV,I.J.; WILDER,R.L.; CHROUSOS, G.P. *The sympatetic nerve-An integrative interface between two supersystems:The brain and the immune system .* **Pharmacological Reviews**, v.52, p.595-628, 2000.

ESMANN,L.;IDEL,C.;SAKAR,A.;HELBERG,L.;BEHNEN,M.;MULLER,S.;ZANDBURGEN,G.;KLINGER,M.;KOHL,J.;BUSSMEYER,U.;SOLBACK,W.;LASKAY,T.*Phagocytosis of apoptotic cells by neutrophil granulocytes: Diminished proinflammatory neutrophil functions in*

*the presence of apoptotic cells. The Journal of immunology.* Vol.184,n°1, pp.391-400.January 2010.

EWERS,I.,RIZZO,LV.FILHO,JK. *Aging and immunology.* **Einstein.** 2008.

FERRARI, C.K.B. *Atualização: Fisiopatologia e Clínica da Síndrome Metabólica.* **Arquivos Catarinenses de Medicina.** Vol.36,n° 4.2007.

FORMENTINI,A.;BRAUN,P.;FRICKE,H.;LINK,K.H.;HENNEBRUNS,D.;KARNMANN,M. *Expression of interleukin 4 and interleukin 13 and their receptors in colorectal cancer.* **Int.Journal Colorectal Disorders.**Vol.27, n° 10,pp.1369-1376. Oct.2012.

FORSTERMANN, U.; CLOSS, E.I.; POLLOCK, J.S.; NAKANE, P.S.; GATH, I.;KLEINERT, H. *Nitric oxide synthase isoenzymes.Characterization, purification, molecular, clonig,and functions.* **Hypertension**,v.23, p 1121-31,1994.

FORTIN, C.F.; MCDONALD, P.P.; LESUR, O.; FULOP.JR, T. *Aging and Neutrophils: There is still much to do.* **Rejuvenation Research**,v.11, n.5, p.873-882,2008.

FREITAS, E.V. Ano Internacional do Idoso. **Arq.Geriatr.Gerontol.** vol.3, n° 1 pp.1-2.1999

FUSCO, D., COLLOCA, G., LO MONACO, M.R., CESARI, M. *Effects of antioxidant supplementation on the aging process.* **Clin Interv Aging.** 2007; vol.2, n°3pp.377-387.2007.

GADANI, S.P.;GONK,J.C.;NORRIS,G.T.;KEPNIS,J. *IL-4 in the brain: A cytokine to remember.* **Journal Immunology.** Vol. 189, n°9,pp 4213-4219.Nov,2012.

GADEK-MICHALSKA, K.A.; BUGAJSKI,G. *Nitric oxide in the adrenergic-and crh-induced activation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis.* **Journal of Physiology and Pharmacology.** Pp 365-378. 2008.

GORONZY, J.J.; LEE,W.W.; WEYNAND,C.M. *Aging and T cell diversity.* **Experimental Gerontology.** Vol. 10, n° 1016, 2007.

GOSAIN,A.; GAMELLI,R.;DIPIETRO,L.A. *Norepinephrine mediated suppression of phagocytosis by wound neutrophils.* **Journal Surg Res.** Vol. 152, n° 2,p. 311-318. April 2009.

GRIESS, P. *One a new of bodies in which nitrogen is substituted for hydrogen.***Philosophical Transaction Royale Society London.**v.154, p 667-723, 1864.

Grimble, R.F., *Nutritional antioxidants and the modulation of inflammation: theory and practice.* **New Horiz,** 1994. 2(2): p. 175-85.

GRUVER,A.I.;HUDSON,L.L.;SEMPOWSKI,G.D. *Immunosenescence of aging.* **Journal Paholol.** Vol. 211, n° 21 pp.144-156. 2997.

GUZIK, T.J.; KORBUT, T.;GUZIK, A. *Nitric oxide and superoxide in inflammation and imunne regulation,* v. 54, n.4, p 469-87, .j **Physio Pharmacol.** 2003.

HALL,M.F.;BRUSER,deA.;PODAWILTZ,A.;MUMMERT,D.I.;JONES,H.;MUMMERT,M.E. *Psychological stress and the cutaneous immune response: roles of the HPA axis and the sympathetic nervous system in atopie dermatitis and psoriasis.* **Dermatology Research and Praticte.** Vol.2012, n° 20121, 2012.

