

UNIVERSIDADE CRUZEIRO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO INTERDISCIPLINAR EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE

MARIANA MENDES DE ALMEIDA

**CARACTERIZAÇÃO DA FUNÇÃO E MORTE DE NEUTRÓFILOS
EM MULHERES PRÉ-DIABÉTICAS E DIABÉTICAS: MODULAÇÃO PELA
SUPLEMENTAÇÃO COM ÔMEGA 3**

SÃO PAULO

2019

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA
UNIVERSIDADE CRUZEIRO DO SUL

449e	<p>Almeida, Mariana Mendes de.</p> <p>Caracterização da função e morte de neutrófilos em mulheres pré-diabéticas e diabéticas: modulação pela suplementação com ômega 3. / Mariana Mendes de Almeida. -- São Paulo, 2019. 87 p. : il.</p> <p>Orientadora: Profa. Dra. Adriana Cristina Levada-Pires. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação Interdisciplinar em Ciências da Saúde, Universidade Cruzeiro do Sul.</p> <p>1. Leucócitos. 2. Ácido graxo. 3. Diabetes. I. Levada-Pires, Adriana Cristina. II. Universidade Cruzeiro do Sul. Programa de Pós-Graduação em ciências da saúde. III. Título.</p> <p>CDU: 613.99</p>
------	--

UNIVERSIDADE CRUZEIRO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO INTERDISCIPLINAR EM CIÊNCIAS DA
SAÚDE

**CARACTERIZAÇÃO DA FUNÇÃO E MORTE DE NEUTRÓFILOS EM MULHERES
PRÉ-DIABÉTICAS E DIABÉTICAS: MODULAÇÃO PELA SUPLEMENTAÇÃO
COM ÔMEGA 3**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação Interdisciplinar em Ciências da Saúde, da Universidade Cruzeiro do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciência da Saúde.

Aluna: Mariana Mendes de Almeida
Orientadora: Profa. Dra. Adriana Cristina Levada-Pires

SÃO PAULO

2019

Almeida MM. Caracterização da função e morte de neutrófilos em mulheres pré-diabéticas e diabéticas: modulação pela suplementação com ômega 3. 2019. 93 f. Dissertação Mestrado Interdisciplinar em Ciência da Saúde. Universidade Cruzeiro do Sul, São Paulo: Universidade Cruzeiro do Sul, São Paulo, 2019.

RESUMO

O diabetes *mellitus* (DM) é um problema crescente em todo o mundo. Pacientes diabéticos apresentam alteração na função de neutrófilos associado a um estado de inflamação crônica e redução da capacidade de cicatrização. Os AG podem modular a função e morte de neutrófilos e desta forma alterar a resposta inflamatória. A suplementação com AG poliinsaturados Ômega-3, como o eicosapentaenoico (EPA) e docosahexaenoico (DHA) tem sido utilizada para o controle da inflamação em doenças autoimunes e está relacionada com a redução do risco de aterosclerose e doenças cardiovasculares. No entanto, o efeito da suplementação com Ômega 3 em neutrófilos de mulheres pré-diabéticas e diabéticas ainda permanece a ser melhor elucidado. O objetivo deste estudo foi o de caracterizar o efeito do diabetes na função de neutrófilos de mulheres controle (com glicemia ≤ 100 mg/dL), pré-diabéticas (glicemia ≥ 125 mg/dL) e diabéticas (glicemia ≤ 126 mg/dL).e investigar o efeito da suplementação com Ômega-3 na função e morte de neutrófilos nestes grupos de mulheres. Participaram deste estudo 122 mulheres, acima de 40 anos. Para determinação do efeito do pré-diabetes e diabete na função dos neutrófilos as voluntárias foram inicialmente divididas em 3 grupos 1-) controle, 2) pré-diabéticas e 3) diabéticas. Posteriormente, o efeito da suplementação com Ômega 3 foi avaliado, para isto as mulheres foram subdivididas em 6 grupos 1-) suplementado com lecitina de soja (placebo), 2-) suplementado com Ômega 3, 3-) pré-diabético suplementado com lecitina de soja, 4-) grupo pré-diabético suplementado com Ômega 3, 5-) diabético suplementados com lecitina de soja, 6-) diabético suplementado com Ômega-3. Foi utilizado o suplemento High Ômega com dose diária equivalente a 1,95 g/dia. A suplementação foi realizada por método duplo cego e as avaliações foram determinadas antes e após 3 meses de suplementação. Neutrófilos foram obtidos da corrente sanguínea e as seguintes análises foram realizadas: expressão de moléculas de adesão (CD54 e CD62L), fagocitose, produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e de citocinas, integridade de membrana celular, fragmentação de DNA e polaridade de membrana mitocondrial. Na primeira parte do estudo foi observado que

os grupos pré-diabético e diabético apresentaram um percentual de mulheres com excesso de peso maior do que o grupo controle. Os neutrófilos das voluntárias diabéticas expressaram menos CD54 (ICAM), não alteraram a produção de ERO após estímulo de LPS e apresentaram uma despolarização da membrana mitocondrial. Após a suplementação com Ômega 3 houve aumento da expressão de CD62L e redução de CD54 nos três grupos avaliados. A produção de ERO por neutrófilos estimulados foi inibida no grupo controle e pré-diabético. O grupo diabético permaneceu sem responder ao estímulo. Os neutrófilos sem estímulo do Lipopolissacarídeo (LPS) tiveram a produção das citocinas pro-inflamatórias (TNF α , IL1 β e IL-6) inibida após a suplementação com ômega 3. No entanto, a suplementação induziu a produção de citocinas após estímulo dos neutrófilos com LPS. Os parâmetros de morte dos neutrófilos não foram alterados pela suplementação. A suplementação com lecitina de soja levou a efeitos similares ao do ômega 3 na função de neutrófilos. Concluimos que a suplementação com ômega 3 teve um efeito anti-inflamatório na função dos neutrófilos das mulheres pré-diabéticas e diabéticas, além disso tornou os neutrófilos mais responsivos a estímulo para produção das citocinas pró e anti-inflamatórias. Esses efeitos poderiam auxiliar no controle da resposta inflamatória crônica verificada em pacientes diabéticos.

Palavras Chave: Leucócitos, Diabetes, citocinas, moléculas de adesão, EPA, DHA

Almeida MM. Characterization of neutrophil function and death in pre-diabetic and diabetic women: modulation by omega 3 supplementation. 2019. 93 f. Dissertation Interdisciplinary master's in health sciences. Cruzeiro do Sul University, São Paulo: Cruzeiro do Sul University, São Paulo, 2019.

ABSTRACT

Diabetes mellitus (DM) is a growing problem worldwide. Diabetic patients have altered neutrophilic function associated with a state of chronic inflammation and reduced healing capacity. GA can modulate neutrophil function and death and thus alter the inflammatory response. Omega-3 polyunsaturated GA supplementation, such as eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA), has been used to control infection in autoimmune diseases and is useful in reducing the risk of atherosclerosis and cardiovascular disease. However, the effect of omega 3 supplementation on neutrophils in pre-diabetic and diabetic women remains the best elucidated one. The aim of this study was to characterize the effect of diabetes on neutrophil function in control (glycemia ≤ 100 mg / dL), prediabetic (glycemia ≥ 125 mg / dL) and diabetic (glycemia ≤ 126 mg/ dL) women. Omega-3 supplementation in neutrophil function and death in these groups of women. A total of 122 women over 40 years old participated in this study. To determine the effect of pre-diabetes and diabetes on neutrophil function, the volunteers were divided into 3 groups: 1) control, 2) pre-diabetic and 3) diabetic. Subsequently, the effect of omega 3 supplementation was evaluated, for example, women were subdivided into 6 groups 1-) supplemented with soy lecithin (placebo), 2-) supplemented with pre-diabetic omega 3, 3-) supplemented with soy lecithin; 4-) pre-diabetic group supplemented with omega 3; 5-) diabetic supplement group with soy lecithin; 6-) omega-3 diabetic supplement group. High omega with a daily dose equivalent to 1.95 g / day was used or supplemented. Supplementation was performed by the double-blind method and evaluations were used before and after 3 months of supplementation. Neutrophils were submitted to the bloodstream and were performed: adhesion molecule expression (CD54 and CD62L), phagocytosis, production of reactive oxygen species (ROS) and cytokines, cell membrane integrity, DNA fragmentation and mitochondrial membrane polarity. In the first part of the study, pre-diabetic and diabetic groups were observed, with a higher percentage of overweight women than the control group. Neutrophils from diabetic volunteers express less CD54 (ICAM), do not alter the production of ROS after stimulation with LPS

and observe a mitochondrial membrane depolarization. After omega 3 supplementation, there was an increase in CD62L expression and a reduction in CD54 in the three reference groups. ROS production by stimulated neutrophils was inhibited in the control and pre-diabetic group. The diabetic group remained unresponsive to the stimulus. Neutrophils without lipopolysaccharide stimulation (LPS) had the production of proinflammatory cytokines (TNF α , IL1 β and IL-6) inhibited after omega 3 supplementation. However, supplementation induced cytokine production after neutrophil use with LPS neutrophil death parameters were not altered by supplementation. Soy lecithin supplementation led to similar effects to omega 3 on neutrophil function. We conclude that omega 3 supplementation had an anti-inflammatory effect on the neutrophil function of pre-diabetic and diabetic women, in addition to becoming the most responsive neutrophils, stimulating the production of proinflammatory cytokines. These effects help control the chronic inflammatory response in diabetic patients.

Keywords: Leukocytes, Diabetes, Cytokines, Adhesion Molecules, EPA, DHA

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo o suporte e apoio fornecido para a realização deste trabalho.

À minha orientadora, Profa. Dra. Adriana Levada-Pires por acreditar e depositar, confiança para realizar este projeto. Por toda a dedicação e paciência para ensinar, tirar as dúvidas que sempre surgem.

À Profa. Dra. Renata Gorjão e Prof. Dr. Sandro Massao Hirabara, pela oportunidade de fazer parte desse projeto.

Às minhas amigas por sempre estarem ao meu lado nesta jornada que começou na graduação, e que perpetuou até o término da minha pós-graduação. Eliane borges, Sarah Poma, Raquel Zambonato, Paola Domenech e que dure para sempre. Não é sempre que temos amigas para te auxiliar, nos experimentos, apresentações, correções de relatórios. Um grupo bem unido e fortalecido haja o que houver.

Aos demais professores e alunos do ICAFE, envolvidos no projeto, sempre em prontidão para sanar dúvidas e colaboração.

À minha namorada pela paciência e compreensão, apoio, segurança ao longo desse projeto.

Aos órgãos de fomento, CNPQ, CAPES e FAPESP pelo apoio financeiro. E a Universidade Cruzeiro do Sul.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 Diabetes.....	10
1.2 Neutrófilos.....	12
1.3 Função dos Neutrófilos.....	13
1.4 Diabetes e Neutrófilos.....	19
1.5 Leucócitos e Ácidos graxos.....	20
1.6 Ômega 3.....	21
2. OBJETIVO	24
2.1 Objetivo Geral.....	24
2.2 Objetivo Específico.....	24
3. MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Casuística.....	25
3.2 Critérios de Exclusão.....	27
3.3 Suplementação.....	27
3.4 Avaliação Física.....	29
3.5 Avaliação da Composição Corporal.....	29
3.6 Estatura Total e Massa Corpórea.....	29
3.7 Índice HOMA.....	29
3.8 Obtenção e Isolamento dos Neutrófilos Humanos.....	30
3.9 Avaliação da Função dos Neutrófilos.....	30
3.10 Avaliação da Expressão da CD62 (L-Selectina) e CD54 (ICAM-1).....	30
3.10.1 Avaliação Fagocitária de Neutrófilos.....	31
3.10.2 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) por citometria de fluxo.....	31
3.10.3 Avaliação da Produção de Citocinas pelos Neutrófilos.....	31
3.10.4 Determinação da Integridade de Membrana Celular.....	32
3.10.5 Alteração do Potencial de Membrana Mitocondrial.....	32
3.10.6 Determinação da Fragmentação de DNA.....	33
3.10.7 Avaliação da Produção de Citocinas pelos Neutrófilos.....	33
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	34

5. RESULTADOS	35
5.1 Função de neutrófilos em mulheres pré-diabéticas e diabéticas	35
5.1.1 Caracterização das amostras	35
5.1.2 Função de neutrófilos em mulheres pré-diabéticas e diabéticas	37
5.1.2.1 Avaliação de Expressão de L-Selectina (CD62L)	37
5.1.2.2 Avaliação de Expressão de ICAM-1 (CD54)	38
5.1.2.3 Avaliação de Fagocitose	38
5.1.2.4 Avaliação da Produção de Espécies Reativas de Oxigênio	39
5.1.2.5 Produção de citocinas	39
5.1.2.6 Avaliação da Viabilidade Celular	41
5.1.2.7 Avaliação da Fragmentação de DNA	42
5.1.2.8 Análise de Polaridade Mitocondrial	42
5.2 Efeito da suplementação com ômega 3 na função de neutrófilos de mulheres pré-diabéticas e diabéticas	43
5.2.1 Caracterização da Amostra	43
5.2.2 Função de neutrófilos em mulheres dos grupos controle, pré-diabéticas e diabéticas	46
5.2.2.1 Avaliação de Expressão de L-Selectina (CD62L)	46
5.2.2.2 Avaliação de Expressão de ICAM-1 (CD54)	47
5.2.2.3 Avaliação de Fagocitose	48
5.2.2.4 Avaliação da Produção de Espécies Reativas de Oxigênio	49
5.3 Avaliação da Produção de Citocinas	51
5.3.1 Avaliação da Citocina TNF α	51
5.3.2 Avaliação da Citocina IL-1 β	52
5.3.3 Avaliação da Citocina IL-6	53
5.3.4 Avaliação da citocina IL-12p70	54
5.3.5 Avaliação da Viabilidade Celular	56
5.3.6 Análise de Polaridade Mitocondrial	58
5.4 Resumo dos Resultados Encontrados	59
6. DISCUSSÃO	61
7. REFERÊNCIAS	71
8. ANEXOS	85
8.1 Anexo 1	85
8.2 Anexo 2	86
8.3 Anexo 3	88
8.4 Anexo 4	89

8.5 Anexo 5.....	90
8.6 Anexo 6.....	92

1. INTRODUÇÃO

1.1 Diabetes

O diabetes *mellitus* (DM) é um problema crescente em todo o mundo. Aproximadamente 8,8% das 7,6 bilhões pessoas que compõe a população mundial, com idade entre 20 a 79 anos de idade, possui DM (ONU, 2019, *International Diabetes Federation*, IDF, 2017). Em 2015, em torno de 415 milhões de adultos desenvolveram DM, porém em 2040 esta estatística pode aumentar para 642 milhões (IDF, 2015). Na América Central e do Sul, a estimativa é de que 26 milhões de pessoas apresentam DM. O problema tornasse ainda mais grave quando a estatística demonstra que na América Latina aproximadamente 40% das pessoas com DM não sabem que possuem a doença e não realizam nenhum tipo de tratamento. No Brasil 12,5 milhões de pessoas apresentam DM *mellitus* (IDF,217; Sociedade Brasileira de Diabetes, SBD, 2017-2018).

A incidência de DM está relacionada com fatores epidemiológicos, nutricionais, sedentarismo, sobrepeso e obesidade (SBD, 2017-2018).

O DM é caracterizado por um quadro de hiperglicemia provocado por falha na produção ou na ação da insulina. A ação deficiente da insulina pode ser decorrente de uma secreção inadequada pelas células β pancreáticas ou redução da resposta tecidual a ação deste hormônio (*American Diabetes Association*, ADA, 2010). O DM tipo 1 (DM1) e tipo 2 (DM2) são os mais comumente encontrados. O DM1, é decorrente de destruição ou perda de função das células β pancreáticas o que resulta em redução ou inibição da produção de insulina. A destruição das células β pode ser provocada por alteração autoimune, inflamação ou apoptose (ATKINSON & MACLAREN, 1994; DONATHAND et al., 2004; CHIANG et al.,2014; INSEL et al., 2015). Já o DM tipo 2 é mais prevalente na população do que o DM tipo 1 e está associado com o acúmulo do tecido adiposo visceral (KAHN ,2000; COLDITZ et al., 1995; MOKDAD et al., 2003). Este tipo de DM é considerado uma doença metabólica complexa caracterizada por resistência tecidual à ação da insulina, a qual pode evoluir para redução ou inibição da secreção deste hormônio (FORD, et al 2002). Inicialmente

a resistência tecidual à ação da insulina promove o aumento na produção deste hormônio, na tentativa de estabilizar a glicemia (DICKSON E RHODES, 2004) porém, há um desequilíbrio da glicemia, sendo observado uma hiperglicemia simultânea ao aumento da secreção de glucagon. Ocorre ainda, aumento da produção hepática de glicose, lipólise e da concentração de ácidos graxos (AG) livres circulantes (DeFRONZO et al., 2004, 2009). O aumento da produção de glicose pelo fígado é observado no estado basal, apesar da presença da hiperinsulinemia em jejum (KASHYAP et al., 2003) e supressão prejudicada da produção de glicose hepática em resposta à insulina (GROOP et al., 1989), como ocorre no estado pós-prandial (DEFRONZO et al., 1989).

A glicemia é utilizada como critério de diagnóstico clínico para DM (Sociedade Brasileira de Diabetes, 2018). Outro fator utilizado é a hemoglobina glicada. O *Diabetes Control and Complications Trial* (DCCT) em 1987 considerou este parâmetro como um exame padrão ouro para o controle metabólico do DM1 (ADA, 2010). A *Associação Americana de Diabetes* (ADA) recomenda que o diagnóstico do DM seja dado pela análise da concentração de glicose no sangue em jejum e/ou concentração de glicose no plasma 2 horas após ingestão de 75g de glicose. A porcentagem de hemoglobina glicada também é utilizada para o diagnóstico (ADA, 2019). De acordo com os resultados obtidos nos exames, os pacientes podem ser classificados como pré-diabéticos ou diabéticos.

O pré-diabetes é um sinal para o risco não só do DM, mas também de doença cardiovascular e está associado à obesidade, sobretudo obesidade abdominal ou visceral (ADA, 2019). O DM pode levar a consequências como: neuropatia diabética (LIMA et al., 2017), nefropatia (DeFronzo, 1995; ADA, 2004), retinopatia diabética (IDF, Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia, 2017), alteração vascular (ZHANG et al., 2012; IDF, 2015), alteração na cicatrização (HATANAKA, 2007), alteração no processo inflamatório (HATANAKA, 2006) e alteração do sistema imune (ALBA-LOUREIRO, 2006, 2007). Além disso, o DM altera a liberação de mediadores químicos denominados citocinas ou interleucinas.

As citocinas apresentam efeitos pró ou anti-inflamatórios. Dentre as citocinas pró-inflamatórias estão: IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF α . As citocinas anti-inflamatórias possuem o propósito de controlar a inflamação, são exemplos destas: IL-4, IL-10 e IL-

13 (SMITH 2000, MOLDOVEANU et al., 2001). Indivíduos diabéticos apresentam excesso na produção da citocina pró-inflamatória TNF- α (ASNAGHI et al., 2003; KOYA E KING, 1998) quando comparado a indivíduos com glicemia normal (até 100 mg/dL). O aumento na concentração plasmática de TNF- α associado a elevação na concentração de glicose, leva a alteração do estímulo e a ativação do fator NF-kapa B (IWASAKI et al., 2007; YERNENI et al., 1999), o qual é responsável pelo controle da produção de citocinas e resposta inflamatória em leucócitos.

Outro ponto importante regulado pelo DM é a via de ativação do TLR4 em células imunes inatas, como monócitos e macrófagos (KHONDKARYAN et al., 2018) e neutrófilos KUWABARA et al., 2018). Deste modo, o DM pode levar a alteração no início e restabelecimento de quadros inflamatórios.

De fato, estudos já demonstraram que pacientes diabéticos apresentam prejuízo na cicatrização e resolução de processos inflamatórios (HATANAKA, et al. 2007), os quais podem estar relacionados com alteração na função de leucócitos, assim como os neutrófilos, responsáveis pelo início e sustentação do processo inflamatório (ALBA-LOUREIRO et al 2006, 2007).

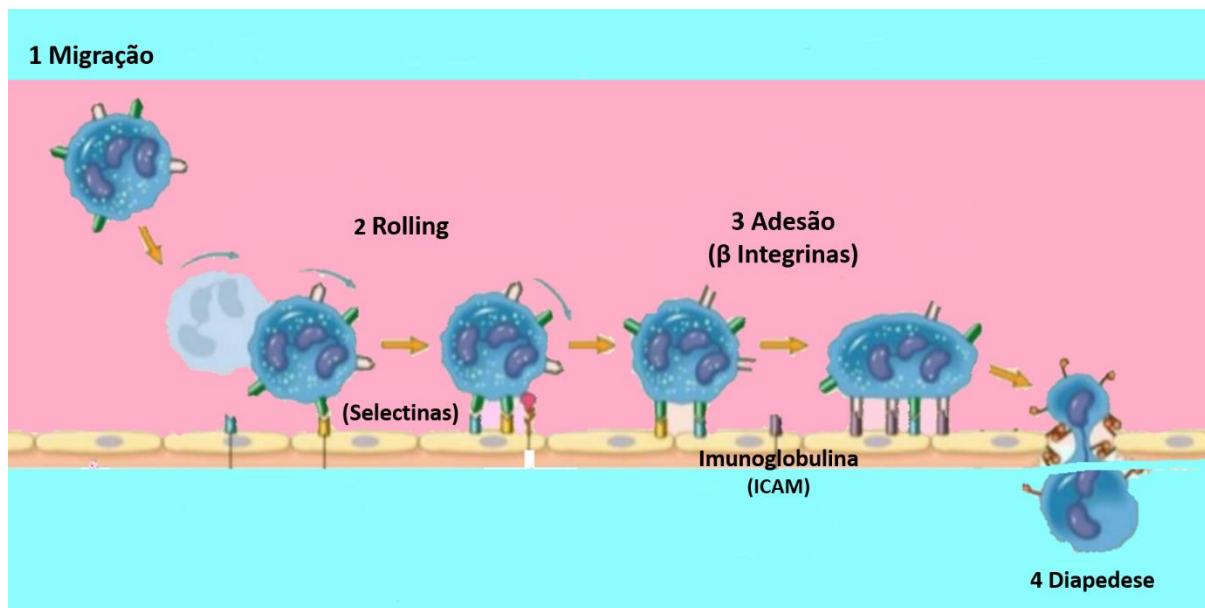
1.2 Neutrófilos

Os neutrófilos são produzidos na medula óssea a partir de células pluripotenciais. Diariamente são liberados na circulação aproximadamente $0,8-1,6 \times 10^9$ neutrófilos por Kg de peso corpóreo (AKGUL; MOULDING e EDWARDS, 2001; MAIANSKI et al., 2004). As células maduras apresentam um núcleo segmentado em 3 a 5 lóbulos ligados entre si por finas pontes de cromatina, por isso são chamados de leucócitos polimorfonucleares (ABBAS, 2012). No entanto, a célula muito jovem tem núcleo não segmentado em lóbulos em forma de ferradura, sendo chamada de neutrófilo com núcleo em bastonete ou bastões (SILVERTHORN et al., 2011). No citoplasma dos neutrófilos existem três tipos de grânulos: os primários ou azurófilos, o secundário ou específicos e os terciários. A distinção entre estes é realizada de acordo com a cronologia do aparecimento durante o processo de maturação dos neutrófilos na medula óssea e com a composição química de cada tipo, o que determina as diferenças em suas funções (FAURSCHOU e BORREGAARD, 2003). As enzimas presentes no interior dos grânulos dos neutrófilos

auxiliam na lise de bactérias e agentes invasores. Os neutrófilos podem ser ativados por citocinas e quimiocinas liberadas por células secretoras, assim como: neutrófilos residentes, mastócitos e basófilos (LAGRANHA et al., 2005). Após sua ativação, a resposta neutrofílica envolve migração para o local lesionado, fagocitose das partículas mortas e/ou micro-organismos invasores, produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e liberação de citocinas pró e anti-inflamatórias (BALBINO; PERREIRA e CURI, 2005), responsáveis pelo controle do processo inflamatório.