HARMAN, D. *The aging process.* **Proc . Natl. Sci.USA,** v.78, p 7124-7128, 1981.

HARMAN,D. *The free radical theory of aging*.**Antioxidants & Redox Signaling**, v.5, n.5, p 557-560, 2003.

HART,R.W.;TURTURRO,A. *Evolution and dietary restriction*. **Experimantal Gerontology** .Vol.33, pp.53-60.1983.

HAYFLICK,L. *The cell biology of aging*. **Clin.Geriatr.Med.**1985

HEFFNER,X. *Neuroendocrine effects of stress on immunity in the elderly:Implications for Inflammatory Disease*. **Immunol Allergy Clin North Am**.Vol. 31, n°1,p.95-108. Feb.2011.

HSIEH, C.L., YEN, G.C., CHEN, H.Y. *Antioxidant activities of phenolic acid on ultraviolet radiation-induced erythrocyte and low density lipoprotein oxidation*. **J Agric Food Chem**. Vol. 53,n°15,p.6151-6155.2005

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. *Projeção da População do Brasil por Sexo e Idade, 1980 – 2050*, Rio de Janeiro, revisado em 2010.

IYER,S.S.;CHENG,G. *Role of interleukin 10 transcriptional regulation in inflammations and autoimmune disease*. **Crit. Rev. Immunol**. Vol.32, n° 1, p23-63.2012.

JEONG, C. H.; JEONG, H. R.; CHOI, G. N.; KIM, D. O.; LEE, U.; HEO, H. J. *Neuroprotective and anti-oxidant effects of caffeic acid isolated from Erigeron annuus leaf*. **Chinese Medicine**, v. 6, p. 1-9, 2011.

JOUVET,M.;ALBAREDE,J.L.;LUBEN,S.;MEYRIGNAC,C. *Noradrenaline and cerebral aging*. **Encephale**. Vol. 17, n° 3, p. 187-195. May-Jun. 1991.

JSZELENY E VIZI. *The catecholamine-cytokine balance interaction between the brain and the immune system* . **Ann N Y Acad Sci**. 2007

KIRKHAM, P.; RAHMAN, I. *Oxidative stress in asthma and COPD: Antioxidants as a therapeutic strategy*. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 111, p. 476-494, 2006.

KOBAYASHI, S.D.; DELEO, F.R. *Role of neutrophils in innate immunity:a systems biology-level approach*. **WIREs Systems Biology and Medicine**. v.1,p.309-331, 2009.

KONO, Y.; KOBAYASHI, K.; TAGAWA, S.; ADACHI, K.; UEDA, A.; SAWA, Y. *Antioxidant activity of polyphenolics in diets. Rate constants of reactions of chlorogenic acid and caffeic acid with reactive species of oxygen an nitrogen*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1335, p. 335-342, 1997.

LARBI,A.;FRANCESCHI,C.;MAZZATTI,D.;SOLANA,R.;WIKBY,A.;PAWELL,G. *Aging of the Immune System as a Prognostic Factor for Human Longevity*. **Physiology**. Vol. 23, p. 64-74. 2007

LEE, W. J.; ZHU, B. T. *Inhibition of DNA methylation by caffeic acid and chlorogenic acid, two common catechol-containing coffee polyphenols*. **Carcinogenesis**, v, 27, p. 269-277, 2006.

LEVI,B.H .; TASKER,J.G. *Synaptic regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and its modulation by glucocorticoids and stress*. **Frontiers in Cellular Neuroscience**. May 2012.

LIGTHRT, G.J.; CORBERAND,J.X.; FOURNIER, C.; GALANAUD,P.; HIJMANS, I.N.; KENNES, B.; MULLER-HERMELINK, H.K.; STREINMANN, G.G. *Admission criteria for immunogerontological studies in man the senieur protocol*. **Mechanisms Ageing Development**, v.28, n.1, p.47-55, nov, 1984.

LIMA-COSTA, M. F.; VERAS, R. *Envelhecimento e saúde pública*. **Caderno de Saúde Pública do Rio de Janeiro**, v. 19, p. 700-701, 2003.

LIU, P.; SMITH, P.F.; APPLETON, I.; DARLINGTON, C.L.; BILKEY, D.K. *Nitric oxide synthase and arginase in the rat hippocampus and endorhinal, perirhinal, postrhinal, and temporal cortices: regional variations and age-related changes*. **Hippocampus**, v.13, p.859-867, 2003.

LORD, J.M.; BUTCHER, S.; KILLAMPALI, V.; LASCELLES, D.; SALMON, M. *Neutrophil ageing and immunosenescence*. **Mechanisms of Ageing and Development**, v.122, p.1521-1535, 2001.

LOURENÇO, C. C. L. *A escrita de narrativas autobiográficas no processo de envelhecimento*. **Revista da Sociedade Brasileira de Fonoaudiologia**, v. 15, 2010.

LUZINA, I.G.; KEEGAN, A.D.; HELLER, N.M.; ROOK, G.A.W.; SHEA-DONOHUE, T.; ATAMAS, S.P. *Regulation of inflammation by interleukin-4: a review of alternatives*. **Journal of Leukocyte Biology**. Vol.92. Oct. 2012.

MACEDO, C.; GAZZOLA, J.M.; NAJAS, M. *Síndrome da fragilidade no idoso: importância da fisioterapia*. **Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde**. Vol. 33, nº 3, p. 177-84. 27/10/2008.

MADDEN, K.S. *Catecholamines, sympathetic innervation, and immunity*. **Brain Behavior Immunity**, v.17, n.1, p.5-10, 2003.

MAISTRO, E. L.; ANGELI, J. P. F.; ANDRADE, S. F.; MANTOVANI, M. S. *In vitro genotoxicity assessment of caffeic, cinnamic and ferulic acids*. **Genetics and Molecular Research**, v. 10, p. 1130-1140, 2011.

MEDVEDEV, Z. A. *An attempt at a rational classification of theories of aging*. **Biological Reviews**, v. 65, p. 375-398, 1990.

MORI, H., IWAHASHI, H. *Antioxidant activity of caffeic acid through a novel mechanism under UVA irradiation*. **J Clin Biochem Nutr**. Vol. 45, nº 1, p. 49-55 2009.

MORONI, F.; DIPAOLO, M.L.; RIGO, A.; CAPRIANO, C.; GIACCONI, N.A.; RECCHIONI, R.; MARCHESELLI, F.; MALAVOLTA, M.; MOCHEGIANE, E. *Interrelationship among neutrophil efficiency, inflammation, antioxidant activity and zinc pool in very old age*. **Biogerontology**, v.6, p.271-281, june, 2007.

NARDINI, M.; D'AQUINO, M.; TOMASSI, G.; GENTILI, V.; DI FELICE, M.; SCACCINI, C. *Inhibition of human low-density lipoprotein oxidation by caffeic acid and other hydroxycinnamic acid derivatives*. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 19, p. 541-542, 1995.

NAVARRO, A.; BOVERIS, A. *Mitochondrial nitric oxide synthase mitochondrial brain dysfunction in aging and mitochondrial-targeted antioxidants*. **Advances Drug Delivery Reviews**, v.60, p 1534-1544, 2008.

OLEKSOWICZ, L.; DUTCHER, J.P. *A review of the new cytokines: IL-4, IL-6, IL-11 and IL-12*. **Am J Ther**. Vol. 1, nº 2, p. 107-115. Aug. 1994.

OLIVEIRA, B. F.; NOGUEIRA-MACHADO, J. A.; CHAVES, M. M. *The role of oxidative stress in the aging process*. **The Scientific World Journal**, v. 10, p. 1121-1128, 2010.

OLIVEIRA-LIMA, A.; DIAS DA SILVA, W. *Imunologia, imunopatologia, alergia métodos*, Rio de Janeiro. **Guanabara Koogan**, p 236, 1970.

PANDA,A.; ARJONA,A.; SAPEY, E.; BAI, F.; FIKRIG,E.; MONTGOMERY,R.R.;LORD,J.M.;SHAW,A.C. *Human innate immunosenescence: causes and consequences for Immunity in old age*. **Immune senescence special issue**. June 2009.