1.3 Função dos Neutrófilos

Os neutrófilos são considerados a primeira linha de defesa do organismo, pois são as primeiras células a chegarem ao local lesionado (WALSH, et al., 2011; KOBAYASHI; VOYICH; DELEO, 2003). Estas células saem da circulação sanguínea após entrarem em contato com substâncias quimioatraentes e realizarem adesão ao endotélio vascular e diapedese (passagem do neutrófilo entre as células endoteliais) (MANTOVANI et al 2011) (Esquema 1).



Esquema 1. Sequência esquemática do neutrófilo. Os neutrófilos presentes na circulação (1) iniciam a marginação devido à diminuição da velocidade do fluxo sanguíneo e aumento da força de adesão devido interações leucócito endotélio. O rolling ocorre devido à interação de L selectina presente na membrana dos neutrófilos com moléculas presentes nas células endoteliais (2). A adesão dos neutrófilos às células endoteliais através interação das integrinas presentes na membrana dos neutrófilos com as imunoglobulinas presentes no endotélio (ICAM) (3) e, extravasam para o espaço extravascular através das junções interendoteliais (4) sendo guiados pelo gradiente quimiotático até o foco inflamatório. FONTE: <https://veteriankey.com/inflammation-and-healing/>. Acesso em: 21/06/2018 (modificado).

As moléculas de adesão desempenham um papel importante na interação entre células endoteliais e neutrófilos (PATARROYO e MAKGOBA, 1989). Estas moléculas compõem a família das selectinas e integrinas, as quais interagem com ligantes específicos e possibilitam a migração dos neutrófilos para os sítios de inflamação. O processo migratório inicia-se através da interação entre ligantes de selectinas presentes nas células endoteliais (P-Selectina e E-Selectina) com receptores presentes na membrana dos neutrófilos (L-Selectina). A L-selectina (CD62) é a principal proteína responsável pela adesão e rolamento do neutrófilo na parede do vaso sanguíneo (DELVES; ROITT, 2000; MAYADAS et al 2013). Dentre os membros da família das integrinas as moléculas CD11/CD18 são as mais abundantes nos neutrófilos (ARNAOUT, 1990). As moléculas CD11/CD18 fazem parte de uma família de glicoproteínas de superfície celular, composta por 3 heterodímeros que compartilham uma subunidade β comum (CD18) com uma subunidade α distinta (CD11a, CD11b, CD11c). As três cadeias da família CD11/CD18 têm pesos moleculares de 177 kD (CD11a, LFA-1), 165 kD (CD11b, CR3) e 150 kD (CD11c, p150, 95) e são produtos de três genes separados (CORBI et al., 1988). As ligações das subunidades α e β acontecem no aparelho de Golgi e os receptores agrupados são transportados para a superfície celular ou para os depósitos intracelulares onde exercem suas funções (HARLAN, 1985).

A adesão e diapedese do neutrófilo ao endotélio também são mediadas por moléculas na superfície do endotélio assim como a ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) (CD54), a qual é uma glicoproteína da superfamília das imunoglobulinas (DIAMOND, 1990; BEVILAQUA et al., 1994; SOLOVEY et al., 2001). Os neutrófilos aderem-se às células endoteliais através interação das integrinas presentes na membrana dos neutrófilos com as imunoglobulinas presentes no endotélio (ICAM) e, extravasam para o espaço extravascular através das junções interendoteliais.

Após migrarem até o local lesionado, os neutrófilos reconhecem e fagocitam os microrganismos invasores por meio de receptores presentes em sua membrana celular. A fagocitose envolve duas classes de receptores, os receptores Fcy – FcyRIIA (CD32) e FcyRIIIB (CD16), e os receptores do complemento CR-1 (CD35) e CR3 (CD11b/CD18 integrina) (Witko-Sarsat et al., 2000). Os receptores CD11b e CD18 também atuam no processo de reconhecimento do microorganismo invasor (WITKO-SARSAT et al., 2000). O receptor para complemento do tipo 1 (CR1),

também denominado CD35 ou receptor para C3b/C4b é uma glicoproteína intrínseca de membrana das células leucocitárias (Fearon, 1980) que está relacionado com a fagocitose de partículas opsonizadas por C3b e C4b (MEDOF et al., 1982).

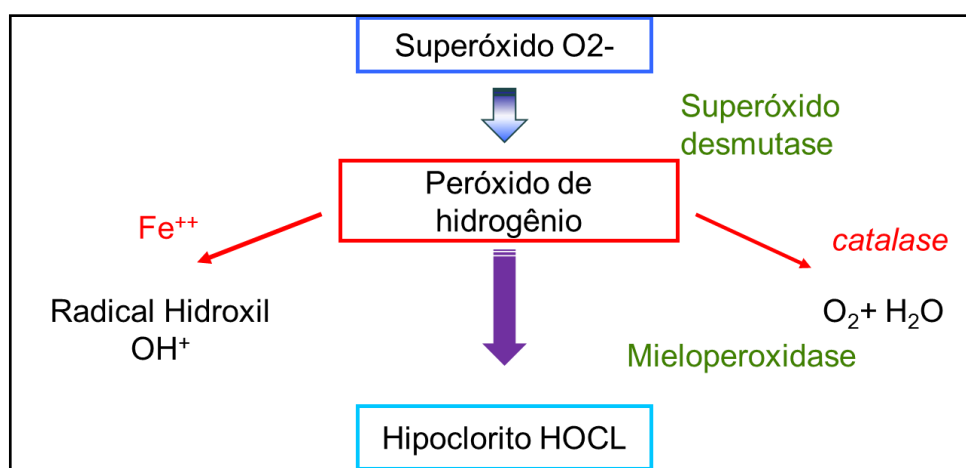
Durante a fagocitose a internalização do patógeno ocorre pela emissão de projeções da membrana (pseudópodes) destas células até que o patógeno seja completamente internalizado no vacúolo fagocítico este por sua vez, funde-se com o lisossomo para que ocorra a digestão do conteúdo internalizado (COHEN et al., 1994; LOHMAN et al., 1988, STUART; EZEKOWITZ, 2005; KOLACZKOWSKA et al., 2013).

A fagocitose realizada por neutrófilos induz a ativação do complexo enzimático NADPH-oxidase (nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato-oxidase), o qual é responsável pela geração de espécies reativas de oxigênio (ERO) (KLEBANOFF, 2005; HAGER, 2010).

A enzima NADPH-oxidase está localizada na membrana plasmática das células de origem mesodérmica e leucocitária (BABIOR, 1999). Esta enzima converte a molécula de oxigênio (O_2) em ânion superóxido (O_2^-), uma potente ERO, utilizando o NADPH como doador de elétrons (CLARK et al., 1990; DUSI; DONINI; ROSSI, 1996, DINAUER et al., 2014). Para a geração do ânion superóxido a NADPH-oxidase ativa proteínas localizadas no citosol assim como: p47^{phox}, p40^{phox}, p67^{phox}, proteínas G, Rac1 e Rac2 (CHAMOCK et al., 1994; GROEMPING et al., 2005) e proteínas de membrana que compõe o flavocitocromo b558, como: gp91^{phox} e p22^{phox} (VIGNAIS, 2002). Quando os neutrófilos são ativados ocorre fosforilação e ativação do componente p47^{phox}, responsável por recrutar e transportar os demais componentes do citosol (p40^{phox} e p67^{phox}) em direção a membrana celular. Posteriormente ocorre o acoplamento destes ao citocromo b558 (EI-BENNA et al., 1994; FAUST et al., 1995; QUINN E GAUSS, 2004; GROEMPING et al., 2005). Membros da superfamília Ras da proteína ligadora de GTP: Rac 1 e/ou Rac 2 (HEYWORTH et al., 1994) e PKC regulam o funcionamento do complexo da enzima NADPH-oxidase. A PKC auxilia na fosforilação do componente p47^{phox} (DE A PAES et al., 2011).

O ânion superóxido gerado pela oxidase pode ser dismutado a peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e este por meio da oxidação de Cl^- catalisada pela mieloperoxidase pode gerar ácido hipocloroso (HOCl) (Babior et al., 2004). O equilíbrio entre a

produção e a remoção das ERO é importante para o controle da lesão e restabelecimento do processo inflamatório, pois o excesso de ERO leva ao aumento da lesão celular e tecidual, além de contribuir para indução de morte celular (SMITH, 1994, Narayanan et al., 1997). Por outro lado, a falta de ERO reduz a capacidade microbicida dos neutrófilos facilitando a instalação de infecção.



Esquema 2. Produção de espécies reativas de oxigênio por neutrófilos. O ânion superóxido por ser instável, é convertido pela ação da superóxido desmutase em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e este pode gerar ácido hipoclorito ($HOCl$). Por sua vez o peróxido de hidrogênio combinado mais ação do ferro gera Radical hidroxil. Modificado (BABIOR, 2004).

Além das ERO, a ação microbicida desenvolvida pelos neutrófilos depende também da liberação de proteínas e enzimas presentes nos grânulos citoplasmáticos dos neutrófilos (BABIOR et al., 2005). Os grânulos secundários apresentam lactoferrina, lisozima, gelatinase, fosfatase alcalina e proteínas ligantes a B12, e não contém peroxidase (BORREGAARD et al., 1993; BORREGAARD e COWLAND, 1997). Os grânulos terciários contém gelatinase, uma enzima com grande similaridade a colagenase neutrofílica e a heparanase (MOLLINEDO et al., 1997).

O controle da inflamação pelos neutrófilos também é realizado pelas citocinas e quimiocinas (PYNE, 1994). Os neutrófilos produzem citocinas anti e pró inflamatórias, além disso também apresentam receptores de superfície celular específicos para os diferentes tipos de citocinas (FUTOSI et al., 2013). Os neutrófilos produzem citocinas pró- ($IL-1\alpha$, $IL-1\beta$, $IL-6$, $IL-8$, $IL-9$, $IL-16$, $IL-17$, $IL-18$ e MIF) que ativam e atraem outros leucócitos assim como monócitos, linfócitos T e B para o local da lesão ou inflamação (SELVATICI et al., 2006; RIGBY e DELEO 2012; KIELIAN et

al., 2004; EI-BENNA et al., 2016, CASSATELLA 1999; SCAPINI et al., 2000; MANTOVANI et al., 2011). Além destas, os neutrófilos também produzem citocinas anti-inflamatórias (IL-1ra, IL-4, TGF1 β e TGF1 β) (Tecchio, Micheletti et al. 2014) .

Dentre as citocinas liberados por linfócitos, macrófagos e monócitos residentes estão o TNF- α e a IL-1 β , as quais auxiliam no recrutamento de neutrófilos circulantes para o local da lesão ou infecção (KOLACZKOWSKA; KUBES 2013).

O TNF α pode ser secretado por fagócitos mononucleares, neutrófilos, linfócitos, células endoteliais e mastócitos (MATTHEWS et al., 1987; KOBAYASHI et al 1989; BAGGIOLINI et al., 1997). Esta citocina desempenha funções importantes sobre a proliferação celular, necrose e apoptose (TRACEY et al., 2008). Além disso, aumenta atividade fagocítica de fagócitos, induz liberação de enzimas lisossomais e estimula a produção de superóxido (KLENANOFF et al., 1997). Deste modo, o TNF α apresenta função fundamental na dinâmica da resposta inflamatória (CRUVINEL et al., 2010).

A IL-1 β , é uma das formas moleculares de IL-1, sendo produzida por neutrófilos, monócitos, macrófagos e células dendríticas, importantes marcadores de indução da resposta inflamatória (FERRERO-MILIANI et al., 2007). É expressa também em neurônios nociceptivos do gânglio da raiz dorsal (LIN et al., 2000; ZHANG et al., 2007; RAEBURN et al., 2002). Possui função pró-inflamatória e regula moléculas de adesão celular e o extravasamento das células do vaso para o tecido (DEJANA, BERTOCCHI et al. 1988, SMITH, 2000).

A citocina IL-6 está relacionada com controle de respostas inflamatórias (AKIRA et al., 1993), podendo exercer papel pró ou anti-inflamatório. Numa condição pró-inflamatória promove maturação e ativação de neutrófilos, macrófagos e diferenciação e manutenção de linfócitos-T. Contudo, também exerce propriedades anti-inflamatórias durante a lesão, por liberar receptores solúveis de TNF α (LIN et al., 2000; CURFS et al., 1997; RAEBURN et al., 2002).

A citocina anti-inflamatória IL10 inibe a liberação das citocinas pró-inflamatórias, principalmente TNF, IL-1 e IL-6, produzidas por macrófagos e monócitos ativados, estimulando a produção endógena de citocinas anti-inflamatórias (Zhang et al., 2007; CURFS et al., 1997). Deste modo, reduz a produção de mediadores

inflamatórios, incluindo as citocinas e quimiocinas liberadas por neutrófilos (CASSATELLA et al. 1993; KASAMA et al. 1994).

A resolução do processo inflamatório depende do controle da ativação e da morte de leucócitos que migraram para o local da lesão. Classicamente são descritos dois processos de morte celular: a apoptose e a necrose. No entanto, atualmente outros tipos de morte celular têm sido descritos assim como: apoptose, necrose, necrose secundária, aponecrose, autofagia, oncose e senescência. A ocorrência destes depende de condições específicas, incluindo o meio e o estado da célula (RYTER et al., 2007). Alterações morfológicas e bioquímicas permitem a distinção entre os tipos de morte celular (KERR WYLLIE; CURRIE, 1980).

Em 1972, KERR, WYLLIE e CURRIE introduziram o termo apoptose como um processo de morte celular programada que ocorre em situações como inflamação, mecanismo de defesa, injúria dano celular, processo de reposição celular e senescência, (LIMA et al., 2007; GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007).

Quando liberados da medula óssea, os neutrófilos permanecem por curto período na circulação (8-20 horas) e nos tecidos (1 a 4 dias), em seguida morrem por apoptose. A apoptose é caracterizada por alterações morfológicas e bioquímicas que levam a fragmentação do DNA (ácido desoxirribonucleico), condensação da cromatina, despolarização da membrana mitocondrial e externalização da proteína fosfatidilserina. Durante este processo ocorre formação de bolhas na membrana plasmática, as quais se desprendem da célula e dão origem aos corpos apoptóticos, assim a célula vai reduzindo de tamanho (MACFARLANE, 2009) e não perde seu conteúdo intracelular. A mitocôndria muda de forma, formando *clusters* perinucleares, (MAIANSKI, 2003) onde as proteínas pró-apoptóticas se fundem e promovem a permeabilização da membrana mitocondrial, possibilitando a liberação de proteínas mitocondriais pró-apoptóticas assim como o citocromo c (NEWMAYER; FERGUSON-MILLER, 2003).

Os sinais de morte ou de sobrevivência celulares podem ser regulados por proteínas reguladoras da família Bcl-2 que podem ativar ou proteger da apoptose. As proteínas desta família dividem-se em duas subfamílias com ação anti-apoptótica (Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 e A1/Bfl-1) ou pró-apoptótica (Bax, Bak, Mtd/Bok e Bcl-rambo)

(SHIMIZU et al., 1998). Alterações na expressão, localização subcelular, estado de fosforilação e processamento proteolítico das proteínas da família Bcl-2 modulam o programa de morte celular (KORSMEYER, 1995; MAYER e OBERBAUER, 2003; BONER, 2003).

Já foi descrito que o DM1 e tipo 2 pode alterar a função e morte de neutrófilos (ALBA-LOUREIRO et al., 2007; HATANAKA et al., 2006)

1.4 Diabetes e Neutrófilos

A função de neutrófilos é alterada em ratos e camundongos diabéticos (ALBA-LOUREIRO et al., 2007). ALBA-LOUREIRO et al., (2006) demonstraram em ratos diabéticos que a atividade fagocitária e a produção de peróxido de hidrogênio, estimulada por acetato de forbol miristato (PMA), foi menor em neutrófilos de ratos diabéticos quando comparado com controles. Em 2008, estes autores demonstraram ainda que a produção e a liberação de IL-1 β , TNF α , IL-10 e CINC (quimioatrativo de neutrófilo induzido por citocina-2alfa-beta) foi reduzida em neutrófilos ativados coletados da cavidade peritoneal de ratos diabéticos quando comparado a ratos controles. Alba-Loureiro e colaboradores sugeriram que a diminuição da produção de CINC pode estar relacionada ao aumento do processo de morte celular (ALBA-LOUREIRO et al., 2008). Vale a pena destacar que o tratamento dos ratos com insulina aboliu este efeito observado. Os autores sugeriram que a redução na função poderia estar envolvida no desequilíbrio da resposta inflamatória e aumento da apoptose de neutrófilos observado no DM (ALBA-LOUREIRO et al., 2008).

Em outro estudo HATANAKA e colaboradores verificaram que, em condições basais, isto é, na ausência de estímulo, os neutrófilos de pacientes diabéticos tipo 2 apresentaram uma maior expressão de interleucinas pro-inflamatórias, assim como IL-8, IL-1 β , TNF α e IL-1ra. O mesmo foi observado para as citocinas IL-8, IL-1 β e TNF α após estímulo com LPS (Lipopolissacarídeo) (HATANAKA et al., 2006).

O processo de morte celular dos neutrófilos também é modificado pelo DM. Em ratos, o DM *mellitus* induzido por estreptozotocina, levou ao aumento da morte de neutrófilos ativados após cultivo com PMA por 1 hora. Estes leucócitos apresentaram

diminuição da integridade da membrana plasmática, aumento da fragmentação do DNA e despolarização da membrana mitocondrial (KUWABARA et al., 2017).

Ratos Goto-Kakizaki (GK) desenvolvem DM tipo 2 espontaneamente (Goto et al., 1976). KUWABARA et al., (2018) demonstraram que, em condições basais sem estímulos, os neutrófilos destes animais morreram por apoptose, verificada pela perda da integridade de membrana celular e ativação da caspase 3. O aumento da apoptose de neutrófilos poderia estar relacionado com a redução da migração e da resposta ao estímulo de LPS utilizado para estimular a produção de citocinas (KUWABARA et al., 2018).

As alterações na função e morte de neutrófilos podem contribuir para o aumento de infecções observado em diabéticos (GEERLINGS e HOEPELMAN, 1999).

Nosso grupo já demonstrou em estudos anteriores que os AG também podem modular a função e morte de neutrófilos (GORJÃO et al., 2006; LEVADA-PIRES et al., 2008; CURY-BOAVENTURA et al., 2008; PASCOAL et al., 2013). Dessa forma, a suplementação com AG poderia ser utilizada no controle dos efeitos deletérios do DM *mellitus*.

1.5 Leucócitos e Ácidos graxos

Situações ou patologias que alteram a concentração plasmática de AG, assim como jejum prolongado, exercício físico intenso e DM *mellitus* levam a modulação da função de leucócitos circulantes (YAQOOB, 1998; CALDER, et al., 2002). Já foi descrito que a dieta induz a alteração na composição dos AG e fosfolípidios de membrana em macrófagos e linfócitos (CALDER, 2008).

Os AG modulam a função de leucócitos por meio de alteração na composição de sua membrana celular (MADANI, et al, 2001); ativação de receptores (ADEREM E ULEVITCH, 2000); ativação vias de sinalização (YESSOUFOU et al., 2006) e formação de segundos mensageiros (ALLEVA et al, 2002).

Os AG podem ser incorporados nas membranas celulares na forma de fosfolípidios, participar na sinalização intracelular, ativação/inibição de fatores de transcrição e consequente modulação da expressão de genes (MARTINS DE LIMA et

al., 2007; CURI et al., 2002; SINGER et al., 1972), alterando assim a função celular. Já foi descrito que os AG atuam como moléculas biologicamente ativas na regulação de várias funções do sistema imune, assim como proliferação de linfócitos, produção de citocinas e de moléculas de adesão em macrófagos, fagocitose e quimiotaxia de neutrófilos e de macrófagos (KEW et al., 2003, KELLEY et al., 1999; CALDER, 2001; THIES et al., 2001; CALDER et al., 1990; ZHENG et al., 1999).

A modulação da função dos leucócitos e citotoxicidade exercida pelos AG varia de acordo com o comprimento da cadeia de carbono e com o número de duplas ligações (LIMA et al., 2002). Desta forma, os diferentes tipos de AG podem modular o sistema imune de modo distinto, podendo exercer aumento ou inibição das funções dos leucócitos.

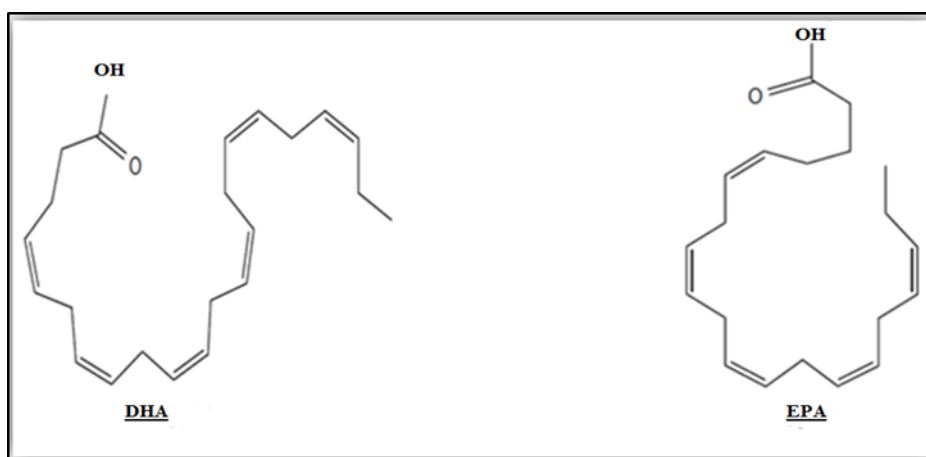
1.6 Ômega 3

Os AG são ácidos carboxílicos que desempenham um papel importante no metabolismo de leucócitos, podendo ser classificados de acordo com o número de carbonos em sua cadeia, em AG de cadeia curta (de dois a quatro átomos de carbono), AG de cadeia média (de seis a dez átomos de carbono) e AG de cadeia longa (acima de doze átomos de carbono) (CURI et al., 2002; MANHEZI et al., 2008; LIMA et al., 2007).

Os AG são também classificados conforme a presença de duplas ligações (instaurações) entre as cadeias de carbono. Desta forma podem ser chamados de AG saturados na ausência de duplas ligações, monoinsaturados por conter presença de uma instauração ou AG poliinsaturados, por possuírem duas ou mais instaurações na sua cadeia de carbono (YOUUDIM et al., 2000).