PEREIRA,A.; FREITAS,C.; MENDONÇA, C.; MARÇAL,F.;SOUZA,J.; NORONHA, J.P.; LESSA, L.; MELO, L.; GONÇALVES, R.; SHOLL, A. *Envelhecimento, estresse e sociedade: uma visão psiconeuroendócrinológica*. **Ciências e Cognição**. Vol. 1, p. 34-53. 2004.

PERILO, C.S. *Mudanças no equilíbrio funcional metabólico em granulócitos humanos durante o processo de envelhecimento : alteração na sinalização mediada por IP3 e PKA durante esse processo*. Belo Horizonte MG, 2005.f.109 (mestrado em Bioquímica e Imunologia )-Instituto de ciências biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG.

RAFII, M. S.; AISEN, P. S. *Recent developments in Alzheimer's disease therapeutics*. **BMC Medicine**. Vol. 7,n° 7, 2009.

RAGO, L.DI.; METCAFF,D.;ROBB,L.; D UNN, A.R.. *Role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and granulocyte in the development of an acute neutrophil inflammatory response in mice*. **Blood Journal Hematology Library**. 1996.

RIZZO, A, M.; BERSELLI, P.; ZAVA, S.; MONTORFANO, G.; NEGRONI, M.; CORSETTO, P.; BERRA, B. *Endogenous antioxidants and radical scavengers*. **Advances in Experimental Medicine and Biology**. v. 698, p. 52-67, 2011.

RODRIGUES, F. *A DPOC como uma doença de envelhecimento acelerado*. **Revista Portuguesa de Pneumologia**. Vol.15, n° 4. Lisboa, agosto de 2009.

ROSAS-BALLINA, M.; TRACEY, K.J. *The neurology of immune system: neural reflexes regulate immunity*. **Neuron**, n.64, p.28-32, oct, 2009.

SAKURAI, H., YASUI, H., YAMADA, Y., NISHIMURA, H., SHIGEMOTO, M. *Detection of reactive oxygen species in the skin of live mice and rats exposed to UVA light: a research review on chemiluminescence and trials for UVA protection*. **Photochm Photobiol Sci**. Vol. 4, n° 9, p. 715-720, 2005.

SANTIS, G.C. *Transfusão de Granulócitos*. **Medicina- Ribeirão Preto**. Vol. 32, p. 470-477. Out.-Dez. 1999.

SAPOLSKY,R.M.; MEANEY,M.J. *Maturation of the adrenocortical stress response: neuroendocrine control mechanisms and the stress hyporesponsive period*. **Brain Res**. Vol. 396, n°1,p. 64-16. 1986.

SAPOLSKY,R.M.; ROMERO,L.M.; MUNCK,A.U. *How do glucocorticoids influence stress response? Integrating permissive, suppressive, stimulatory and preparative actions*. **Endocrinology**, Vol. 21, p. 55-89. 2000.

SARAIVA,M.; O´GARRA,A. *The regulation of IL-10 production by immune cells*. **Nature Immunology**. Vol. 20. March 2010.

SATOH, T.; ISHIGE, K.; SAGARA, Y. *Protective effects on neuronal cells or mouse afforded by ebselel against oxidative stress at multiple steps*. **Neuroscience Letters**, v. 371, p. 1-5, 2004.

SCALBERT, A.; WILLIAMSON, G. *Dietary intake and bioavailability of polyphenols*. **The Journal of Nutrition**, v. Supplement, p. 2073-2085, 2000.

SCHRODER, A.K.; RINK, L. *Neutrophil immunity of the elderly*. **Mechanism of Ageing and Development**, v.124, n.1, p.19-24, 1999.

SIES, H. *Strategies of Antioxidant Defenses*. **European Journal of Biochemistry**. v. 215, p. 213-219, 1993.

SKIBOLA, C. F. E.; SMITH, M. T. *Potential health impacts of excessive flavonoid intake*. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 29, p. 375-383, 2000.

SPIRDUSO, W. W., FRANCIS, K. L., MACRAE, P. G. *Physical Dimensions of Aging*. **Human Kinetics**, 2 ed. 2005.

STUART-HAMILTON. *A Psicologia do Envelhecimento. Uma introdução*. **Artmed Editora**, 3ed., p.280. 2002.