A classificação em relação a localização da primeira dupla ligação a partir da extremidade do grupo metil, permite ainda a classificação dos AG em ácidos ômega 3, ômega 6 e ômega 9. O AG ômega 3 apresenta a primeira dupla ligação no 3º átomo de carbono (SIMOPOULOS, 2002), o AG ômega 6 apresenta a primeira dupla ligação no 6º átomo de carbono e ômega 9 apresenta a primeira dupla ligação no 9º átomo de carbono. Neste trabalho, houve especial interesse nos AG ômega 3. Os principais AG que compõem o ômega 3 são os poli-insaturados eicosapentaenoico

(EPA) e docosahexaenoico (DHA) (esquema 3), encontrados principalmente em peixes como salmão, atum e sardinhas (MARTINS et al., 2009, WOODMAN et al., 2003). Os AG EPA e DHA são conhecidos como AG essenciais, deste modo o corpo humano não é capaz de sintetizar este tipo de AG e por este motivo o fornecimento ao organismo deve ser a partir da dieta (NETTLETON, 1995).



Esquema 3. Estrutura química do ácido graxo ômega-3 poliinsaturado DHA docosahexaenoico e EPA eicosapentaenoico. Modificada: Shahidi; Ambigaipalan, 2018.

Os efeitos benéficos dos AG ômega 3 para a saúde, EPA e DHA foram descritos primeiro nos esquimós da Groenlândia, pois consumiam uma alta demanda destes AG com dieta de frutos do mar e assim, apresentavam baixas taxas de doença cardíaca coronária, asma e DM *mellitus* tipo 2 (KROMANN e GREEN, 1998).

Os japoneses também consomem dieta rica em peixes ricos em ômega 3 e apresentam baixa prevalência de infarto do miocárdio e distúrbios inflamatórios ou auto-imunes crônicos (HIRAI et al., 1982; DYERBERG e BANG, 1979). Deste modo, os AG EPA e DHA são importantes na dieta e trazem benefícios para a saúde.

Uma dieta rica em AG Ômega 3, permite efeitos favoráveis em doenças cardiovasculares, doenças autoimunes e inflamatórias (MAYSER et al., 2002). Já foi descrito que estes AG podem diminuir a pressão arterial, especialmente em indivíduos idosos e hipertensos. (GELEIJNSE, KOK e GROBBEE, 2002). Os AG ômega 3 tem apresentado resultados positivos no tratamento de doenças da artéria coronária, hipertensão, artrite, distúrbios e câncer (SIMOPOULOS, 1999), em decorrência de suas propriedades anti-inflamatórias (CALDER, 2007; DELGADO-LISTA et al., 2012; SIMOPOULOS, 2002). Além deste fato, os ômega 3 também reduzem a

concentração de triglicerídeos, colesterol e adesão plaquetária (KARLSSON, 1997; RUSSELL; BURGIN-MAUNDER, 2012).

RONDEAU et al., 2011 demonstraram que uma dieta rica em AG ômega 3 reduz significativamente a ocorrência de infarto quando comparado com dieta rica em AG ômega 6 (RONDEAU et al., 2011). MEYDANI e colaboradores (1993) por sua vez, demonstraram que uma dieta com baixo colesterol e rica em AG ômega 3 é capaz de modular a resposta imune (MEYDANI et al., 1993).

KEW et al., 2004 comparou a suplementação com ômega 3, contendo duas concentrações diferentes de EPA e DHA nos suplementos utilizados. Indivíduos saudáveis, com idade entre 23 e 65 anos, foram suplementados com EPA (dose de 4,75 g/dia) acrescido de DHA (dose 0,73 g/dia) ou com DHA (dose de 4,91 g/dia) acrescido de EPA (0,85 g/dia). Estes autores não verificaram diferença na fagocitose em neutrófilos ou monócitos e na expressão de moléculas de adesão por monócitos decorrente do tipo de suplementação ou do tempo.

O efeito anti-inflamatório AG ômega 3 pode estar relacionado com a ação de resolvinas, proteases e maresinas. Os AG ômega 3 são precursores das resolvinas E1 e D1, proteases D1 e R1 e maresinas através da ação das enzimas ciclooxigenase e lipoxigenase (SERHAN, CHIANG, & DALLI, 2017; SERHAN, CHIANG, DALLI, & LEVY, 2014). As resolvinas apresentam um papel importante no processo inflamatório, limitando os danos ao tecido e a propagação da resposta inflamatória (CALDER, 2010). Além disso, apresentam algumas vantagens em comparação a outras drogas anti-inflamatórias, devido aos seus efeitos na resolução da inflamação, sem modular a produção de outras moléculas de eicosanoides que têm efeitos fisiológicos importantes (MORO et al., 2016). Deste modo, esses mediadores lipídicos podem prevenir ou até auxiliar no tratamento de doenças crônicas inflamatórias (MORO, NAGAHASHI, RAMANATHAN, TAKABE, & WAKAI, 2016).

Tendo em vista que os AG ômega 3 apresentam efeitos anti-inflamatórios é importante estabelecer o efeito destes em pacientes com alteração no controle do processo inflamatório assim como no DM *mellitus*.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Caracterizar a função de neutrófilos em mulheres pré-diabéticas e diabéticas e investigar o efeito da suplementação com ômega-3 na função e morte dos neutrófilos destas mulheres.

2.2 Objetivo Específico

- ❖ Determinar a função de neutrófilos em mulheres pré-diabéticas e diabéticas e comparar com o controle (mulheres que apresentam glicemia e hemoglobina glicada dentro dos valores recomendados).
- ❖ Verificar o efeito da suplementação de ômega-3 na função de neutrófilos por meio da determinação da fagocitose, produção de espécies reativas de oxigênio de neutrófilos e citocinas (TNF- α , IL-6, IL-10, IL-1 β e IL-12p70).
- ❖ Verificar o efeito da suplementação com ômega 3 na migração dos neutrófilos por meio da determinação da expressão dos receptores de molécula de adesão (CD 62L e CD54) na membrana dos neutrófilos.
- ❖ Verificar o efeito da suplementação de ômega-3 na morte de neutrófilos por meio da determinação da integridade de membrana celular, fragmentação de DNA e polaridade de membrana mitocondrial.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

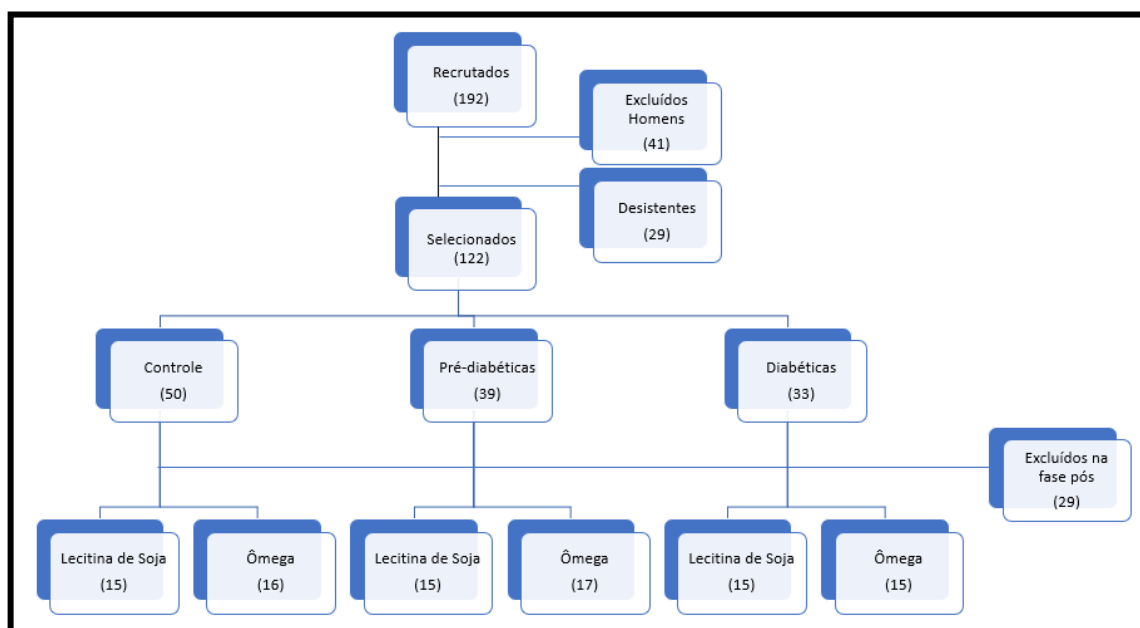
As voluntárias foram convidadas a participar do estudo através da divulgação realizada por meio de panfletos distribuídos (anexo 1) em estabelecimentos do bairro da Liberdade, São Paulo, Brasil. Uma reunião foi agendada com as voluntárias interessadas em participar do estudo para esclarecimentos sobre o projeto, detalhamento do protocolo e análises a serem realizadas. As participantes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo 2) atendendo às normas do Comitê de Ética em pesquisa da Universidade Cruzeiro do Sul, responsável pela aprovação do projeto de pesquisa e preencheram a ficha de identificação e coleta de dados (anexo 3). Ao todo, foram recrutados 192 indivíduos entre estas 122 mulheres, a partir de 40 anos, as quais realizaram duas visitas ao laboratório para análise dos parâmetros propostos no projeto (Esquema 4). Na primeira visita (tempo 0) as participantes foram entrevistadas e um questionário de anamnese foi aplicado. Neste momento também foi realizada a avaliação da composição corporal e a coleta sangue para determinação dos parâmetros bioquímicos como a glicemia e a hemoglobina glicada das participantes.

No nosso estudo foi seguido o critério de diagnóstico para DM estabelecido pela ADA. Deste modo foram classificadas como pré-diabéticas e diabéticas as voluntárias que apresentaram dois testes alterados, glicemia e hemoglobina glicada (ADA, 2019). Foi classificada como pré-diabéticas as voluntárias que apresentaram valor de glicemia em jejum ≥ 101 mg/dl até 125mg/dl e hemoglobina glicada $\geq 5,7\%$ até 6,4%. Já as diabéticas apresentaram valor de glicemia em jejum ≥ 126 mg/dl e hemoglobina glicada $\geq 6,5\%$ (ADA, 2019). Deste modo, as voluntárias foram divididas em três grupos- controle (voluntárias que não apresentaram alteração nos resultados dos exames de glicemia e hemoglobina glicada), pré-diabéticas e diabéticas. Posteriormente estes grupos foram subdivididos em grupo suplementado com lecitina de soja (placebo) e grupo suplementado com ômega 3. Desta forma o estudo foi composto por 6 grupos 1) mulheres controle suplementadas com lecitina de soja, 2) mulheres controle suplementadas com ômega 3, 3) mulheres pré-diabéticas

suplementadas com lecitina de soja e 4) mulheres pré-diabéticas suplementadas com ômega 3, 5) mulheres diabéticas suplementadas com lecitina de soja e 6) mulheres diabéticas suplementadas com ômega 3 (Esquema 4).

É importante citar que as voluntárias do grupo diabético realizavam o controle da doença através da administração de medicamentos, assim como hipoglicemiantes, insulina ou associação de ambos. Deste modo, os grupos suplementados com ômega 3 ou com lecitina de soja, composto por voluntárias diabéticas, foram pareadas pelo tipo de medicamento administrado. Houve somente uma voluntária, classificada como diabética não usuária de medicamento para esta patologia, esta foi incluída no grupo ômega 3 (anexo 6).

Após 3 meses de suplementação as voluntárias retornaram ao laboratório e as análises descritas acima foram novamente realizadas.



Esquema 4. Fluxograma da distribuição e número total de voluntários do estudo. Os voluntários descritos como não relacionados são os que não participaram do estudo. Os voluntários denominados como excluídas são as mulheres que durante os 3 meses desistiram da participação no estudo ou que não tomaram corretamente o suplemento.

O estudo foi realizado no Instituto de Atividade Física e Esporte e faz parte de um projeto amplo, inicialmente proposto pelo Dr. Sandro Massao Hirabara, o qual visa investigar marcadores fisiológicos em mulheres suplementadas com ômega 3.

3.2 Critérios de Exclusão

Foram excluídas do estudo voluntárias com menos de 40 anos de idade, mulheres que apresentaram diagnóstico prévio de doenças autoimunes ou inflamatórias e voluntárias que já faziam uso de ômega 3. Também foram excluídas as participantes que deixaram de tomar mais que 15% dos suplementos destinados ao período.

3.3 Suplementação

A distribuição da suplementação entre os grupos foi realizada por método randomizado e duplo cego. A entrega dos suplementos foi realizada individualmente, após detalhamento do modo de consumo e período de suplementação.

As voluntárias foram orientadas a ingerir três capsulas por dia do suplemento, durante noventa dias (3 meses). Desta forma a dose diária administrada de ômega 3 foi de 1,95g/dia. Foi utilizado no estudo o produto, Hi Ômega 3, produzido pela empresa Naturalis, São Paulo, Brasil, o qual contém na sua composição uma quantidade maior do ácido EPA em relação ao ácido DHA (conforme demonstrado na tabela 1).

Tabela 1. Informação nutricional do Hi Ômega

Porção 2.0 gramas	Duas capsulas
Valor energético	18kcal=76kJ
Carboidratos	0g
Proteínas	0g
Gorduras totais	2.0g
Gorduras saturadas	0g
Gorduras Trans	0g
Gorduras poli-insaturadas	1,6g
Ácido eicosapentaenoico	1,1g

Ácido docosahexaenoico	0,2g
Fibra alimentar	0g
Sódio	0g
Vitamina E	4,0mg

Tabela nutricional apresentada no produto e fornecida pela empresa fabricante Naturalis.

A lecitina de soja foi escolhida como placebo do estudo por não possuir em sua composição AG ômega 3 ou componentes que pudessem interferir nos efeitos desencadeados por estes. Desta forma, o grupo placebo recebeu a lecitina de soja e foi orientado a ingerir três capsulas por dia, durante 90 dias, sendo a mesma dose recomendada ao grupo ômega 3.

A adesão das voluntárias ao estudo foi verificada através do compromisso da ingestão dos suplementos, sendo este fator determinante para o objetivo do estudo. O objetivo de verificar a adesão das ao estudo foram aplicados 2 questionários de adesão: 1) Morinsky-Green-Levine e *Brief Medication Questionnaire* (BMQ) (Anexo 4 e 5 respectivamente). O questionário de Brief contém 11 questões as quais são distribuídas em 3 domínios, sendo eles: Regime, Crenças e Recordação. Ao final das respostas ao questionário existem 4 classificações, sendo elas: adesão (sem resposta positiva em qualquer domínio), provável adesão (resposta positiva em um domínio), provável baixa adesão (respostas positivas em dois domínios) e baixa adesão (respostas positivas em todos os domínios) (BEM et al., 2012). As voluntárias que consumiram menos que 85% das capsulas entregues foram excluídas do estudo. O questionário Morinsky-Green-Levine é curto e simples e apresenta 4 perguntas. Sua classificação é determinada pela soma de todas as respostas. É atribuído 1 ponto para cada resposta “Sim” e 0 para cada resposta “Não”. Dessa maneira, o escore final igual a zero indica alta adesão, de 1 a 2 indica média adesão e 3 a 4 indica baixa adesão (MORINSKY; GREEN; LEVINE, 1986).

3.4 Avaliação Física

3.5 Avaliação da Composição Corporal

A composição corporal foi determinada pelo cálculo do índice de massa corporal (IMC) obtido através da equação: peso/altura ao quadrado, e, da porcentagem de gordura e massa magra corporal determinada por meio de análise de bioimpedância (Biodinamics).

3.6 Estatura Total e Massa Corpórea

A estatura total (cm) foi mensurada utilizando a régua antropométrica acoplada a uma balança antropométrica mecânica da marca *Welmy* modelo R-104. As voluntárias permaneceram de pé, eretas, braços estendidos ao longo do corpo, pés unidos e ligeiramente afastados, procurando pôr em contato com o instrumento de medida as superfícies posteriores do calcanhar, cintura pélvica, cintura escapular e região occipital. A medida foi feita com o indivíduo em apneia inspiratória, de modo a minimizar possíveis variações sobre esta variável antropométrica. A cabeça foi orientada segundo o plano de Frankfurt, paralela ao solo. A medida foi com o cursor em ângulo de 90° em relação à escala. Os indivíduos estavam descalços durante a medida (LOHMAN & RATCLIFFE, 1988).

A massa corpórea (kg) foi mensurada utilizando-se uma balança mecânica da marca *Welmy modelo R-104* com capacidade para 150 Kg. As voluntárias se posicionaram em pé, com o olhar num ponto fixo à sua frente, utilizando roupas leves e descalças (LOHMAN et al. 1988).

3.7 Índice HOMA

Os valores em jejum de insulina e glicemia, foram utilizados para o cálculo do índice Homa (Homeostatic Model Assessment) como descrito por Mathews, et al (1985). O objetivo deste índice é determinar a resistência à insulina (HOMA IR). Seu cálculo requer a mensuração da glicemia e da insulinemia obtidas em uma mesma amostra de sangue, após jejum de 8 a 12 horas.

Neste estudo foi calculado o HOMA IR utilizando a seguinte fórmula: (insulina jejum (glicemia em mg/dL) x (insulinemia em $\mu\text{U/mL}$)] / 405. O valor de referência para o índice HOMA IR é $> 2,71$ para adultos e idosos (GELONEZE et al., 2006, 2009).

3.8 Obtenção e Isolamento dos Neutrófilos Humanos

Os neutrófilos foram separados utilizando o reagente Histopaque $\text{\textcircled{R}}1077$ que possibilita a separação de células mononucleares (linfócitos e monócitos) e polimorfonucleares (neutrófilos) de acordo com sua densidade, conforme método de Boyum, 1968. Os neutrófilos foram isolados adicionando-se 10 mL de solução de hemólise (150 mM NH_4Cl , 10mM NaHCO_3 , 0,1mM EDTA, pH 7,4) seguida de incubação por 10 minutos em gelo. A seguir, a suspensão celular foi centrifugada a 400 xg por 10 minutos e Ressuspensa em tampão fosfato salina (PBS). Posteriormente as células foram contadas em câmara de newbauer para separação das alíquotas necessárias para as análises realizadas.

3.9 Avaliação da Função dos Neutrófilos

3.10 Avaliação da Expressão da CD62 (L-Selectina) e CD54 (ICAM-1)

A avaliação da expressão de marcadores na membrana de neutrófilos foi realizada por citometria de fluxo (Accuri, Becton e Dickinson System, San Juan, Califórnia, EUA), conforme Verbrugge e Johnstone (2012) e como descrito em nosso estudo (VERBRUGGE e JOHNSTONE 2012).

Para avaliação das moléculas de adesão endotelial (CD62L, CD54), foi utilizada uma alíquota de 1×10^6 células/mL de neutrófilos suspensos em 100 μL de PBS e BSA (Bovine Serum Albumine) e incubados com 5 μL de anticorpo (anti CD62L-FITIC e anti CD54-APC) por 30 minutos. Posteriormente, as células foram centrifugadas por 10 minutos a 400 g e novamente suspensas em 100 μL de PBS contendo formaldeído (1%). As amostras marcadas com CD62-FITIC foram lidas no filtro 1 (530/30 ou 533/30) e as marcadas com CD54-APC foram avaliadas no filtro 4

(675/25). A análise foi realizada por meio de citometria de fluxo utilizando o software BD Accuri (BD Biosciences).

3.10.1 Avaliação Fagocitária de Neutrófilos

A obtenção por meio de *Saccharomyces cerevisiae* das partículas de zimozan foram opsonizadas pelo componente C3b do complemento. A ligação ao receptor C3b estimula a fagocitose, sendo os neutrófilos compatíveis a esse receptor. Esta opsonização será realizada a partir da incubação de uma suspensão contendo 1×10^7 partículas de zimozan com soro controle na proporção de 1:1 durante 30 minutos a 37°C sob agitação constante. Posteriormente, a suspensão foi para centrifuga por 5 minutos a 500g e o precipitado ressuspense em PBS. Neste precipitado será adicionado 1 mL de meio de cultura contendo glicose 5mM, glutamina 2mM e albumina livre de gordura a 10% a uma alíquota contendo 1×10^6 neutrófilos. Após incubação por 40 minutos a 37°C sob agitação constante, uma alíquota foi retirada para determinação da porcentagem de fagocitose, utilizando microscópio de luz, depois de diluir a amostra (10:1) em solução de cristal violeta em ácido acético. A porcentagem de fagocitose foi determinada em cada amostra, pela contagem de 100 células em microscopia de luz. Foram considerados apenas neutrófilos que englobaram 3 ou mais partículas.

3.10.2 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) por citometria de fluxo

A avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio foi determinada por meio da diidroetina, que oxidada forma etídio, ligando-se ao DNA e emitindo fluorescência. O conteúdo de 1×10^6 cel/mL foi ressuspense em 500 μL de PBS (pH 7,4) e colocado em falcon de polietileno, em seguida foi adicionado diidroetidina (10 μM). As células foram incubadas durante 30 minutos, na ausência e a presença de 20nM de acetato de forbol miristato (PMA) a temperatura ambiente na ausência de luz. Passados 30 minutos, as amostras foram lidas pelo citômetro de fluxo no canal FL-2 (fluorescência laranja-avermelhada - 585/42 nm) do software BD Accuri (BD Biosciences).

3.10.3 Avaliação da Produção de Citocinas pelos Neutrófilos

O conteúdo de 1×10^6 cel/mL de neutrófilos foi ressuspensão em 1 mL de meio de cultura RPMI e mantido em cultura durante 18 horas a 37°C com 5% de CO_2 e 95% de ar atmosférico, na presença e na ausência do estímulo LPS (1mg/mL). Após este período de incubação, o sobrenadante foi removido após centrifugação da placa à (1800 rpm) e armazenado em freezer -80 até a determinação. As citocinas foram analisadas por citometria de fluxo, através da técnica de foram determinadas através do kit da BD CBA (*Human Inflammatory Cytokines Kit*), BD Biosciences. O método CBA (Cytometric Bead Array) consiste em esferas de poliestireno contendo diferentes intensidades de fluorescência (em APC), conjugadas com anticorpos de captura específicos e são detectadas no canal FL-4 no citômetro BD-Accuri. Os anticorpos de detecção foram marcados com o fluorocromo PE, detectado no filtro FL-2. Essa metodologia permite a avaliação simultânea de diversas citocinas no mesmo ensaio. A aquisição foi realizada no BD-Accuri C6 Software e as concentrações determinadas utilizando-se o FCAP Software v.3.0 (BD, Biosciences). Foram determinadas as concentrações das seguintes citocinas produzidas pelos neutrófilos- TNF- α , IL-6, IL8, IL-10, IL 1β e IL12.

3.10.4 Determinação da Integridade de Membrana Celular

As células foram coletadas e ressuspensas em PBS na concentração de 1×10^6 células por mL. Foram retirados 500 μL de cada amostra e colocados em tubos Falcon. Foram adicionados 50 μL de PI (iodeto de propídio) em solução de PBS e as células foram analisadas no citômetro de fluxo (FACS ACCuri, Becton Dickinson, EUA). A fluorescência foi determinada no canal FL2 (fluorescência laranja-avermelhada - 585/42 nm) (LIMA, KANUNFRE et al. 2002, CURY-BOAVENTURA, et al. 2004, CURY-BOAVENTURA, et al. 2006).

3.10.5 Alteração do Potencial de Membrana Mitocondrial

As células foram coletadas e uma alíquota 1×10^6 células/mL de neutrófilos foram ressuspensas 1 mL de PBS (pH 7,4). A rodamina 123 (5 μM) foi adicionada às células. Em seguida as células foram incubadas durante 30 minutos a temperatura ambiente na ausência de luz. Após o período de incubação, as células foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas por mais 30 minutos nas mesmas condições citadas. A fluorescência da rodamina 123 foi detectada no canal FL1

(fluorescência verde – 530/30 nm). Dez mil eventos foram adquiridos por amostra em histogramas.

3.10.6 Determinação da Fragmentação de DNA

A fragmentação foi determinada de acordo com protocolo proposto por Nicoletti et al., 1991. As células foram ressuspensas em um tampão contendo iodeto de propídio (PI) 2 µg/mL, 0,1% de citrato de sódio e 0,1% de triton X-100. O triton rompe a membrana celular, assim, o PI entra na célula se ligando ao DNA, alta fluorescência é emitida quando o DNA está íntegro, e baixa fluorescência quando o DNA está fragmentado. As células foram coletadas e ressuspensas em PBS na concentração de 1×10^6 células por mL. Foi adicionado o tampão de fragmentação e as células foram incubadas por 30 minutos a 4°C no escuro. A fluorescência foi determinada no canal FL-2 (fluorescência laranja-avermelhada – 585/42 nm) do citômetro de fluxo. Dez mil eventos foram adquiridos por amostra em histogramas.

3.10.7 Avaliação da Produção de Citocinas pelos Neutrófilos

O conteúdo de 1×10^6 cel/mL de neutrófilos foi ressuspenso em 1 mL de meio de cultura RPMI e mantido em cultura durante 18 horas a 37°C com 5% de CO₂ e 95% de ar atmosférico, na presença e na ausência do estímulo LPS (1mg/mL). Após este período de incubação, o sobrenadante foi removido após centrifugação da placa à (1800 rpm) e armazenado em freezer -80 até a determinação. As citocinas foram analisadas por citometria de fluxo, através da técnica de foram determinadas através do kit da BD CBA (*Human Inflammatory Cytokines Kit*), BD Biosciences. O método CBA (Cytometric Bead Array) consiste em esferas de poliestireno contendo diferentes intensidades de fluorescência (em APC), conjugadas com anticorpos de captura específicos e são detectadas no canal FL-4 no citômetro BD-Accuri. Os anticorpos de detecção foram marcados com o fluorocromo PE, detectado no filtro FL-2. Essa metodologia permite a avaliação simultânea de diversas citocinas no mesmo ensaio. A aquisição foi realizada no BD-Accuri C6 Software e as concentrações determinadas utilizando-se o FCAP Software v.3.0 (BD, Biosciences). Foram determinadas as concentrações das seguintes citocinas produzidas pelos neutrófilos-TNF- α , IL-6, IL-10, IL-1 β e IL12.

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A normalidade da distribuição da amostra foi determinada através do teste Shapiro-Wilk normality test e D'Agostino & Pearson normality test. As análises dentro do padrão de normalidade foram analisadas utilizando o teste Anova One way, seguidos do post teste Bonferroni. Nas análises em que a distribuição não atendeu os padrões de normalidade, foi utilizado o teste não paramétrico, post teste Kruskal-Wallis. Foi utilizado o software estatístico Prism v.40 (Graphpad, EUA) para comparação dos resultados contendo teste de Anova One way, post hoc de Bonferroni, com significância em 95% ($p \leq 0,05$).

5. RESULTADOS

No nosso estudo inicialmente foi determinada a função de neutrófilos em mulheres pré-diabéticas e diabéticas (Parte 1). Em seguida foi investigado o efeito da suplementação com ômega 3 nestes grupos de mulheres (Parte 2). Desta forma os resultados foram divididos em parte 1 e parte 2.

Parte 1-

5.1 Função de neutrófilos em mulheres pré-diabéticas e diabéticas

5.1.1 Caracterização das amostras

As voluntárias do estudo não apresentaram diferença na idade, peso, estatura, massa magra e massa gorda. Porém, foi observado que as voluntárias do grupo diabético apresentaram aumento na razão cintura/quadril quando comparado ao grupo pré-diabético e diabético. Do mesmo modo, não foi observada diferença estatística no IMC quando os grupos foram comparados (Tabela 2).

Tabela 2. Tabela de caracterização da idade e composição corporal dos grupos controle, pré-diabético e diabético.

	Controle	Pré-diabética	Diabética
Idade (anos)	63,23 ± 1,81	64,83 ± 1,45	63,44 ± 1,55
Peso (Kg)	65,67 ± 1,80	64,46 ± 2,51	68,96 ± 3,47
Estatura (cm)	156 ± 0,01	156 ± 0,01	155± 0,01
IMC (Kg/m ²)	26,26 ± 0,62	26,26 ± 0,89	28,38 ± 1,34
Cintura/Quadril (cm)	0,85 ± 0,01	0,85 ± 0,01	0,90 ± 0,01#
Massa Gorda (Kg)	26,58 ± 1,20	27,64 ± 1,55	30,09 ± 2,44
Massa Magra (Kg)	38,65 ± 1,11	36,83 ± 1,16	38,87 ± 1,39

Os valores foram apresentados como média \pm EPM. $\#<p0,05$ quando comparado grupo diabético com controle e pré-diabético. Para Idade, estatura (cm), cintura/quadril (cm), massa gorda (Kg) e massa magra (Kg)- grupo controle N=31, pré-diabético (PRÉ-DM) N=31 e diabético N=25, Para IMC - grupo controle N=30, pré-diabético (PRÉ-DM) N=30 e diabético N=16.

O Ministério da Saúde usa a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) para avaliação do estado nutricional. A OMS classifica o indivíduo adulto quando o IMC está entre: 18,6-24,9 como eutrófico; 25-29,9 como sobrepeso; 30-34,9 como obesidade grau 1 e 35-39,9 Kg/m² como obesidade severa. Em idosos partir de 60 anos estes valores mudam. Sendo assim, o Ministério da Saúde classifica o indivíduo o IMC está <22 como abaixo do peso, 22-27,0 como eutrófico e > 27 como excesso de peso (LIPSCHITZ, 1994). Deste modo, no nosso estudo a classificação foi realizada de acordo com a idade e o IMC foi dividido em 3 categorias- abaixo do peso, eutrófico e excesso de peso.

No nosso estudo foi verificado um maior número de mulheres com excesso de peso no grupo diabético. No grupo controle 18% das mulheres estavam abaixo do peso, 46% eram eutróficas e 36 % eram obesas. No grupo pré-diabético 27% das mulheres estavam abaixo do peso, 27% eram eutróficas e 46% eram excesso de peso. Já o grupo diabético foi composto por 35% de mulheres eutróficas e 65% de mulheres com excesso de peso.

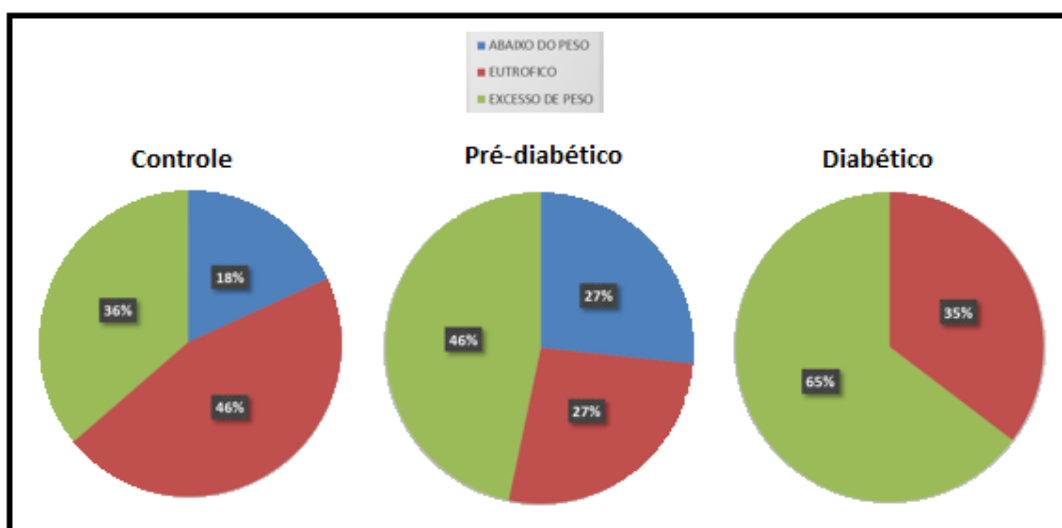


Figura 1. Distribuição da classificação do IMC das voluntárias dos grupos controle, pré-diabético e diabético. Azul: abaixo de peso; Vermelho: Eutrófico; Verde: excesso de peso.

Como esperado, os grupos pré-diabético e diabético apresentaram glicemia, % de hemoglobina glicada, e índice HOMA acima dos valores desejáveis (Tabela 3).

Tabela 3. Dosagem plasmática de glicose, hemoglobina glicada, insulina e cálculo do índice Homa de mulheres pertencentes aos grupos controle, pré-diabético e diabético.

	Controle	Pré-diabética	Diabética
Glicemia mg/Dl	94,42 ± 1,22	107 ± 2,09*	140,5 ± 13,45*
Hemoglobina Glicada (%)	5,40 ± 0,06	5,66 ± 0,07	7,19 ± 0,29#
Insulina Basal uIU/mL	8,76 ± 0,74	9,37 ± 0,90	12,82 ± 1,33
HOMA IR	2,29 ± 0,22	2,81 ± 0,32	5,82 ± 1,40#

Os valores foram apresentados como média ± EPM. #p<0,05 quando comparado grupo diabético com controle e pré-diabético. *p<0,05 quando comparado grupo controle com pré-diabético e diabético. Para o grupo controle N=31, pré-diabético (PRÉ-DM) N=30 e diabético N=24.

5.1.2 Função de neutrófilos em mulheres pré-diabéticas e diabéticas

5.1.2.1 Avaliação de Expressão de L-Selectina (CD62L)

A expressão de L-Selectina (CD62L) não foi alterada na superfície dos neutrófilos quando os grupos estudados foram comparados (Figura 2).

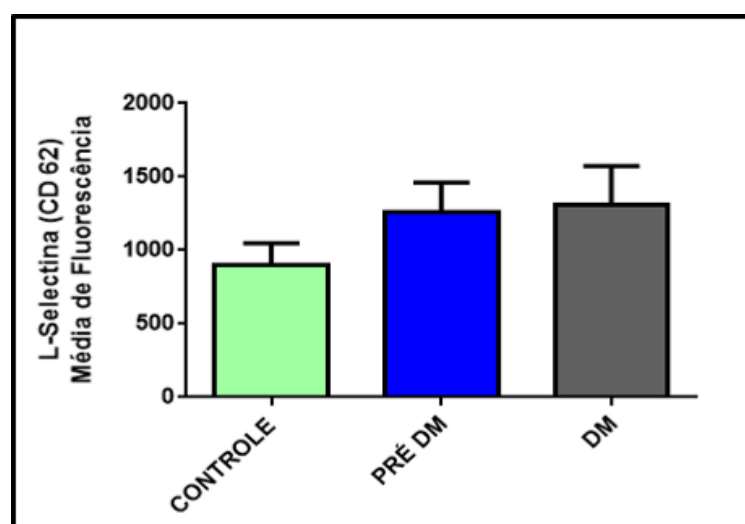


Figura 2. Expressão de L-Selectina (CD62L) na membrana dos neutrófilos das voluntárias antes da suplementação. Os neutrófilos foram incubados durante 30 minutos com o anticorpo CD62L, após este período foram fixados e posteriormente foram analisados em citômetro de fluxo. Os valores estão apresentados como média ± EPM. Para o grupo controle N= 28, pré-diabético (PRÉ-DM) N= 28 e diabético (DM) N= 19.

5.1.2.2 Avaliação de Expressão de ICAM-1 (CD54)

Neutrófilos de mulheres diabéticas apresentaram redução de 39,15% na expressão do receptor ICAM-1 (CD54) quando comparado ao grupo controle (Figura 3).

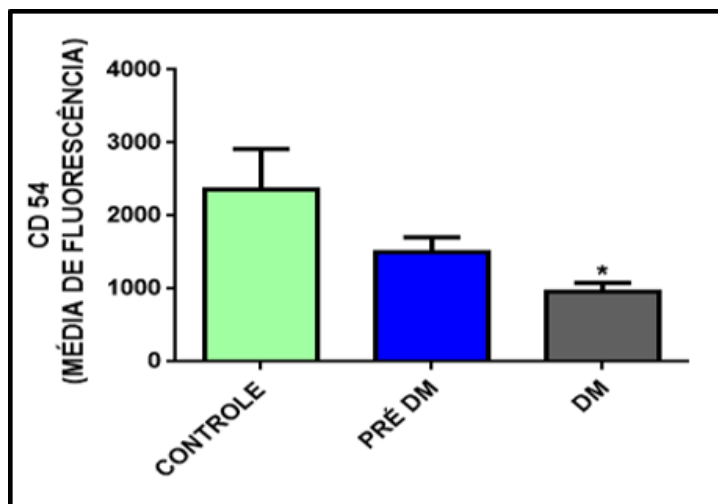


Figura 3. Expressão de ICAM-1 (CD54) na membrana de neutrófilos. Os neutrófilos foram incubados durante 30 minutos com o anticorpo CD54, após este período foram fixados e posteriormente foram analisados em citômetro de fluxo. * $p < 0,05$ quando comparado grupo controle com diabética (DM), no período antes suplementação. Os valores estão apresentados como média \pm EPM. Para o grupo controle N=24, pré-diabético (PRÉ-DM) N=21 e diabético N=22.

5.1.2.3 Avaliação de Fagocitose

Não houve diferença na capacidade fagocitária dos neutrófilos quando os neutrófilos dos grupos controle, pré-diabético e diabético foram comparados (Figura 4).

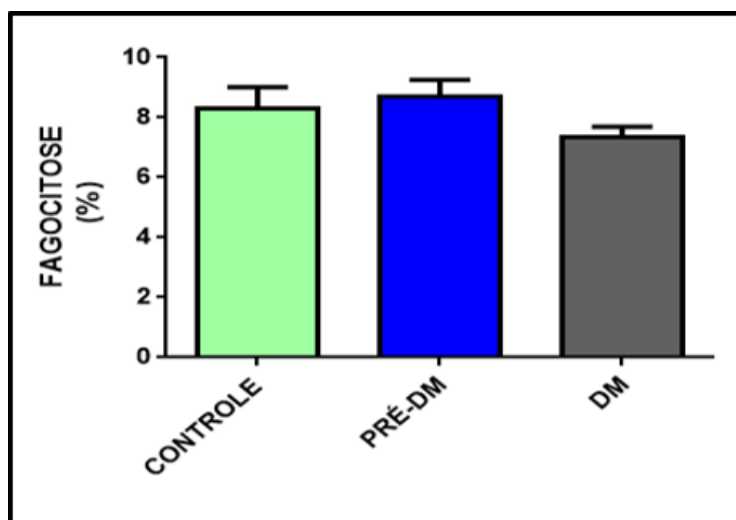


Figura 4. Atividade fagocitária de neutrófilos. Os neutrófilos foram incubados com partículas de zymozan opsonizadas com soro humano. Foi considerado como célula que realizou fagocitose a

englobou três ou mais partículas de zymozan. Os valores estão apresentados como média \pm EPM. Para o grupo controle N= 25, pré-diabético (PRÉ-DM) N= 28 e diabético (DM) N= 25.

5.1.2.4 Avaliação da Produção de Espécies Reativas de Oxigênio

Os neutrófilos do grupo controle responderam ao estímulo do acetato de forbol miristato (PMA), aumentando a produção de ânion superóxido em 2,43 vezes, já os neutrófilos do grupo pré-diabético aumentaram a produção desta espécie reativa de oxigênio em 2,44 vezes. No entanto, no grupo diabético os neutrófilos não alteraram a produção de ânion superóxido após terem sido estimulados com PMA (Figura 5).

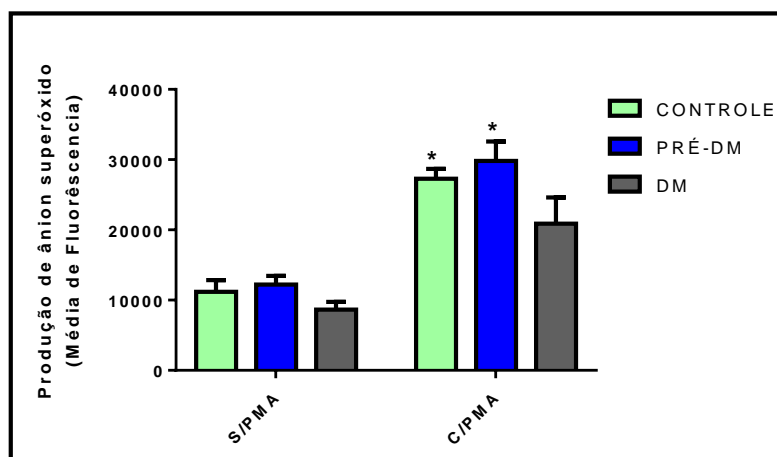


Figura 5. Produção de ânion superóxido por neutrófilos. A produção de ânion superóxido intracelular em neutrófilos foi determinada por citometria de fluxo utilizando diidroetidina. * $p < 0,05$ quando comparado o efeito do estímulo, sem PMA versus com PMA. Os valores estão apresentados como média \pm EPM. Para o grupo controle N= 25, pré-diabético (PRÉ-DM) N= 28 e diabético (DM) N= 25.

5.1.2.5 Produção de citocinas

A produção das citocinas pró inflamatórias IL-1 β , IL-6 e IL-12p7 por neutrófilos não foi alterada na presença ou ausência de LPS (Figura 6).

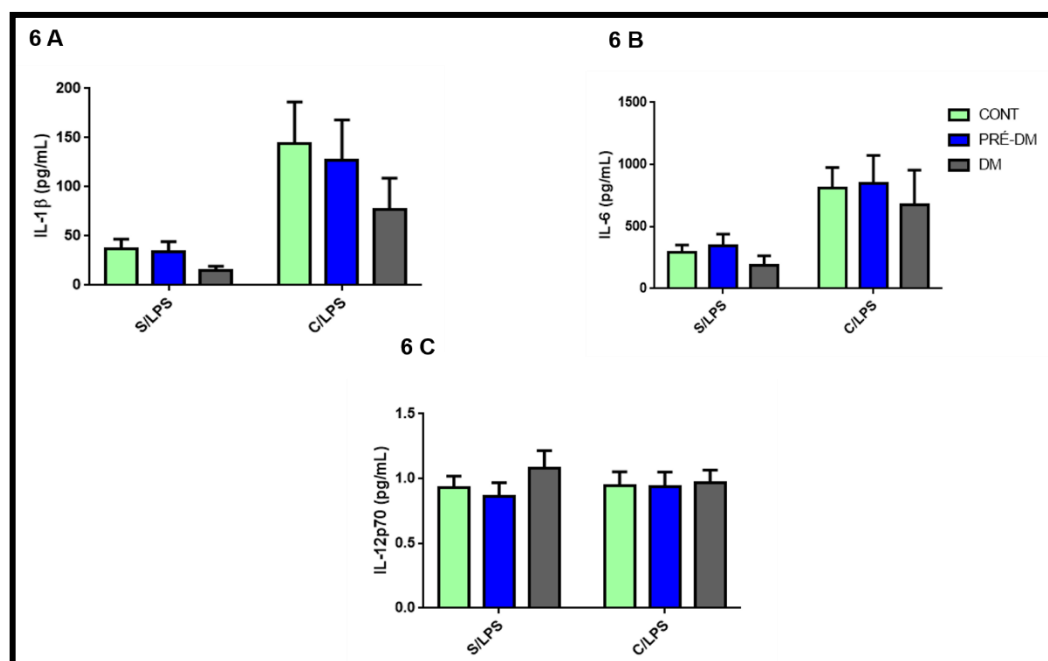


Figura 6. Produção de IL-1 β (A), IL-6 (B) e IL-12p70 (C) em neutrófilos. Neutrófilos foram mantidos em cultura por 18 horas na presença e na ausência do estímulo LPS (Lipopolissacarídeo) (1mg/mL). Após o período de incubação o sobrenadante foi removido e as análises foram realizadas por citometria de fluxo utilizando o software BD Accuri (BD Biosciences) e o kit BD™ CBA Human Inflammatory Cytokines Kit (BD Biosciences). Os valores estão apresentados como média \pm EPM. Para o grupo controle N=30 sem e com LPS, pré-diabético (Pré-DM) N=28 sem e com LPS e grupo diabético N=19.

Os neutrófilos do grupo controle responderam ao estímulo do LPS elevando a produção de TNF- α em 4,6 vezes quando comparado a condição sem estímulo. Nos grupos pré-diabético e diabético não foi observada diferença estatística quando os neutrófilos estimulados com LPS foram comparados com os não estimulados (Figura 7).

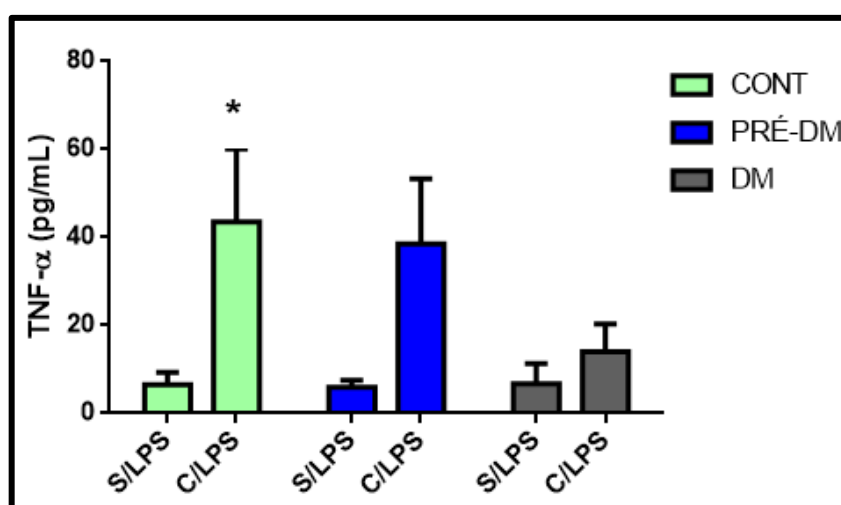


Figura 7. Produção de TNF- α em neutrófilos. Neutrófilos foram mantidos em cultura por 18 horas na presença e na ausência do estímulo LPS (Lipopolissacarídeo) (1mg/mL). Após o período de incubação o sobrenadante foi removido e as análises foram realizadas por citometria de fluxo utilizando o software BD Accuri (BD Biosciences) e o kit BDTM CBA Human Inflammatory Cytokines Kit (BD Biosciences).

* $p < 0,05$ quando comparado o grupo controle sem LPS versus com LPS. Os valores estão apresentados como média \pm EPM. Para o grupo controle N=30 sem e com LPS, pré-diabéticas (Pré-DM) N=28 sem e com LPS e grupo diabético N=19.

Não foi observada diferença estatística na produção de IL-10 quando os neutrófilos dos grupos controle, pré-diabético e diabético foram comparados. Do mesmo modo não foi observado diferença na produção desta citocina quando neutrófilos não estimulados e estimulados com LPS foram comparados (Figura 8).