SUL, D. *Protective effect of caffeic acid against beta-amyloid-induced neurotoxicity by the inhibition of calcium influx and tau phosphorylation*. **Life Sciences**. Vol. 84, p. 257-262, 2009.

TAKEDA, K.; TANAKA, T.; SHI, W.; MATSUMOTO, M.; MINAMI, M.; KASHIWAMURA, S-I.; NAKANISHI, K.; YOSHIDA, N.; KISHIMOTO, T.; AKIRA, S. *Papel essencial da STAT6 na sinalização de IL-4*. **Nature**, 380, p. 627-630. Abril 1996.

TEIXEIRA, D.; GUARIENTO, M. *Biologia do Envelhecimento*. **Ciência e Saúde coletiva**. Vol. 15, n° 6. Rio de Janeiro. Sep. 2010.

TERMAN, A. *Catabolic insufficiency and aging*. **Annals of New York Academy of Sciences**, v.1067, p 27-36, 2006.

THATCHER, G.R.; BENNETT, B.M.; REYNOLDS, J.N. *NO chimeras as therapeutic agents in Alzheimer's disease*. **Current Alzheimer Disease**, v 3, n 3, p.237-45, jun, 2006.

THRUSH, M.A.; WILSON, M.E.; VAN DYKE, K. *The generation of chemiluminescence by phagocytes cells*. **Methods in Enzymology**, v.21, p.651-668, 1978.

TOSATO, M.; ZAMBONI, V.; FERRINI, A.; CESARINI, M. *The aging process and potential interventions to extend life expectancy*. **Clin Interv. Aging**. Vol. 2, n°3, p. 401-412. 2007.

TRACEY, K.J. *Reflex control of immunity*. **Nature Reviews Immunology**, v.9, p.418-428, June, 2009.

TRIPATHI, P.; TRIPATHI, P.; KASHYAP, L.; SING, V. *The role of nitric oxide in inflammatory reactions*. **FEMS Immunology Medicine Microbiology**, v.51, p 443-52, 2007.

VALLEBUONA, J., RAITERI, M. *Age-related changes in the NMDA receptor/nitric oxide/c GMP pathway in the hippocampus and cerebellum of freely moving rats subjects to transcerebral microdialysis*. **The European Journal of Neuroscience**, v.7, p.694-701, 1995.

VALKO, M., RHODES, C.J., MONCOL, J., IZAKOVIC, M., MAZUR, M. *Free radicals, metals, and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*. **Chemico-Biological Interactions**. v. 160, p. 1-40, 2006.

VENDELBO, M. H.; NAIR, K. S. *Mitochondrial longevity pathways*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1813, p. 634-644, 2011.

VIJAYANAND, P.; SEUMOIS, G.; SIMPSON, L. J.; ABDUL-WAJID, S.; BAUMJOHANN, D.; PANDURO, M.; HUANG, X.; INTERLANDI, J.; DJURETIC, I.M.; ROWN, D. R.; SHARPE, A.H., RAO, A.; ANSEL, K.M.; *Interleukin-4 production by follicular helper T cells requires the conserved IL-4 enhancer hypersensitivity site V*. **Immunity**. Vol. 36, n° 2. p. 175-187. Feb. 2012.

WESSELS ,I.; JANSEN , J.; RINK, L.; UCIECHOWSKI, P. *Immunosenescence of polymorphonuclear neutrophils*. **Scientific World Journal**. v.10, p.145-160, 2010.

WOLF,J.WEINBERGER,B.MAIER,A.WESTENDORP,R. *The effect of chronological age on the inflammatory response of human fibroblasts*. **VOLUME 47**, 2012.

**YANG,JH.LEE,EO.KIM,SE.SUY,YH.CHONG,YH.** *Norepinephrine differentially modulates the innate inflammatory response provoked by amyloid- $\beta$  peptide via action at  $\beta$ -adrenoceptors and activation of cAMP/PKA pathway in human THP-1 macrophages*. **Exp Neuro**. 15 may,2012.

YAP, L. P.; GARCIA, J. V.; HAN, D.; CADENAS, E. *The energy-redox in aging and age-related neurodegeneration*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 61, p. 1283-1298, 2009.