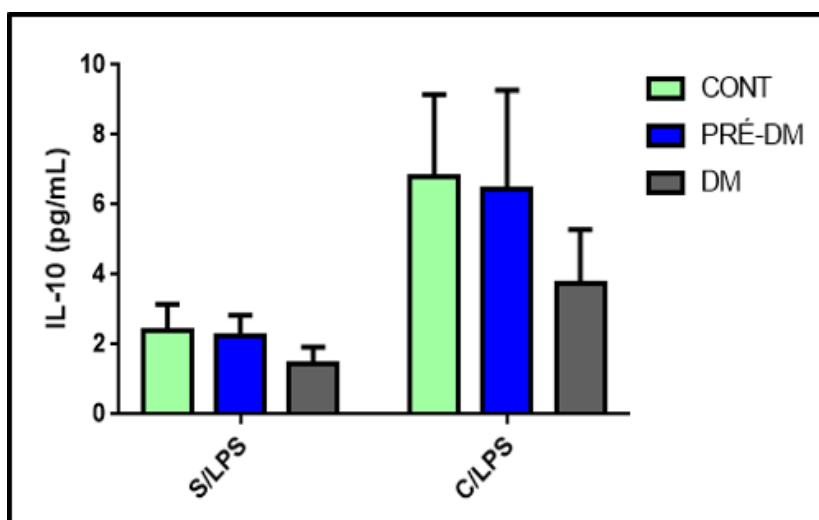


Figura 8. Produção de IL-10 em neutrófilos. Neutrófilos foram mantidos em cultura por 18 horas na presença e na ausência do estímulo LPS (Lipopolissacarídeo) (1mg/mL). Após o período de incubação o sobrenadante foi removido e as análises foram realizadas por citometria de fluxo utilizando o software BD Accuri (BD Biosciences) e o kit BDTM CBA *Human Inflammatory Cytokines* Kit (BD Biosciences). Os valores estão apresentados como média \pm EPM. Para o grupo controle N=30 sem e com LPS, pré-diabéticas (Pré-DM) N=28 sem e com LPS e grupo diabético N=19.

5.1.2.6 Avaliação da Viabilidade Celular

Não houve diferença no percentual de neutrófilos com membrana íntegra quando comparado os grupos controle, pré-diabético e diabético (Figura 9).

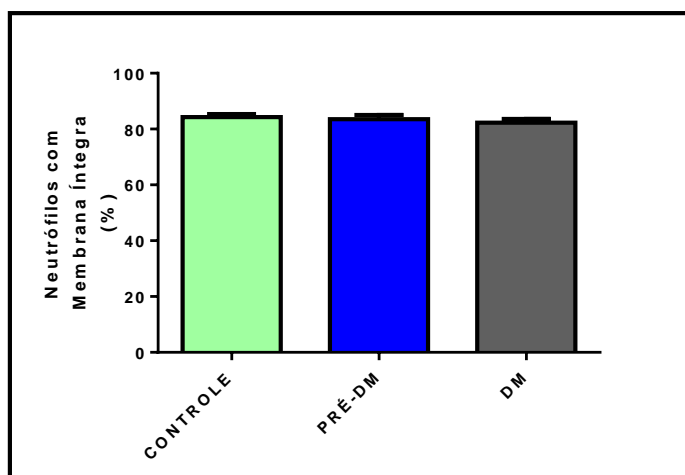


Figura 9. Integridade de membrana em neutrófilos. A integridade de membrana foi avaliada no citômetro de fluxo após incubação dos neutrófilos com iodeto de protídeo. Os valores estão apresentados como média \pm EPM. Para o grupo controle N= 21 pré-diabético (PRÉ-DM) N=12 e diabético (DM) N= 11.

5.1.2.7 Avaliação da Fragmentação de DNA

O percentual de neutrófilos com DNA fragmentado não foi alterado quando os grupos controle, pré-diabético e diabético (Figura 10).

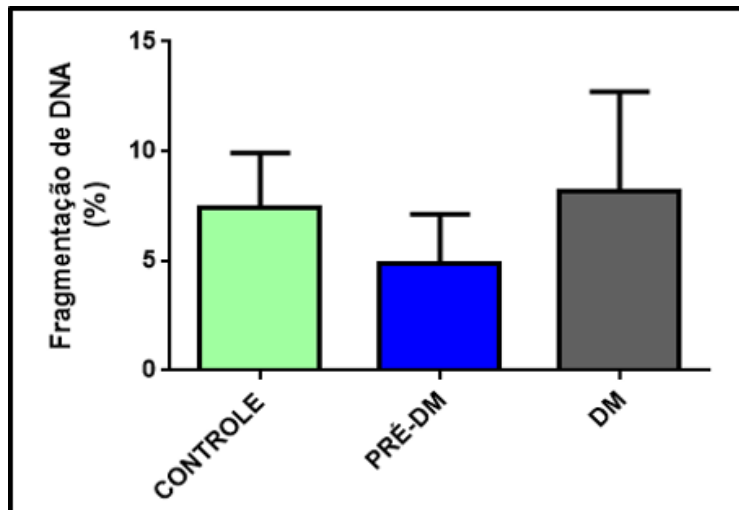


Figura 10. Células com DNA fragmentado em neutrófilos. Fragmentação de DNA foi avaliada no citômetro de fluxo após incubação dos neutrófilos com iodeto de protídeo. Os valores estão apresentados como média \pm EPM. Para o grupo controle N= 13 pré-diabético (PRÉ-DM) N=11 e diabético (DM) N= 10.

5.1.2.8 Análise de Polaridade Mitocondrial

No nosso estudo a polaridade de membrana mitocondrial foi reduzida em 68% quando comparado ao grupo controle e 71,6% nos neutrófilos do grupo diabético quando comparado ao grupo pré-diabético (Figura 11).

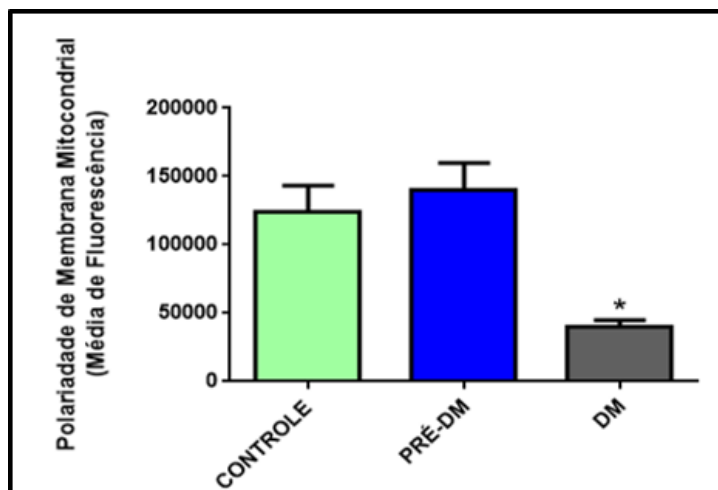


Figura 11. Polaridade de Membrana Mitocondrial em neutrófilos. Os neutrófilos foram incubados com o fluorocromo Rodamina 123, após 30 minutos as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo. Os valores estão apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ quando comparado o grupo controle e pré-diabético (PRÉ-DM) com o grupo diabético (DM). Para o grupo controle N=10, grupo pré-diabética N=11 e grupo diabética N=9.

Parte 2-

5.2 Efeito da suplementação com ômega 3 na função de neutrófilos de mulheres pré-diabéticas e diabéticas

5.2.1 Caracterização da Amostra

Investigamos o efeito da suplementação com Ômega 3 sobre a função e morte de neutrófilos de voluntárias controle, pré-diabéticas e diabéticas. A lecitina de soja foi utilizada como placebo no nosso estudo.

Para caracterizar a amostra, a composição corporal foi determinada por meio da análise da massa corporal, da estatura total, do índice de massa corpórea (IMC) e da medida de bioimpedância. No nosso estudo não foi observado diferença nos parâmetros de composição corporal quando os grupos controle, pré-diabético e diabético foram comparados (Tabela 3 e 4). Também não foi observado diferença nestes parâmetros quando foi comparado o período antes e após a suplementação.

Os parâmetros da composição corporal são preditores de gordura corporal total e estão relacionados com fatores de risco para doenças crônicas e mortalidade (BARREIRA et al, 2012). No nosso estudo, apesar de não termos encontrado diferença entre os grupos, os valores de IMC das participantes dos grupos foram

elevados, classificando as voluntárias do estudo como excesso de peso (sobrepeso e obeso), principalmente no grupo diabético.

Tabela 3. Idade e características antropométricas dos grupos controle, pré-diabético e diabético suplementados com ômega 3.

Ômega 3	Controle Pré	Controle Pós	Pré- Diabética Pré	Pré- Diabética Pós	Diabética Pré	Diabética Pós
Idade (anos)	67,19 ± 1,87	67,19 ± 1,87	64,31 ± 2,05	64,31 ± 2,05	63,33 ± 2,12	63,33 ± 2,12
Peso (Kg)	63,81 ± 3,01	63,91 ± 3,94	65,25 ± 3,51	64,28 ± 3,38	73,38 ± 5,26	73,57 ± 4,81
Estatura (cm)	155 ± 0,01	155 ± 0,01	157 ± 0,01	157 ± 0,01	151 ± 0,02	151 ± 0,02
IMC (Kg/m ²)	26,23 ± 0,84	26,29 ± 0,83	26,03 ± 1,31	26,05 ± 1,27	30,04 ± 2,22	30,10 ± 2,02
Cintura/Quadril (cm)	0,86 ± 0,02	0,86 ± 0,02	0,84 ± 0,02	0,85 ± 0,02	0,92 ± 0,02	0,93 ± 0,02
Massa Gorda (Kg)	26,69 ± 1,75	26,93 ± 1,74	27,13 ± 2,29	27,64 ± 2,20	33,37 ± 3,88	32,46 ± 3,32
Massa Magra (Kg)	37,12 ± 1,52	36,97 ± 1,43	37,12 ± 1,53	36,65 ± 1,44	41,01 ± 2,03	41,11 ± 2,03

Os valores estão apresentados como média ± EPM. #p<0,05 quando comparado grupo diabético com controle e pré-diabético. Para o grupo controle N=16, pré-diabético (PRÉ-DM) N=15 e diabético N=14, para Idade, estatura (cm), cintura/quadril (cm), massa gorda (Kg) e massa magra (Kg). Para o grupo controle N=16, pré-diabético (PRÉ-DM) N=15 e diabético N=9 para IMC.

Tabela 4. Idade e características antropométricas dos grupos controle, pré-diabético e diabético suplementados com lecitina de soja.

Lecitina de Soja	Controle Pré	Controle Pós	Pré- Diabética Pré	Pré- Diabética Pós	Diabética Pré	Diabética Pós
Idade (anos)	59,00 ± 2,83	59,00 ± 2,84	65,67 ± 1,98	67,19 ± 1,87	64,0 ± 1,97	63,97 ± 2,89
Peso (Kg)	63,34, ± 0,47	67,29 ± 2,93	64,46 ± 3,48	63,46 ± 3,48	63,66 ± 3,01	63,97 ± 2,89

Estatura (cm)	157 ± 0,02	159 ± 0,02	154 ± 0,01	155 ± 0,02	151 ± 0,02	151 ± 0,02
IMC (Kg/m ²)	26,28 ± 0,95	26,65 ± 0,94	26,58 ± 1,17	26,59 ± 1,19	26,23 ± 0,75	26,23 ± 0,67
Cintura/Quadril (cm)	0,85 ± 0,02	0,85 ± 0,02	0,87 ± 0,01	0,85 ± 0,01	0,90 ± 0,02	0,92 ± 0,02
Massa Gorda (Kg)	26,47 ± 1,71	27,37 ± 1,84	28,23 ± 2,12	27,77 ± 2,17	27,17 ± 2,38	27,82 ± 2,10
Massa Magra (Kg)	40,27 ± 1,57	39,92 ± 1,48	36,43 ± 1,84	36,42 ± 1,83	36,12 ± 1,33	35,41 ± 1,30

Os valores estão apresentados como média ± EPM. Para o grupo controle N=15, pré-diabético (PRÉ-DM) N=15 e diabético N=10, para Idade, estatura (cm), cintura/quadril (cm), massa gorda (Kg) e massa magra (Kg). Para o grupo controle N=15, pré-diabético (PRÉ-DM) N=15 e diabético N=7 para IMC. Suplementadas com lecitina de soja.

Como esperado, os mulheres pré-diabéticas e diabéticas apresentaram valores alterados para glicemia, hemoglobina glicada e HOMA IR no período pré suplementação. A suplementação com ômega 3 ou com lecitina de soja não alterou manteve os valores alterados para glicemia, hemoglobina glicada e HOMA IR

Tabela 5. Glicemia, porcentagem de hemoglobina glicada, concentração de insulina e índice HOMA IR das mulheres dos grupos controle, pré-diabético e diabético no período pré e pós-suplementação com ômega 3.

Ômega 3	Controle Pré	Controle Pós	Pré-Diabética Pré	Pré-Diabética Pós	Diabética Pré	Diabética Pós
Glicemia mg/Dl	94,50 ± 1,76	9,63 ± 2,10	106,50 ± 2,69	101,80 ± 2,48	149,30 ± 22,69#	127,60 ± 25,15* #
Hemoglobina Glicada (%)	5,45 ± 0,07	5,69 ± 0,08	5,71 ± 0,07	6,00 ± 0,06	7,26 ± 0,44#	7,51 ± 0,45#
Insulina Basal uIU/mL	8,76 ± 0,95	8,84 ± 0,86	11,85 ± 2,02	11,19 ± 1,61	15,51 ± 2,41	14,99 ± 2,33
HOMA IR	2,06 ± 0,24	2,01 ± 0,21	3,20 ± 0,61	2,86 ± 0,43	6,70 ± 2,36#	5,67 ± 1,37#

Os dados estão apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ quando comparado glicemia do grupo diabético com controle e pré-diabético, no período pré e pós-suplementação. # $p < 0,05$ quando comparada a glicemia do grupo diabético versus pré-diabético com diabético pré suplementação. Grupo controle pós versus diabético pós suplementação. Hemoglobina glicada do grupo do grupo controle pré versus diabético pré e grupo controle pós versus diabético pós. HOMA IR grupo controle pré versus diabético pré e controle pós versus diabético pós. N=16, para grupo controle e pré-diabética, N=15 para grupo diabética, suplementada com lecitina de soja. N=16 para grupo controle, N=15 para grupo pré-diabética, N=14 para grupo diabética, suplementada com ômega 3.

Tabela 6. Glicemia, hemoglobina glicada, concentração de insulina e índice HOMA IR das mulheres dos grupos controle, pré-diabético e diabético no período pré e pós-suplementação com lecitina de soja.

Lecitina de Soja	Controle Pré	Controle Pós	Pré-Diabética Pré	Pré-Diabética Pós	Diabética Pré	Diabética Pós
Glicemia mg/Dl	94,33 \pm 1,75	92,53 \pm 1,94	107,40 \pm 2,13	99,27 \pm 1,74#	132,27 \pm 11,32	121,60 \pm 7,83* #
Hemoglobina Glicada (%)	5,35 \pm 0,10	5,60 \pm 0,05	5,71 \pm 0,12	5,87 \pm 0,09	7,03 \pm 0,44#	7,24 \pm 0,36#
Insulina Basal uIU/mL	10,75 \pm 1,52	10,48 \pm 1,57	9,91 \pm 0,81	9,31 \pm 1,05	14,28 \pm 2,28	14,32 \pm 2,28
HOMA IR	2,54 \pm 0,39	2,42 \pm 0,38	2,43 \pm 0,22	2,25 \pm 0,24#	4,60 \pm 0,73	4,63 \pm 1,16

Os dados estão apresentados como média \pm EPM. Os dados apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ quando comparada a glicemia do grupo diabético versus controle e pré-diabético, no período pré e pós-suplementação. # $p < 0,05$ quando comparada a hemoglobina glicada grupo controle com pré-diabético antes da suplementação e pós suplementação. HOMA IR grupo controle com pré-diabético pré e pós suplementação. N=15, para grupo controle e pré-diabética, N=10 para grupo diabética, suplementada com lecitina de soja.

5.2.2 Função de neutrófilos em mulheres dos grupos controle, pré-diabéticas e diabéticas

5.2.2.1 Avaliação de Expressão de L-Selectina (CD62L)

Neste estudo o efeito da suplementação com AG ômega 3 (Figura A) e com lecitina de soja (Figura B) sobre a função dos neutrófilos foi avaliado. A suplementação com AG ômega 3 aumentou a expressão de CD 62L na membrana dos neutrófilos dos grupos controle (4,3 vezes), pré-diabético (3 vezes) e diabético 4,2 vezes). Interessantemente, a lecitina de soja (placebo) também elevou a expressão desta molécula de adesão na membrana dos neutrófilos, sendo observado aumento de 7,3

vezes no grupo controle, 4,9 vezes no grupo pré-diabético. Não foi observado aumento de CD 62L no grupo diabético após suplementação com lecitina de soja, deste modo no período pós-suplementação a expressão desta molécula foi 35% e 34,1% menor neste grupo quando comparado aos grupos controle e pré-diabético, respectivamente (figura 12).

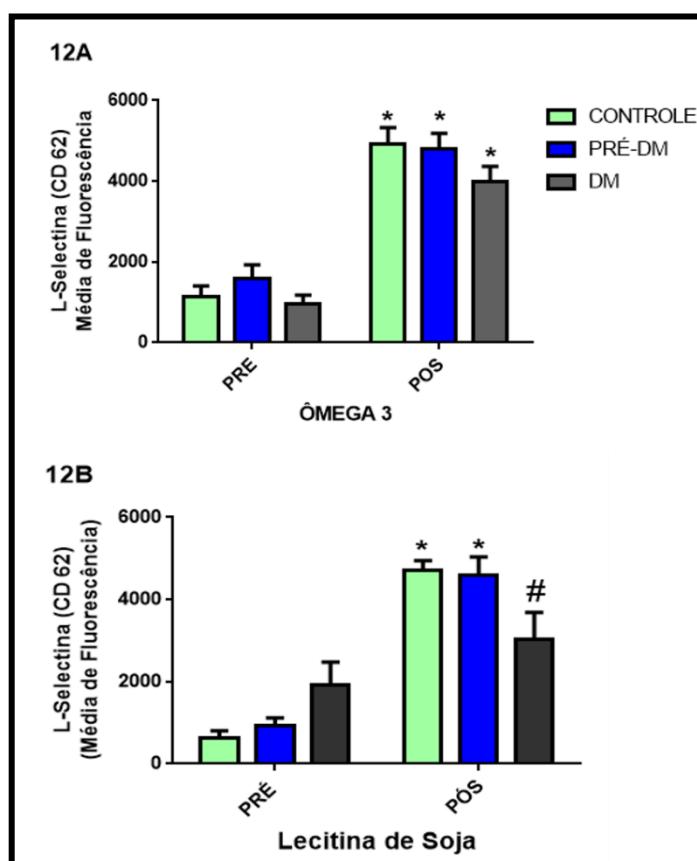


Figura 12. Expressão de L-Selectina (CD62L) na membrana dos neutrófilos das voluntárias pré e pós suplementação com Ômega 3 (12A) e Lecitina de soja (12B). Os valores estão apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ quando comparado período pré e pós-suplementação. # $p < 0,05$ quando comparado com controle e pré-diabético pós suplementação com lecitina de soja. Para o grupo controle e pré-diabética N= 14 para lecitina de soja e ômega 3. Para o grupo diabética (DM) N= 12 para lecitina de soja e N= 7 para ômega 3.

5.2.2.2 Avaliação de Expressão de ICAM-1 (CD54)

Antes da suplementação com ômega 3 os neutrófilos dos grupos pré-diabético e diabético apresentaram redução na expressão de CD 54 (ICAM) em 55,5% e 58,6%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle. Após a suplementação com ômega 3 a expressão deste receptor foi inibida em 86,5% no grupo controle quando comparado ao período pré. Os grupos pré-diabético e diabético

mantiveram a expressão deste receptor reduzida, assim como a encontrada no período pré-suplementação (Figura 13A).

Antes da suplementação com lecitina de soja os neutrófilos das mulheres do grupo diabético apresentaram redução de 60,5% na expressão de ICAM (CD54) quando comparado ao grupo controle. Após a suplementação com lecitina de soja, houve inibição da expressão do receptor ICAM-1 (CD54) nos grupos controle e pré-diabético, em 81% e 80,6%, respectivamente, quando comparado à condição pré-suplementação (Figura 13B).

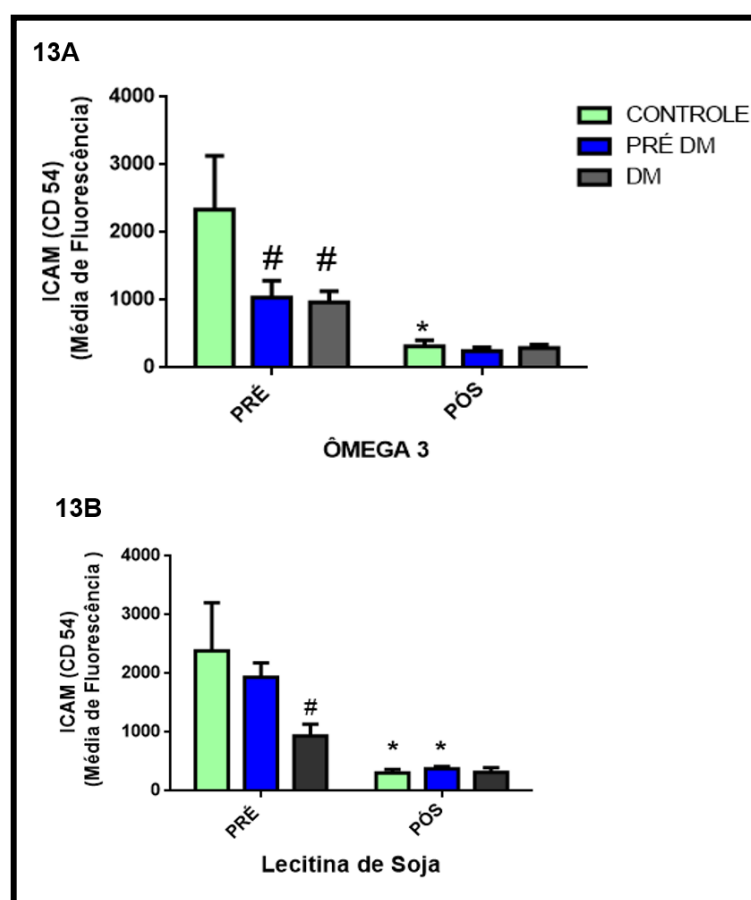


Figura 4. Expressão ICAM (CD54) na membrana dos neutrófilos das voluntárias pré e pós suplementação com Ômega 3 (13A) Q Lecitina de soja (13B). Os valores estão apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ quando comparado período pré e pós suplementação. # $p < 0,05$ quando comparado com controle. Suplementação com ômega 3 N= 13 para grupo controle, N= 10 para grupo pré-diabética (Pré-DM) e N= 14 para o grupo diabético (DM). Suplementação com lecitina de soja - N=11 para grupo controle, N=11 para grupo Pré DM e N=8 para grupo DM.

5.2.2.3 Avaliação de Fagocitose

No grupo controle a fagocitose foi reduzida em 32,3% após suplementação com ômega 3 (Figura 14A). Já os neutrófilos das voluntárias suplementadas com

lecitina de soja não apresentaram diferença deste parâmetro quando os períodos pré e pós-suplementação foram comparados (Figura 14B).

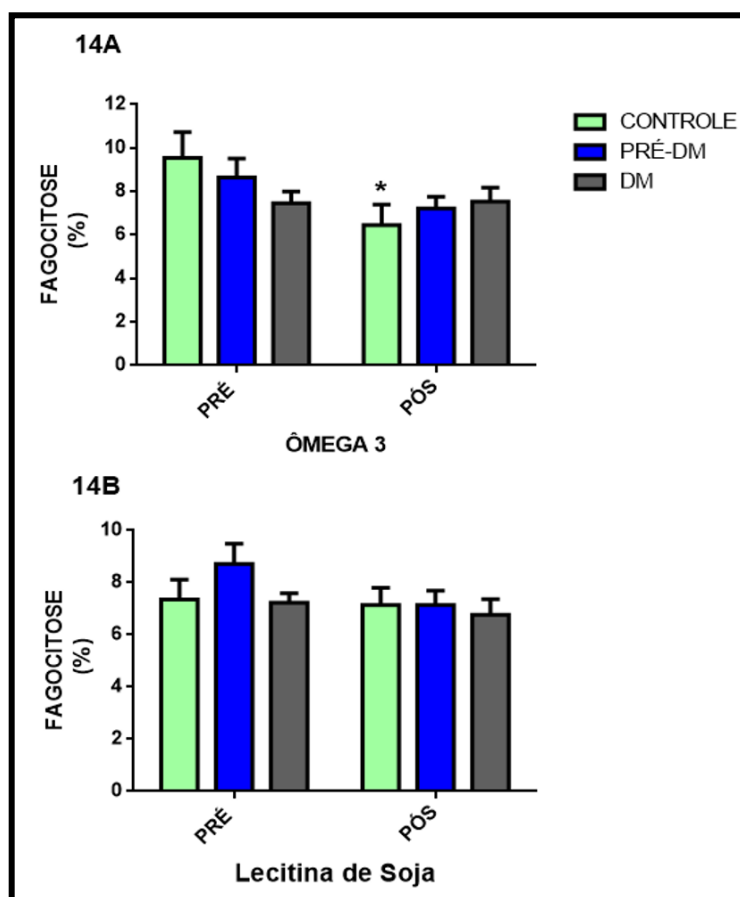


Figura 14. Atividade fagocitária de neutrófilos das voluntárias pré e pós-suplementação com Ômega 3 (14A) e Lecitina de soja (14B). Os neutrófilos foram incubados com partículas de zymozan opsonizadas com soro humano. Foi considerado como célula que realizou fagocitose a englobou três ou mais partículas de zymozan. Os dados estão expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$ quando comparado período pré e pós-suplementação. Suplementação com ômega 3 - Grupo controle N=11, pré-diabética (Pré-DM) N= 14 e diabética (DM) N= 14. Suplementação com lecitina de soja - Grupo controle N=14, pré-diabética (Pré-DM) N= 14 e diabética (DM) N= 10.

5.2.2.4 Avaliação da Produção de Espécies Reativas de Oxigênio

Antes da suplementação, os neutrófilos dos grupos controle, pré-diabético e diabético aumentaram a produção de ânion superóxido após terem sido estimulados com PMA. No entanto, após a suplementação com ômega 3 os neutrófilos dos três grupos estudados deixaram de responder a este estímulo para produção de ânion superóxido. Foi observada uma inibição de 48% e 53% na produção desta espécie reativa de oxigênio quando os neutrófilos estimulados dos grupos controle e diabético, respectivamente; foram comparados na condição pré e pós-suplementação (Figura 15A).

Do mesmo modo, a suplementação com lecitina de soja inibiu o efeito do PMA sobre a produção de ânion superóxido por neutrófilos. Após a suplementação com lecitina de soja, o grupo pré-diabético apresentou uma diminuição de 65%, na produção de ânion superóxido quando neutrófilos estimulados foram comparados na condição pré e pós suplementação (Figura 15B).

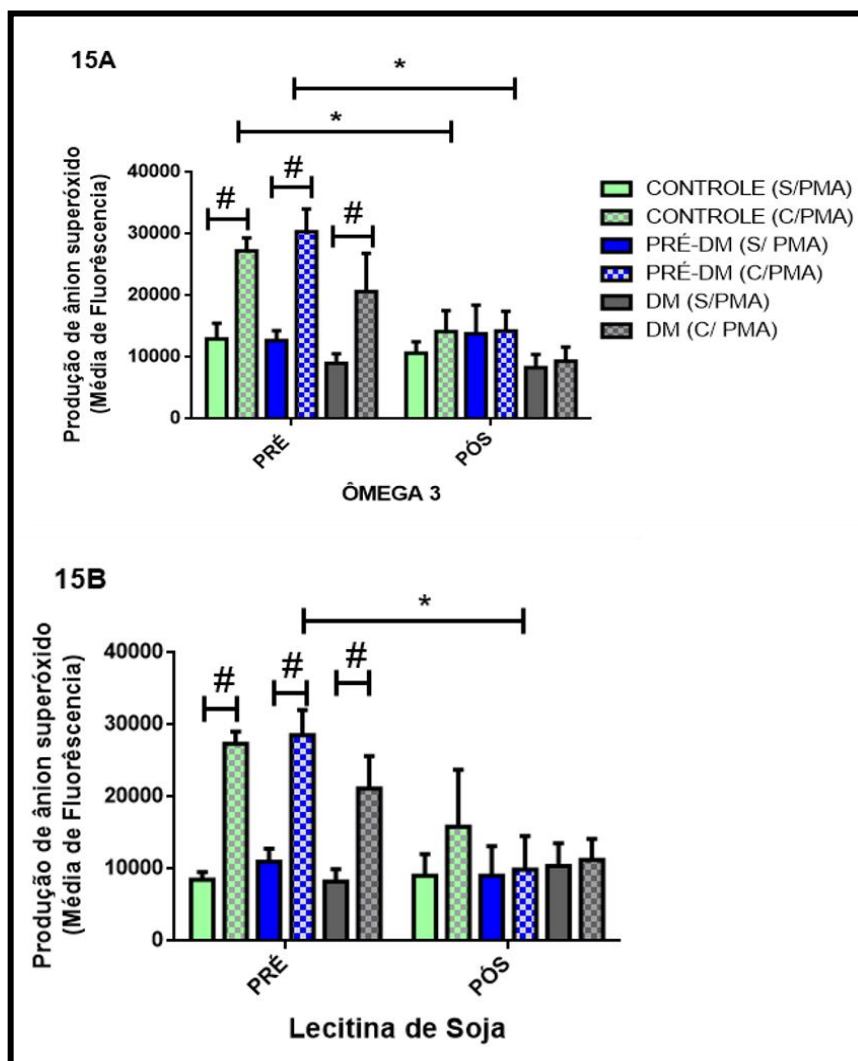


Figura 15. Produção de ânion superóxido por neutrófilos, das voluntárias pré e pós-suplementação com Ômega 3 (15A) e Lecitina de soja (15B). A produção de ânion superóxido intracelular em neutrófilos foi determinada por citometria de fluxo utilizando dididoetidina. * $p < 0,05$ quando comparado período pré com pós suplementação. Os valores estão apresentados como média \pm EPM. Suplementação com ômega 3 - Grupo controle N=9 sem e com PMA, pré-diabética (Pré-DM) N= 14 sem e com PMA e diabética (DM) N= 8. Suplementação com lecitina de soja - Grupo controle N=6 sem e com PMA, pré-diabética (Pré-DM) N= 6 sem e com PMA e diabética (DM) N= 8 sem e com PMA.

5.3 Avaliação da Produção de Citocinas

5.3.1 Avaliação da Citocina TNF α

No nosso estudo a suplementação com ômega 3 regulou a produção de TNF α , sendo observado aumento da produção desta citocina em 26,8, 50,9 e 115,75 vezes, nos neutrófilos dos grupos controle, pré-diabético e diabético, respectivamente. Quando as condições pré e pós-suplementação com ômega 3 foram comparadas foi observado uma redução de 89,88% na produção de TNF por neutrófilos não estimulados do grupo pré-diabético (Figura 16A).

A suplementação com lecitina de soja também teve um efeito regulatório na produção de TNF- α , induzindo ao aumento de 53,6 e 57,6 vezes na produção desta citocina pelos neutrófilos dos grupos controle e pré-diabético, respectivamente. Os neutrófilos não estimulados do grupo diabético reduziram a produção de TNF em 94,86% quando a condição pré e pós-suplementação foram comparadas (Figura 16B).

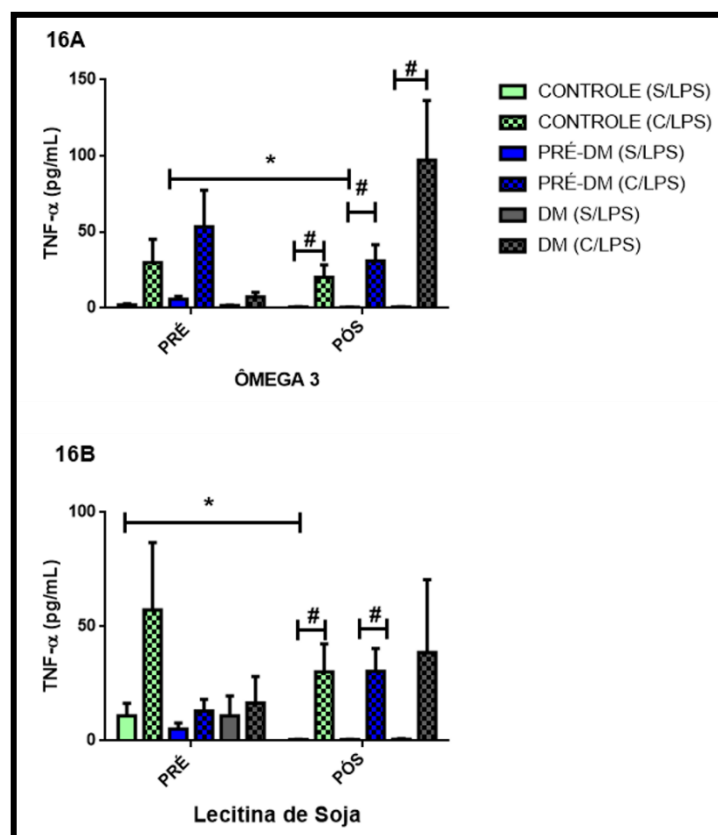


Figura 16. Produção de TNF- α em neutrófilos das voluntárias pré e pós suplementação com Ômega 3 (16A) e Lecitina de soja (16B). Neutrófilos foram mantidos em cultura por 18 horas na presença e na ausência do estímulo LPS (Lipopolissacarídeo) (1mg/mL). Após o período de incubação o sobrenadante foi removido e as análises foram realizadas por citometria de fluxo utilizando o software

BD Accuri (BD Biosciences) e o kit BDTM CBA *Human Inflammatory Cytokines* Kit (BD Biosciences). Os valores estão apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ quando comparado o período pré e pós-suplementação na ausência do estímulo LPS. # $p < 0,05$ quando comparado somente após a suplementação diante ao estímulo LPS. Suplementação com ômega 3 - Grupo controle N=15 sem e com LPS, pré-diabética (Pré-DM) N=17 sem e com LPS e diabética (DM) N=14 sem e com LPS. Suplementação com lecitina de soja - Grupo controle N=15 sem e com LPS, pré-diabética (Pré-DM) N=13 sem e com LPS e diabética (DM) N=10 sem e com LPS.

5.3.2 Avaliação da Citocina IL-1 β

Após a suplementação com ômega 3 houve aumento da produção de IL-1 β em 19,2%, 73,6 e 264,2 vezes, pelos neutrófilos dos grupos controle, pré-diabético e diabético, respectivamente; após a suplementação. Quando as condições pré e pós-suplementação com ômega 3 foram comparadas foi observado uma redução de 95,8% e 99,3% na produção de IL1 β por neutrófilos não estimulados do grupo controle e pré-diabético (Figura 17A).

A suplementação com lecitina de soja reduziu nos grupos controle e pré-diabético a produção de IL-1 β em 99,7% e 99,6%%, respectivamente quando os neutrófilos não estimulados foram comparados na condição pré e pós-suplementação. Após a suplementação foi observado que o estímulo do LPS aumentou a produção desta citocina em, 197% e 425,5 vezes, pelos neutrófilos dos grupos controle e pré-diabético respectivamente quando comparado a neutrófilos não estimulados (Figura 17B).

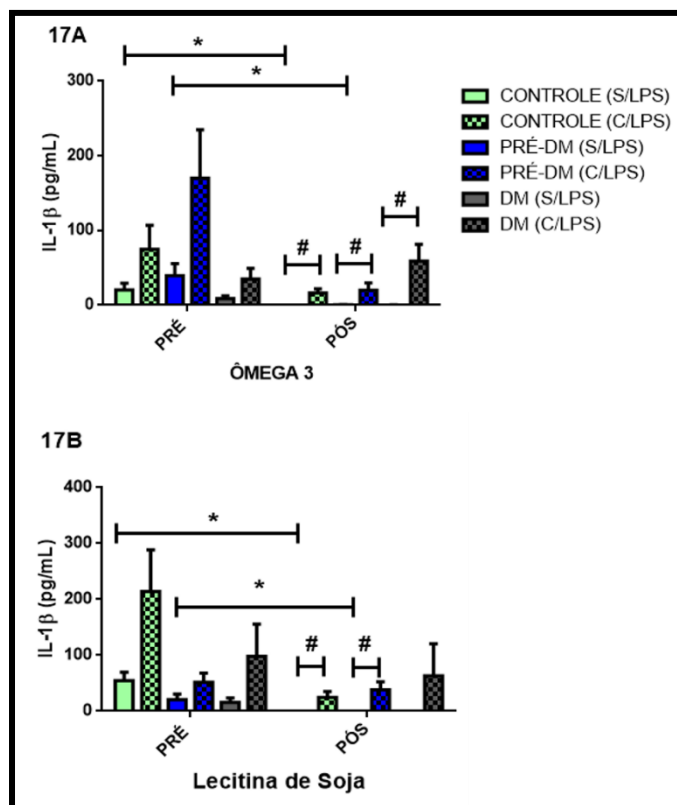


Figura 17. Produção de IL-1 β em neutrófilos das voluntárias pré e pós suplementação com Ômega 3 (17A) e Lecitina de soja (17B). Neutrófilos foram mantidos em cultura por 18 horas na presença e na ausência do estímulo LPS (Lipopolissacarídeo) (1mg/mL). Após o período de incubação o sobrenadante foi removido e as análises foram realizadas por citometria de fluxo utilizando o software BD Accuri (BD Biosciences) e o kit BDTM CBA *Human Inflammatory Cytokines* Kit (BD Biosciences). Os valores estão apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ quando comparado o período pré e pós-suplementação na ausência do estímulo LPS. # $p < 0,05$ quando comparado somente após a suplementação diante ao estímulo Suplementação com ômega 3 - Grupo controle N=15 sem e com LPS, pré-diabética (Pré-DM) N=17 sem e com LPS e diabética (DM) N=14 sem e com LPS. Suplementação com lecitina de soja - Grupo controle N=15 sem e com LPS, pré-diabética (Pré-DM) N=13 sem e com LPS e diabética (DM) N=10 sem e com LPS.

5.3.3 Avaliação da Citocina IL-6

Após a suplementação com ômega 3 houve aumento da produção de IL-6 em 216,4, 44,1 vezes, e 99,50% pelos neutrófilos dos grupos controle, pré-diabético e diabético, respectivamente; após a suplementação. Quando as condições pré e pós-suplementação com ômega 3 foram comparadas foi observado uma redução de 95,5% e 98,6% na produção de IL-6 por neutrófilos não estimulados do grupo controle e pré-diabético (Figura 18A).

A suplementação com lecitina de soja reduziu nos grupos controle e pré-diabético a produção de IL-6 em 99,2% e 98%%, respectivamente quando os neutrófilos não estimulados foram comparados na condição pré e pós-suplementação. Após a suplementação foi observado que o estímulo do LPS aumentou a produção

desta citocina em, 129,7, 114,2 e 55,71 vezes, pelos neutrófilos dos grupos controle, pré-diabético e diabético, respectivamente; quando comparado a neutrófilos não estimulados (Figura 18B).

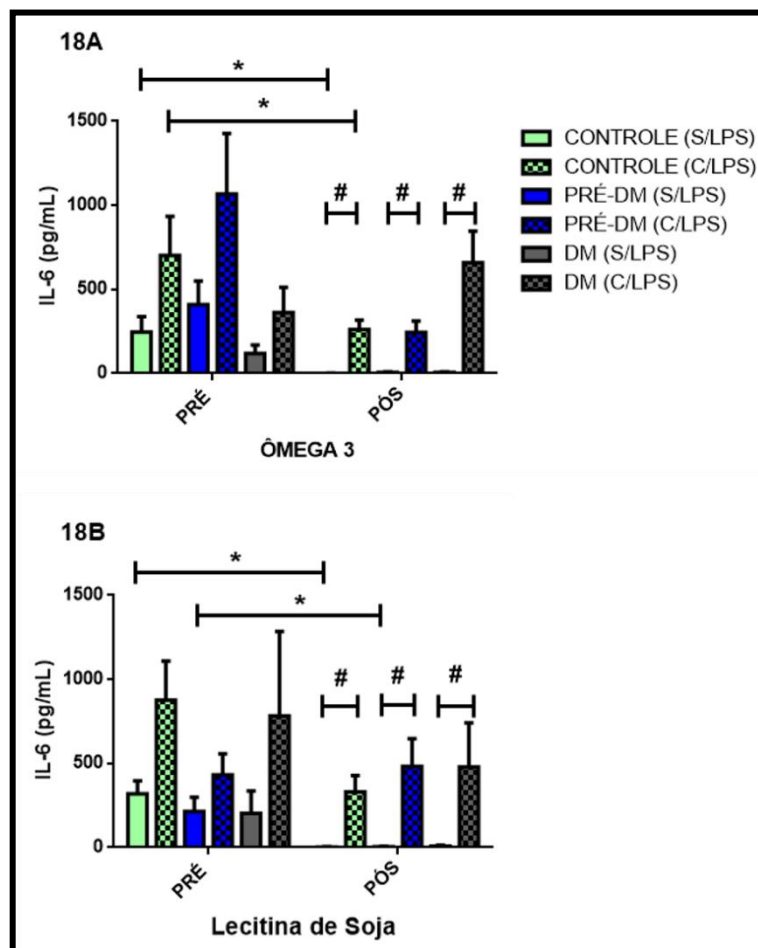


Figura18. Produção de IL-6 em neutrófilos das voluntárias pré e pós suplementação com Ômega 3 (18A) e Lecitina de soja (18B). Neutrófilos foram mantidos em cultura por 18 horas na presença e na ausência do estímulo LPS (Lipopolissacarídeo) (1mg/mL). Após o período de incubação o sobrenadante foi removido e as análises foram realizadas por citometria de fluxo utilizando o software BD Accuri (BD Biosciences) e o kit BDTM CBA *Human Inflammatory Cytokines* Kit (BD Biosciences). Os valores estão apresentados como média \pm EPM. * $p < 0,05$ quando comparado o período pré e pós-suplementação na ausência do estímulo LPS. # $p < 0,05$ quando comparado somente após a suplementação diante ao estímulo LPS. Suplementação com ômega 3 - Grupo controle N=15 sem e com LPS, pré-diabética (Pré-DM) N=17 sem e com LPS e diabética (DM) N=14 sem e com LPS. Suplementação com lecitina de soja - Grupo controle N=15 sem e com LPS, pré-diabética (Pré-DM) N=13 sem e com LPS e diabética (DM) N=10 sem e com LPS.

5.3.4 Avaliação da citocina IL-12p70

A produção da citocina IL-12p70 dos neutrófilos das mulheres suplementadas com ômega 3 (figura 19A) e lecitina de soja (figura 19 B), não houve diferença nos parâmetros analisados mesmo após o estímulo LPS.

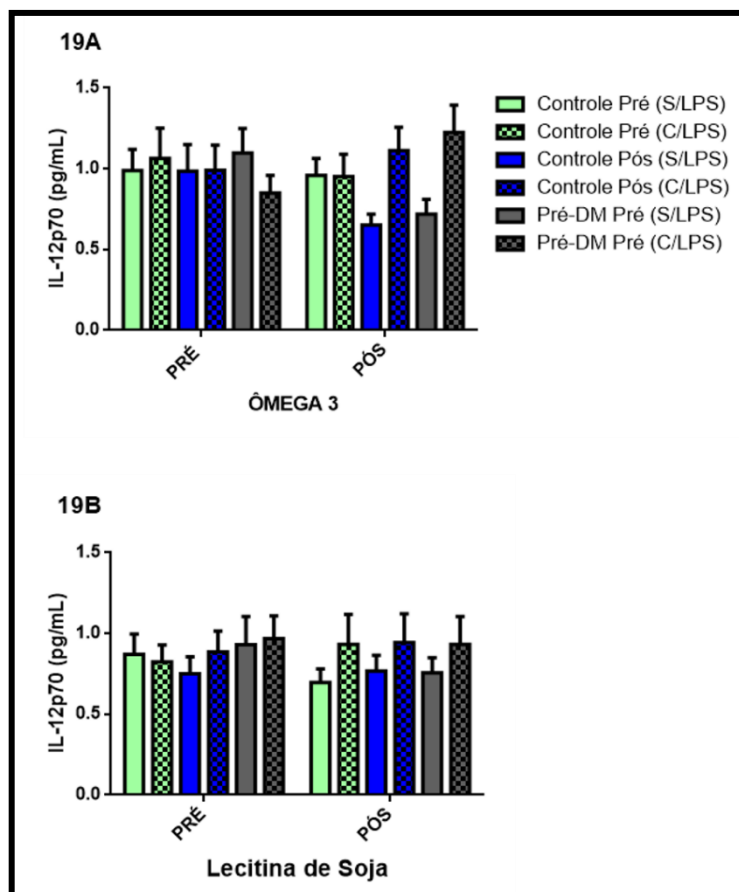


Figura 5. Produção de IL-12p70 em neutrófilos das voluntárias pré e pós suplementação com Ômega 3 (25A) e Lecitina de soja (25B). Neutrófilos foram mantidos em cultura por 18 horas na presença e na ausência do estímulo LPS (Lipopolissacarídeo) (1mg/mL). Após o período de incubação o sobrenadante foi removido e as análises foram realizadas por citometria de fluxo utilizando o software BD Accuri (BD Biosciences) e o kit BDTM CBA *Human Inflammatory Cytokines* Kit (BD Biosciences). Os valores estão apresentados como média \pm EPM. Suplementação com ômega 3 - Grupo controle N=15 sem e com LPS, pré-diabética (Pré-DM) N=17 sem e com LPS e diabética (DM) N=14 sem e com LPS. Suplementação com lecitina de soja - Grupo controle N=15 sem e com LPS, pré-diabética (Pré-DM) N=13 sem e com LPS e diabética (DM) N=10 sem e com LPS.

Após a suplementação houve aumento da produção de IL-10 em de 6,4 vezes pelos neutrófilos do grupo diabético após a suplementação. Quando as condições pré e pós-suplementação com ômega 3 foram comparadas foi observado uma redução de 84,5% na produção de IL-10 por neutrófilos não estimulados do grupo pré-diabético (Figura 20A).

A suplementação com lecitina de soja reduziu nos grupos controle a produção de IL-10 em 90,2% quando os neutrófilos não estimulados foram comparados na condição pré e pós-suplementação. Após a suplementação foi observado que o estímulo do LPS aumentou a produção desta citocina em, 3,96% 3 4,8 vezes, pelos neutrófilos dos grupos controle, pré-diabético respectivamente quando comparado a neutrófilos não estimulados (Figura 20B)

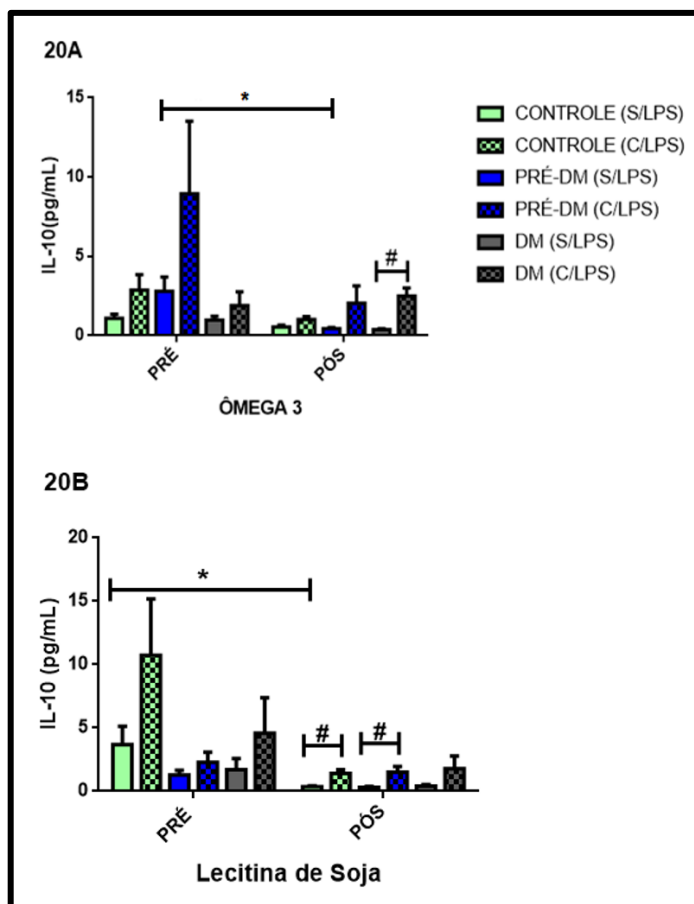


Figura 20. Produção de IL-10 em neutrófilos das voluntárias pré e pós suplementação com Ômega 3 (20A) e Lecitina de soja (20B). Neutrófilos foram mantidos em cultura por 18 horas na presença e na ausência do estímulo LPS (Lipopolissacarídeo) (1mg/mL). Após o período de incubação o sobrenadante foi removido e as análises foram realizadas por citometria de fluxo utilizando o software BD Accuri (BD Biosciences) e o kit BDTM CBA *Human Inflammatory Cytokines* Kit (BD Biosciences). Os valores estão apresentados como média \pm EPM* $p < 0,05$ quando comparado o período pré e pós-suplementação na ausência do estímulo LPS. # $p < 0,05$ quando comparado somente após a suplementação diante ao estímulo LPS. Suplementação com ômega 3 - Grupo controle N=15 sem e com LPS, pré-diabética (Pré-DM) N=17 sem e com LPS e diabética (DM) N=14 sem e com LPS. Suplementação com lecitina de soja - Grupo controle N=15 sem e com LPS, pré-diabética (Pré-DM) N=13 sem e com LPS e diabética (DM) N=10 sem e com LPS.

5.3.5 Avaliação da Viabilidade Celular

A integridade de membrana dos neutrófilos não foi alterada após a suplementação com ômega 3 (Figura 21A) ou lecitina de soja (Figura 21B) quando os grupos e períodos avaliados no estudo foram comparados.

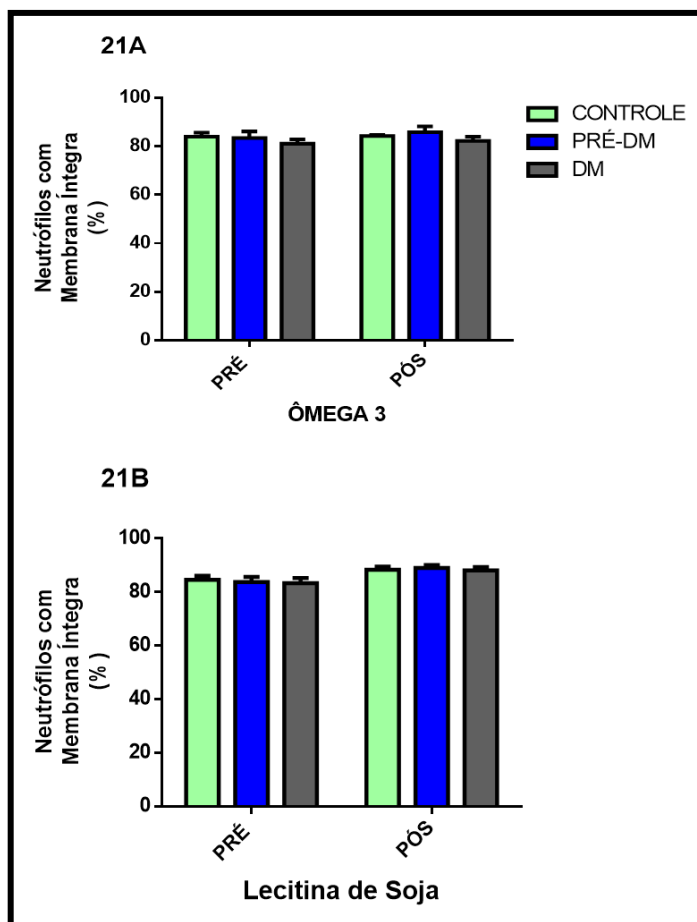


Figura 21. Integridade de membrana em neutrófilos das voluntárias pré e pós-suplementação com Ômega 3 (21A) e Lecitina de soja (21B). A integridade de membrana foi avaliada no citômetro de fluxo após incubação dos neutrófilos com iodeto de propídio. Os valores estão apresentados como média \pm EPM. Suplementação com ômega 3 Grupo controle N=10, pré-diabética (Pré-DM) N= 5 e diabética (DM) N=5 Suplementação com lecitina de soja. Grupo controle N=11, pré-diabética (Pré-DM) N= 7 e diabética (DM) N= 6.

A fragmentação de DNA não foi alterada após suplementação com ômega 3 (Figura 22A) ou lecitina de soja (Figura 22B) quando os grupos e períodos avaliados no estudo foram comparados.

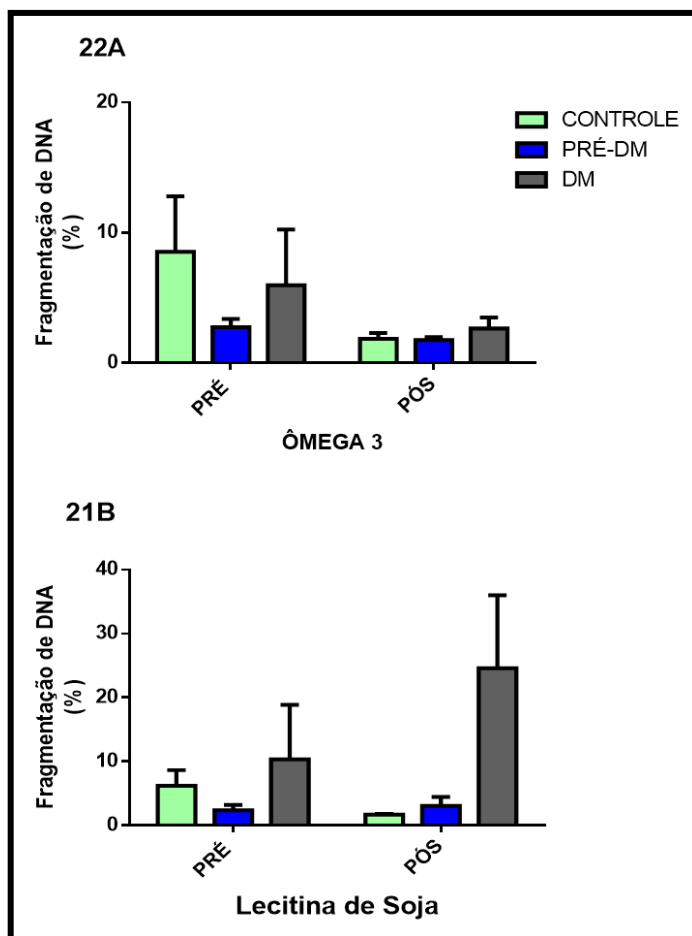


Figura 22. Célula com o DNA Fragmentado de neutrófilos das voluntárias pré e pós-suplementação com Ômega 3 (22A) e Lecitina de soja (22B). Fragmentação de DNA foi avaliada no citômetro de fluxo após incubação dos neutrófilos com iodeto de protídeo. Os valores estão apresentados como média \pm EPM. Suplementação com ômega 3 - Grupo controle N= 7 pré-diabética (PRÉ-DM) N=7 e diabética (DM) N= 5. Suplementação com lecitina de soja - Grupo controle N= 6 pré-diabética (PRÉ-DM) N=3 e diabética (DM) N= 5 suplementadas com lecitina de soja.

5.3.6 Análise de Polaridade Mitocondrial

Não houve diferença na polaridade de membrana mitocondrial quando os grupos controle, pré-diabético e diabético foram suplementados com graxo ômega 3 (Figura 23A) ou lecitina de soja (Figura 23B).

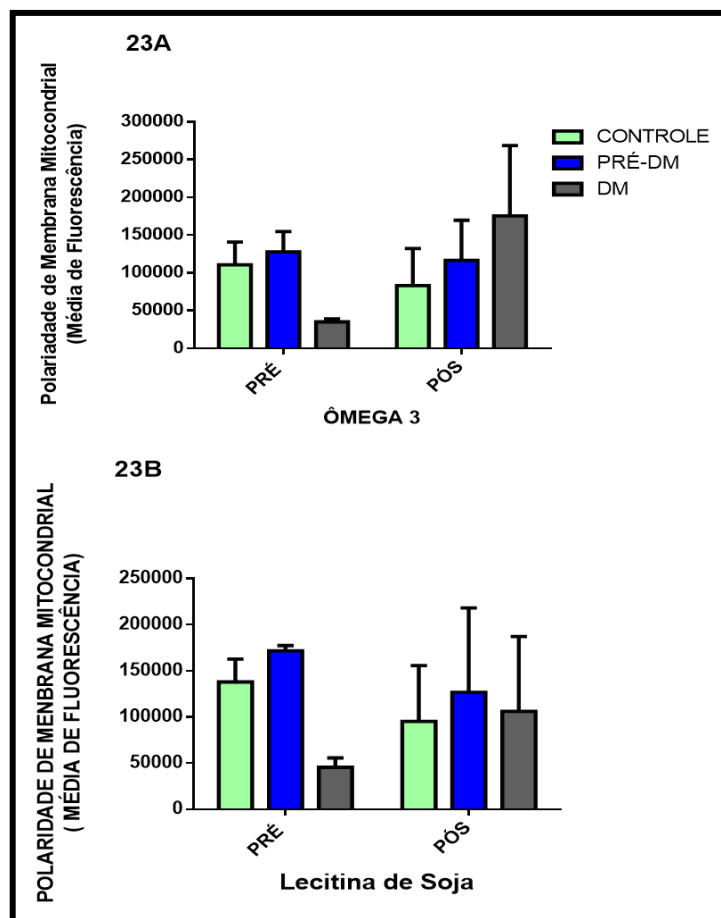


Figura 23. Polaridade de Membrana Mitocondrial em neutrófilos das voluntárias pré e pós-suplementação com Ômega 3 (23A) e Lecitina de soja (23B). Os neutrófilos foram obtidos da corrente sanguínea das voluntárias e em seguida foram incubados com o fluorocromo Rodamina 123, após 30 minutos as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo. Os valores estão apresentados como média \pm EPM. Suplementação com ômega 3 - Grupo controle N=5, pré-diabética (Pré-DM) N= 8 e diabética (DM) N=5. Suplementação com lecitina de soja - Grupo controle N=5, pré-diabética (Pré-DM) N= 3 e diabética (DM) N= 4.

5.4 Resumo dos Resultados Encontrados

A figura 24A e 24B apresenta o resumo dos resultados encontrados na função e morte de neutrófilos no grupo controle, pré-diabético e diabético no período pré pós-suplementação com ômega 3 e lecitina de soja.

24A							24B						
Ômega 3	Controle		Pré-diabética		Diabética		Lecitina de Soja	Controle		Pré-diabética		Diabética	
	Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós		Pré	Pós	Pré	Pós	Pré	Pós
CD62L	—	↑	—	↑	—	↑	CD62L	—	↑	—	↑	—	↓
CD54-ICAM	—	↓	—	—	—	—	CD54-ICAM	—	↓	—	↓	—	—
Fagocitose	—	↓	—	—	—	—	Fagocitose	—	—	—	—	—	—
ERO	—	—	—	—	—	—	ERO	—	—	—	—	—	—
ERO + PMA	↑	↓	↑	↓	↑	—	ERO + PMA	↑	↓	↑	—	↑	—
TNF α	—	—	—	↓	—	—	TNF α	—	↓	—	—	—	—
TNF α + LPS	—	↑	—	↑	—	↑	TNF α + LPS	—	↑	—	↑	—	—
IL-1 β	—	↓	—	↓	—	—	IL-1 β	—	↓	—	↓	—	—
IL-1 β + LPS	—	↑	—	↑	—	↑	IL-1 β + LPS	—	↑	—	↑	—	—
IL-6	—	↓	—	↓	—	—	IL-6	—	↓	—	↓	—	—
IL-6 + LPS	—	↑	—	↑	—	↑	IL-6 + LPS	—	↑	—	↑	—	↑
IL-12p70	—	—	—	—	—	—	IL-12p70	—	—	—	—	—	—
IL-12p70 + LPS	—	—	—	—	—	—	IL-12p70 + LPS	—	—	—	—	—	—
IL-10	—	—	—	↓	—	—	IL-10	—	↓	—	—	—	—
IL-10 + LPS	—	—	—	—	—	↑	IL-10 + LPS	—	↑	—	↑	—	—
Viabilidade celular	—	—	—	—	—	—	Viabilidade celular	—	—	—	—	—	—
Fragmentação de DNA	—	—	—	—	—	—	Fragmentação de DNA	—	—	—	—	—	—
Polaridade de membrana Mitochondrial	—	—	—	—	—	—	Polaridade de membrana Mitochondrial	—	—	—	—	—	—

Figura 24. Resultado pré e pós-suplementação com Ômega 3 (24A) e Lecitina de soja (24B). ↑ indica que teve aumento; indica que teve diminuição ↓; não indica alteração —.

6. DISCUSSÃO

A prevalência de DM na população pode estar relacionada a idade, sexo e fatores biológicos e psicossociais. ZHANG et al., 2019 verificaram que existe uma maior incidência de DM2 em homens do que em mulheres. Além disso, estes autores demonstraram que a incidência da diabetes é maior em idosos (acima de 65 anos) e em indivíduos com valores elevados de IMC. Outros estudos epidemiológicos também evidenciaram que o sobrepeso e a obesidade possuem grande importância no aumento da prevalência de pré-diabetes e DM (AL-GOBLAN, AL-ALFI e KHAN, 2014; BOLES et al., 2017; CASPARD et al., 2014). Nossos dados corroboram com a literatura, pois os grupos pré-diabético e diabético apresentaram um percentual de mulheres com excesso de peso maior do que o grupo controle. O aumento do tecido adiposo observado na obesidade permite infiltração de macrófagos e leva a liberação de citocinas pró-inflamatórias como o TNF α na circulação (TRAYHURN e WOOD, 2005; CATALÁN et al., 2007). As citocinas pró inflamatórias ativam a função de leucócitos, dentre eles os neutrófilos e levam a um quadro de inflamação crônica.

Uma vez ativado o neutrófilo migra para o local lesionado. Para isto realiza o rolamento e adesão ao endotélio por meio da interação de moléculas de adesão presentes na membrana dos neutrófilos com moléculas do endotélio vascular. A L-selectina (CD62L) desempenha papel importante no rolamento destas células na parede do vaso sanguíneo (DELVES; ROITT, 2000; MAYADAS et al 2013, PATARROYO e MAKGOBA, 1989). A molécula intercelular-1 ICAM-1 (CD54) faz parte das imunoglobulinas que interagem com as integrinas presentes nos neutrófilos e é responsável pela adesão e diapedese dos neutrófilos. Deste modo, estas moléculas regulam a migração dos neutrófilos para o local de inflamação ou lesão. No nosso estudo os neutrófilos do grupo pré-diabético e diabético não apresentaram alteração na expressão de CD62L quando comparado ao grupo controle. Do mesmo modo, SAMPSON et al., 2002 demonstraram que neutrófilos de idosos diabéticos, de ambos os sexos, não apresentaram diferença na expressão desta molécula de adesão (SAMPSON et al., 2002). Por outro lado, pacientes diabéticos com 50 anos, de ambos os sexos, que apresentavam microangiopatia tiveram redução da expressão de

CD62L em neutrófilos, o mesmo não foi observado em diabéticos sem microangiopatia (MASTEJ e ADAMIEC 2008).

Apesar de não ter sido observado alteração no CD62L, no nosso estudo houve redução da ligação de imunoglobulina ICAM (CD54) na membrana dos neutrófilos do grupo diabético. A redução na expressão desta molécula pode prejudicar o processo de migração dos neutrófilos e assim o início do processo inflamatório.

A suplementação com AG ômega 3 aumentou a expressão do CD62L nos neutrófilos de todos os grupos investigados. Além disso, reduziu a expressão de CD54 na membrana dos neutrófilos. O aumento de CD62L facilita o rolamento dos neutrófilos e pode ter ocorrido para compensar a redução de CD54 e assim manter a função de migração dos neutrófilos. Corroborando com nosso estudo outros trabalhos já demonstraram efeito inibitório do CD54 em outros tipos celulares após tratamento com AG ômega 3. Em outro estudo, os AG EPA e DHA na concentração de 100 μM pós 24 horas atenuaram a expressão de CD54 em células endoteliais da aorta humana após o estímulo de LPS durante 12 horas em um estudo de aterosclerose. Para simular as condições em in vitro, foram usadas as células monócíticas THP-1 (HUANG et al., 2015). TULL et al., 2009 observaram redução de células que realizaram a diapedese, após tratamento por 24h das células endoteliais com EPA seguido da utilização do estímulo de TNF α nas 4 horas finais. Ácidos graxo ômega 3 reduzem a expressão de ICAM-1, VCAM-1 e Selectina-E nas células endoteliais, por outro lado já foi demonstrado que os AG Ômega 6 aumentam a expressão de ICAM-1 e VCAM-1 (POMPÉIA et al., 2000, CALDER, 2006). Interessantemente a lecitina de soja também induziu a expressão de CD62L na membrana dos neutrófilos dos grupos controle e pré-diabético e reduziu a expressão de ICAM-1 (CD54).

Após migrarem para o local da lesão, os neutrófilos realizam fagocitose, processo essencial na eliminação de patógenos extracelulares. A fagocitose compreende o reconhecimento do patógeno através de receptores de membrana e sua internalização no vacúolo fagocítico (COHEN, 1994).

Gorjão et al., 2006 demonstraram que óleo de peixe rico em DHA estimulou a fagocitose em neutrófilos após suplementação com óleo contendo 26% EPA e 54% de DHA, em uma dose de 3 g / dia, durante 2 meses (GORJÃO et al., 2006). Em

contrapartida, foi visto que os neutrófilos de voluntários saudáveis que foram suplementados com 6 g / dia de óleo de peixe rico em EPA (2,1 g de EPA / dia) durante 6 semanas tiveram uma diminuição na atividade fagocitária (VIRELLA et al. 1989). Nosso estudo também utilizou um suplemento com maior quantidade de EPA e foi observado que somente os neutrófilos das mulheres do grupo controle suplementadas com os AG ômega 3 apresentaram redução na fagocitose. HALVORSEN et al. (1997) demonstrou que a utilização de um suplemento com doses similares de EPA (3,8 g) e DHA (3,6 g) durante 7 semanas não alterou a fagocitose de monócitos de homens saudáveis (HALVORSEN et al. 1997). Deste modo, a modulação da função dos neutrófilos pode estar relacionada com a concentração de EPA e DHA existente nos suplementos. De fato, Paschoal et al., (2013) demonstraram que o DHA aumentou a capacidade fagocítica e a atividade fungicida dos neutrófilos de ratos Wistar, enquanto o EPA não alterou estas funções (PASCHOAL, et al 2013).

Ratos wistar diabéticos e não diabéticos suplementados com lecitina de soja apresentaram redução na fagocitose de macrófagos (MIRANDA et al., 2008). Porém, no nosso estudo, a suplementação com lecitina de soja não alterou a fagocitose dos neutrófilos nos grupos estudados.

A fagocitose resulta na ativação do *burst* oxidativo e aumento da produção de ERO. As ERO geradas auxiliam na digestão e morte dos patógenos fagocitados, portanto são importantes agentes microbicidas. Em nosso estudo, os neutrófilos das mulheres do grupo diabético não responderam ao estímulo de acetato de forbol miristato (PMA) do mesmo modo que os neutrófilos dos grupos controle e pré-diabético. ALBA-LOUREIRO et al (2006) demonstraram que a atividade fagocitária e a produção de peróxido de hidrogênio, estimulada por PMA, foi menor em neutrófilos de ratos diabéticos quando comparado com controles. Ao contrário dos resultados encontrados no nosso estudo e no de ALBA-LOUREIRO, HAND et al., (2007) investigou em pacientes diabéticos tipo 2 os leucócitos, na maioria neutrófilos, na ausência de estímulo PMA e verificaram um aumento da produção de ânion superóxido quando comparado ao grupo controle composto por hispânicos não diabéticos. A adição do estímulo PMA também resultou em elevação da produção desta ERO por neutrófilos do grupo diabético. O aumento da resposta respiratória oxidativa pode contribuir para a predisposição à infecção e à resposta inflamatória crônica presente no DM (HAND et al., 2007).

Nossos achados demonstram que a suplementação com ômega 3 inibiu a produção de ERO por neutrófilos estimulados nos três grupos investigados. O mesmo foi observado após suplementação com lecitina de soja. Em acordo com nossos dados, REES et al. (2006), demonstraram que a ingestão de óleo rico em EPA causa uma redução dose dependente no *burst* oxidativo de neutrófilos. Outros autores também demonstraram que a administração de EPA suprime a geração de ERO in vivo (RICHARD et al., 2008; VAN DEN ELSEN et al., 2013). Por outro lado, Paschoal e colaboradores (2013) demonstraram que neutrófilos de ratos estimulados com PMA, cultivados isoladamente com os ácidos EPA ou DHA aumentaram a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Foi demonstrado ainda que o EPA apresenta um efeito mais pronunciado do que o DHA na produção de ânion superóxido dos neutrófilos na ausência e na presença do estímulo PMA ou zimozan (PASCHOAL, et al 2013).

A produção de ERO nos neutrófilos ocorre preferencialmente por meio da ativação da enzima NADPH-oxidase. Esta enzima converte a molécula de oxigênio (O_2) em ânion superóxido (O_2^-), uma potente ERO, utilizando o NADPH como doador de elétrons (CLARK et al., 1990; DUSI; DONINI; ROSSI, 1996, DINAUER et al., 2014). Em situações fisiológicas, a ativação de NADPH oxidase nos neutrófilos é fortemente regulada para evitar danos aos tecidos. No entanto, na inflamação crônica ocorre um desequilíbrio na fosforilação das subunidades de NADPH oxidase e os componentes migram para membrana celular resultando em aumento da produção de ERO (SHEPPARD et al., 2005) e indução de lesão tecidual.

No nosso estudo os AG ômega 3 podem ter modulado proteínas envolvidas na ativação da NADPH-oxidase e assim reduzido a produção de ERO. SHEN et al., (2018) demonstraram em tecido cerebral de ratos com aterosclerose intracraniana, que o efeito do ômega 3 na redução da produção de ERO parece ser mediado pela inibição da expressão das subunidades da enzima NADPH-oxidase. Os ratos receberam dieta diária com 1% colesterol durante 6 semanas.

Em outro estudo LEE et al., (2018) verificaram, que a resolvina D1, um dos mediadores lipídicos endógenos derivados do EPA, inibe a explosão oxidativa derivada do processo de eferocitose (fagocitose de células em apoptose ou necrose) e assim previne a apoptose de células RAW264.7 (macrófago). Estes autores demonstraram ainda que este efeito é mediado pela inativação da NADPH oxidase

(LEE et al., 2018). A utilização de apocinina, um inibidor da enzima NADPH-oxidase, reduziu a produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos (RAW264.7) que realizaram eferocitose.

O efeito do EPA sobre a produção de ERO também pode ser decorrente do aumento da produção de enzimas antioxidantes (KUSUNOKI ET AL., 2013; MAHMOUDABADI e RAHBAR, 2014; PALANISWAMY et al., 2014). Já foi demonstrado que o EPA possui atividade antioxidante em pacientes diabéticos tipo 2 (MAHMOUDABADI e RAHBAR, 2014), em ratos expostos a poluentes orgânicos (PALANISWAMY et al., 2014) e contra o estresse oxidativo em adipócitos (KUSUNOKI et al., 2013). Assim, no nosso estudo a redução na produção de ERO após a suplementação com ômega 3 (rico em EPA) pode ter sido causada por modulação da NADPH-oxidase ou por aumento da capacidade anti-oxidante. A determinação do mecanismo envolvido ainda deve ser investigada nos próximos estudos.

A homeostase da resposta dos neutrófilos na inflamação é controlada por citocinas e quimiocinas (PYNE, 1994). Na resposta inflamatória, várias citocinas são secretadas por neutrófilos e macrófagos devido à ativação de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) presentes em suas membranas por componentes e/ou produtos de microrganismos ou células necróticas (TAKEUCHI e AKIRA et al., 2010).

Os neutrófilos produzem citocinas anti e pró-inflamatórias, além disso, também apresentam receptores de superfície celular específicos para os diferentes tipos de citocinas (FUTOSI, FODOR e MÓCSAI, 2013). As citocinas pró-inflamatórias (IL-8, IL-1 β , TNF- α Fator de Necrose Tumoral Alfa) produzidas pelos neutrófilos, ativam e atraem outros leucócitos assim como monócitos, linfócitos T e B para o local da lesão ou inflamação (SELVATICI E FALZARANO, 2006; RIGBY e DELEO 2012; KIELIAN et al., 2004; EI-BENNA et al., 2016; CASSATELLA 1999; SCAPINI et al., 2000; MANTOVANI et al., 2011).

Em humanos foi observado um aumento na expressão das citocinas IL-8, IL-1 β e TNF α após 18 horas de estímulo com LPS, (HATANAKA et al., 2006). GLOWACKA et al., (2002) analisou a produção da citocina IL-10 por neutrófilos de

pacientes, com idade entre 8 e 26 anos, pré-diabéticos e diabéticos tipo 1. Após 21 horas de incubação com LPS observaram aumento da produção desta citocina.

No nosso estudo não houve alteração na produção das citocinas pró-inflamatórias (IL1, IL6 e IL12) e anti-inflamatória IL-10 pelos neutrófilos estimulados ou não com LPS quando os grupos controle, pré-diabético e diabético foram comparados antes da suplementação. O estímulo LPS aumentou a produção de TNF α nos neutrófilos do grupo controle, no entanto não alterou a produção desta citocina nas células dos grupos pré-diabéticos e diabéticos. KUWABARA et al., 2018 et al., demonstraram que neutrófilos de ratos diabéticos produzem menor quantidade de citocinas pró-inflamatórias (IL1 β , IL6, TNF α) após 30 minutos do estímulo LPS (KUWABARA et al., 2018).

No nosso estudo foi observado que os neutrófilos sem estímulo tiveram a produção das citocinas pró-inflamatórias (TNF α , IL1 β e IL-6) inibida após a suplementação com ômega 3. No entanto, a suplementação induziu a produção de citocinas após estímulo dos neutrófilos com LPS, sugerindo uma melhor resposta destas células após exposição a um estímulo ou patógeno. A mesma resposta foi observada após suplementação com lecitina de soja.

A suplementação com EPA suprime a inflamação crônica em vários modelos animais, incluindo asma induzida por ovalbumina em camundongos (SCHUSTER et al., 2014), síndrome metabólica induzida por dieta hiperlipídica em ratos (POUDYAL et al., 2013), esteato-hepatite fibrótica induzida pela dieta com colesterol alto em ratos (JIA et al., 2012) e lesão cerebral isquêmica em gerbos (OKABE et al., 2011).

Estudos demonstraram que o EPA e o DHA diminuíram a produção, in vitro, de IL-6 e IL-8 em células endoteliais humanas estimuladas com LPS (De Caterina et al., 1994; KHALFOUN et al. 1997). A produção da citocina TNF também é reduzida pelo EPA em monócitos estimulados com LPS (BABCOCK et al., 2002; NOVAK et al., 2033; ZHAO et al., 2003). Do mesmo modo, a dieta rica com ômega 3 diminuiu a produção de TNF, IL-1 β e IL-6 por macrófagos de camundongos estimulados com LPS (YAQOUB E CALDER, 1995; BILLIAR et al., 1988; RENIER et al., 1993). Estudos com suplementação em animais e em humanos mostraram que ômega 3 reduziram a

produção de citocinas pró-inflamatórias também em linfócito (TERADA et al., 2001; ENDRES et al., 1989).

Neutrófilos estimulados com LPS aumentaram a produção de IL-1 β , in vitro, apenas após cultivo com o ácido DHA (PASCHOAL, et al 2013). A concentração dos AG ômega 3 em contato com as células também pode influenciar na resposta observada. Neutrófilos de ratos cultivados com concentração de EPA ou DHA de 25 μ M apresentaram aumento da produção de TNF α . No entanto, a concentração de 50 μ M de DHA reduziu a produção desta citocina pelos neutrófilos, enquanto esta mesma concentração do ácido EPA manteve uma alta produção de TNF α (PASCHOAL, et al 2013). A produção basal de IL-1 β por neutrófilos não estimulados in vitro, não foi alterada após tratamento com EPA ou DHA, no entanto, o DHA aumentou a produção desta citocina por neutrófilos na presença de LPS, ao contrário o EPA que não alterou a produção de IL1 β (PASCHOAL et al., 2013). Simon et al., (2013), após cultivo com a ácido graxo EPA, palmítico e linoleico na concentração de 250 μ M, também não encontrou alteração na produção de IL-1 β em células do sangue total (PBMC) de pacientes diabéticos tipo 1,2 e DM autoimune latente do adulto, com idade entre 40 e 50 anos.

Diante disso, é possível verificar que os ômega 3 alteram as vias de sinalização que controlam a expressão gênica nas células inflamatórias (CALDER, 2017). O fator nuclear kappa B (NF- κ B) é um dos principais fatores de transcrição envolvidos na regulação de proteínas envolvidas na inflamação, incluindo citocinas, moléculas de adesão e COX-2. NF- κ B inativo fica como trímero no citosol; e é ativado através de uma cascata de sinalização desencadeada por vários estímulos inflamatórios extracelulares, incluindo a ligação do LPS ao receptor Toll-like (TLR) 4. Essa cascata resulta na fosforilação de I κ B, que fica presente como um dímero e é degradado. Ocorre translocação do dímero NF- κ B do núcleo e regulação positiva da expressão gênica inflamatória. O EPA e o DHA podem diminuir a expressão da superfície celular das moléculas de adesão e a produção de citocinas inflamatórias e metabólitos da COX-2. Um mecanismo comum para explicar esses efeitos seria um impacto no sistema NF- κ B. O EPA diminuí a ativação induzida por LPS de NF- κ B em monócitos humanos (LO et al., 1999; NOVAK et al., 2003), tal fato está associado à diminuição da fosforilação de I κ B (NOVAK et al., 2003; ZHAO et al., 2004). Da mesma forma, o DHA também reduz a ativação do NF- κ B em resposta ao LPS em macrófagos

cultivados, um efeito que envolve a diminuição da fosforilação de I κ B (LEE et al., 2001).

A produção de citocinas no sobrenadante dos leucócitos é pouco descrita na literatura, sendo a grande maioria dos trabalhos descrevem as variações destes mediadores no plasma ou no pâncreas.

CROOK, TUTT e PICKUP (1993) e Pickup, et al. (1997), relataram que DM2 é uma condição inflamatória caracterizado por concentrações elevadas de citocinas inflamatórias no plasma assim como a IL-6. PICKUP et al (2000) relatou que IL-6 plasmática e o TNF α aumentaram significativamente no DM 2 em comparação com indivíduos normais. No entanto, a produção basal de IL-6 e TNF α em células mononucleares do sangue periférico de diabéticos foi reduzida quando comparado com grupo controle. A produção de IL-6 e TNF α aumentou no sangue total, após 24 horas, na presença e na ausência de LPS.

A morte de neutrófilos foi investigada por meio da determinação da integridade de membrana celular, fragmentação de DNA e polaridade de membrana mitocondrial. Em nosso estudo não verificamos diferença da fragmentação de DNA e integridade de membrana celular quando os neutrófilos das mulheres pré-diabéticas e diabéticas foram avaliados e comparados ao grupo controle. A suplementação com ômega 3 ou com lecitina de soja também não alterou os parâmetros de morte celular.

A polaridade de membrana mitocondrial é alterada durante os estágios iniciais da morte celular, podendo levar a abertura do poro de transição e assim permitir o extravasamento de proteínas mitocondriais para o citosol, o que resulta na ativação de caspase 3 e assim apoptose celular.

Apesar de não ter sido verificado alteração na fragmentação de DNA, no nosso estudo o grupo diabético apresentou neutrófilos com despolarização de membrana mitocondrial quando comparado ao grupo controle e pré-diabético. KUWABARA et al., (2017) mostrou que os leucócitos apresentaram diminuição da integridade da membrana plasmática, aumento da fragmentação do DNA e despolarização da membrana mitocondrial (KUWABARA et al., 2017).

Uma das dificuldades encontradas no nosso estudo foi a realização do teste de fragmentação de DNA. Durante o ensaio houve formação de aglomerados celulares que inviabilizaram a análise de algumas amostras no citômetro, deste modo o número de amostras que compuseram o ensaio de fragmentação de DNA foi reduzido e tal fato pode ter alterado o poder estatístico da análise.

A suplementação com ômega 3 ou com lecitina de soja não alterou a polaridade da membrana mitocondrial dos neutrófilos dos grupos investigados.

O EPA e o DHA podem modular diferentemente aspectos da resposta de neutrófilos, o conhecimento da dose destes AG nos suplementos é relevante para o sucesso de terapias, dependendo do efeito requerido (PASCHOAL, et al 2013). No nosso estudo é o primeiro a demonstrar que a suplementação com ômega 3 (rica em EPA) regula a expressão de receptores de superfície para favorecer a migração dos neutrófilos e melhora a resposta destas células ao estímulo do LPS, principalmente nas mulheres pré-diabéticas e diabéticas. Vale ressaltar que o processo de morte celular não foi alterado após a suplementação.

A lecitina de soja foi utilizada no estudo como placebo, porém teve um efeito similar ao ômega 3 na supressão da função dos neutrófilos nas mulheres dos grupos investigados. A fosfatidilcolina é o principal produto da lecitina de soja. Sua composição é relacionada em sistemas biológicos, desempenhando efeitos importantes sobre os lipídios (NAVDER et al., 1997; NAKAJIMA et al., 2001). A suplementação com lecitina na dieta melhora o perfil lipídico no sangue em pacientes com alto nível de gorduras no sangue (MEDIC et al., 2003).

A função de leucócitos também parece ser modulada pela lecitina. MIRANDA et al., 2008 demonstraram que ratos wistar diabéticos e não diabéticos suplementados com lecitina de soja apresentaram redução na fagocitose de macrófagos (MIRANDA et al., 2008). Em linfócitos a adição de fosfatidilcolina ao meio de cultura inibiu a proliferação de linfócitos de ratos estimulada pela concanavalina A. O co-cultivo de macrófagos tratados com fosfatidilcolina e lavados, e linfócitos estimulados com concanavalina induz a uma inibição da proliferação de linfócitos. Portanto, neste tipo de co-cultura a fosfatidilcolina pode atuar como mediadora do efeito dos macrófagos na proliferação de linfócitos (NISHIYAMA E CURI, 2000).

Apesar destes dados, nosso estudo demonstra pela primeira vez que a lecitina de soja também altera a função de neutrófilos, levando a efeitos anti-inflamatórios similares ao ômega 3. Mais estudos são necessários para definir os mecanismos envolvidos na modulação da função dos neutrófilos por este fosfolípido.

Analisando os dados podemos concluir que a suplementação com ômega 3 teve um efeito anti-inflamatório na função dos neutrófilos das mulheres pré-diabéticas e diabéticas, além disso tornou os neutrófilos mais responsivos a estímulo para produção das citocinas pró e anti-inflamatórias. Esses efeitos poderiam auxiliar no controle da resposta inflamatória crônica verificada em pacientes diabéticos.

7. REFERÊNCIAS

ABBAS, ABUL K. et al. *Imunologia Celular e Molecular*, 6^oed. Elsevier, 2008.

ADEREM, A., ULEVITCH, R.J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**. Aug 17;406(6797):782-7, 2000.

AKGUL, C., MOULDING, D.A., Edwards, S.W. Molecular control of neutrophil apoptosis. **Febs Lett**. 487: 318-322, 2001.

ALBA-LOUREIRO, T. C., HIRABARA, S.M., MENDONÇA R.J., CURI, R., PITHON-CURI R. C.T. Diabetes causes marked changes in function and metabolism of rat neutrophils. **J. of Endocrinology**. 188, 295–303, 2006.

ALBA-LOUREIRO, T.C., C.D. MUNHOZ, MARTINS J.O., CERCHIARO, G.A., SCAVONE, C., CURI, R., SANNOMIYA P. Neutrophil function and metabolism in individuals with diabetes mellitus. **Braz J Med Biol. Res** 40(8) 2007

ALBA-LOUREIRO, T.C., PITHON-CURI, T.C., CURI, R. Reduced cytokine production by glycogen-elicited peritoneal cells from diabetic rats. **Shock**. Sep;30(3):308-10, 2008.

AL-GOBLAN, A.S., AL-ALFI, M.A., KHAN, M.Z. Mechanism linking diabetes mellitus and obesity. **Diabetes Metab Syndr Obes**. 2014 Dec 4;7:587-91, 2014.

ALLEVA, D.G., JOHNSON, E.B., LIO, F.M., BOEHME, S.A., CONLON, P.J., CROWE, P.D. Regulation of murine macrophage proinflammatory and anti-inflammatory cytokines by ligands for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma: counter-regulatory activity by IFN-gamma. **J Leukoc Biol**. 2002 Apr;71(4):677-85, 2002.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION - ADA. 2: Classification and diagnosis of diabetes. **Diabetes Care**. 40(Suppl 1):S11-24, 2017.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION - ADA. Diagnosis and classification of Diabetes Mellitus., **Diabetes Care**, v 33-1; 2010.

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION – ADA. Standards of medical care in diabetes. **Diabetes Care** (Suppl 1) January 01 v 42 2019

AMERICAN DIABETES ASSOCIATION - ADA: Nephropathy in Diabetes. **Diabetes Care** 27(S1):S79-83, 2004.

ARNAOUT, M. A. Structure and function of the leukocyte adhesion molecules CD11/CD18. **Blood**. 75, 1037–1050, 1990.

ASNAGHI V, GERHARDINGER C, HOEHN T, ADEBOJE A, LORENZI M. A role for the polyol pathway in the early neuroretinal apoptosis and glial changes induced by diabetes in the rat. **Diabetes**. Feb;52(2):506-11, 2003.

- ATKINSON MA1, MACLAREN NK. The pathogenesis of insulin-dependent diabetes mellitus. **N Engl J Med**. Nov 24;331(21):1428-36, 1994
- BABIOR, B.M. NADPH oxidase: An update. **Blood**. 93(5):1464-76,1999.
- BABIOR, B. M. NADPH oxidase. **Curr Opin Immunol**. Feb;16(1):42-7, 2004.
- BALBINO, C.A., PERREIRA, M.P., CURI, R. Mecanismo envolvidos na cicatrização: Uma revisão, **Rev. Bras de ciências Farmacêuticas**, v,41,n.1, 2005.
- BELOTTO MF, MAGDALON J, RODRIGUES HG, VINOLO MA, CURI R, PIT PITHON-CURI, HATANAKA E. Moderate exercise improves leucocyte function and decreases inflammation in diabetes. **Clin Exp Immunol**. Nov;162(2):237-43, 2010.
- BEN A, J., NEUMANN, C. R., MENGUE, S.S. Teste de Morisky-Green e Brief Medication Questionnaire para avaliar adesão a medicamentos. **Rev. Saúde Pública** vol.46 no.2 São Paulo abr. 2012.
- BEVILAQUA, M.P., NELSON, R.M., MANNORI G, CECCONI O. Endothelial leukocyte adhesion molecules in human disease. **Annu Ver Med**; 45:361-78, 1994.
- BOLES, A., KANDIMALLA, R., REDDY, P.H. Dynamics of diabetes and obesity: Epidemiological perspective. **Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis**. May;1863(5):1026-1036, 2017.
- BORNER, C. The Bcl-2 protein family: sensors and checkpoints for life-or-death decisions. **Mol Immunol**. 2003 Jan;39(11):615-47, 2003.
- BORREGAARD N, KJELDSEN, L., SENGELØV, H.. Mobilization of granules in neutrophils from patients with myeloproliferative disorders. **Eur J Haematol**. Apr;50(4):189-99, 1993.
- BORREGAARD, N.; COWLAND, J. B. Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. **Blood Journal**, v. 89, n. 10, p. 3.503-3.521, 15 maio 1997.
- CALDER P, C. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes. **Nutri**. Mar;2(3):355-74, 2010.
- CALDER, P.C. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**. Nov-Dec;77(5-6):327-35, 2007.
- CALDER, P.C. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**. Sep;75(3):197-202, 2006.
- Calder, P.C. The relationship between the fatty acid composition of immune cells and their function. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**. Sep-Nov;79(3-5):101-8, 2008.
- CALDER, P.C., YAQOOB, P., THIES, F., WALLACE, F.A., MILES, E.A. Fatty acids and lymphocyte functions. **Br J Nutr**. Jan;87 Suppl 1:S31-48, 2002.

CASPARD, H., JABBOUR, S., HAMMAR N., FENICI, P., SHEEHAN, J.J., KOSIBOROD, M. Recent trends in the prevalence of type 2 diabetes and the association with abdominal obesity lead to growing health disparities in the USA: An analysis of the NHANES surveys from 1999 to 2014. **Diabetes Obes Metab.** Mar;20(3):667-671, 2018.

CASSATELLA MA. Neutrophil-derived proteins: selling cytokines by the pound. **Adv Immunol** 73:369–509,1999.

CATALÁN, V., GÓMEZ-AMBROSI, J., RAMIREZ, B., ROTELLAR, F., PASTOR, C., SILVA, C., RODRÍGUEZ, A., GIL, M.J., CIENFUEGOS, J.A., FRÜHBECK, G. Proinflammatory cytokines in obesity: impact of type 2 diabetes mellitus and gastric bypass. **Obes Surg.** Nov;17(11):1464-74, 2007.

CHAMOCK, S. J., EL BENNA, J., SMITH, R. M. AND BABIOR, B. M. **J. Biol. Chem.** 269, 24519–24522, 1994.

CHIANG, J.L., KIRKMAN, M.S., LAFFEL, L.M., PETERS, A.L. Type 1 Diabetes Sourcebook Authors. Type 1 diabetes through the life span: a position statement of the American Diabetes Association. **Diabetes Care.**37(7):2034-54, 2014.

CLARK, R.A., ROBERT A. CLARK, BRYAN D. VOLPP, KEVIN G. LEIDAL, AND WILLIAM M. NAUSEEF. The human neutrophil respiratory burst oxidase. **J. Infect. Dis.** **161**:1140–1147, 1990.

COHEN, C.J., BACON, R., CLARKE, M., JOINER K, MELLMAN, I. Dictyostelium discoideum mutants with conditional defects in phagocytosis. **J Cell Biol.** Aug;126(4):955-66, 1994.

COLDITZ, G.A., WILLETT, W, C., ROTNITZKY, A., MANSON, J.E. Weight gain as a risk factor for clinical diabetes mellitus in women. **Ann Intern Med.** Apr 1;122(7):481-6, 1995.

CORBI, A.L., KISHIMOTO, T.K., MILLER, L.J., SPRINGER, T.A. The human leukocyte adhesion glycoprotein Mac-1 (complement receptor type 3, CD11b) alpha subunit: cloning, primary structure and relation to the integrins, von Willebrand factor and factor B. **J Biol Chem;** 263:12403-21, 1988.

CROOK, M.A., TUTT, P., PICKUP, J.C., Elevated serum sialic acid concentration in NIDDM and its relationship to blood pressure and retinopathy. **Diabetes Care.** Jan;16(1):57-60, 1993.

CURY-BOAVENTURA, M. F., C. POMPEIA AND R. CURI. Comparative toxicity of oleic acid and linoleic acid on jurkat cells. **CLIN NUTR** 23(4): 721-732, 2004.

CURY-BOAVENTURA, M. F., R. GORJAO, T. M. DE LIMA, P. NEWSHOLME, CURI, R. Comparative toxicity of oleic and linoleic acid on human lymphocytes. **Life Sci** 78(13): 448-1456, 2006.

CURY-BOAVENTURA, M.F., GORJÃO, R., DE LIMA, T.M, FIAMONCINI, J., TORRES, R.P., MANCINI-FILHO, J., SORIANO, F.G., CURI, R. Effect of olive oil-

based emulsion on human lymphocyte and neutrophil death. **JPEN J Parenter Enteral Nutr.** Jan-Feb;32(1):81-7, 2008.

DE A PAES, A.M., VERÍSSIMO-FILHO, S., GUIMARÃES, L.L., SILVA, A.C., TAKIUTI, J.T., SANTOS, C.X., JANISZEWSKI, M., LAURINDO, F.R., LOPES L, R. Protein disulfide isomerase redox-dependent association with p47(phox): evidence for an organizer role in leukocyte NADPH oxidase activation. **J Leukoc Biol.** Oct;90(4):799-810, 2011.

DEFRONZO RA Diabetic nephropathy: etiologic and therapeutic considerations - Diabetes Reviews - **Uthscsa**, 1995.

DEFRONZO RA. Banting lecture. From the triumvirate to the ominous octet: a new paradigm for the treatment of type 2 diabetes mellitus. **Diabetes.** 58(4):773-95, 2009.

DEFRONZO RA. Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Med Clin North Am.* 88(4):787-835,2004.

DEFRONZO, R.A., FERRANNINI, E, SIMONSON, D.C. Fasting hyperglycemia in non-insulin-dependent diabetes mellitus: contributions of excessive hepatic glucose production and impaired tissue glucose uptake. **Metabolism.** Apr;38(4):387-95, 1989.

DELGADO-LISTA, P. PEREZ-MARTINEZ, J. LOPEZ-MIRANDA, F. PEREZ-JIMENEZ, Long chain omega-3 fatty acids and cardiovascular disease: a systematic review. **British J of Nutrition**, vol. 107, supplement 2, pp. 201–213, 2012.

DELVES, P. J; ROITT, D. The immune system. First of two parts. **N Engl J Med**, v. 343, p. 37-50, 2000.

DIABETES CONTROL AND COMPLICATIONS TRIAL (DCCT): results of feasibility study. The DCCT Research Group. **Diabetes Care.** Jan-Feb;10(1):1-19, 1987.

DIAMOND MS, STAUNTON DE, DE FOUGEROLLES AR, STACKER SA, GARCIA-AGUILAR J, HIBBS ML, SPRINGER TA. ICAM-1 (CD54): a counter-receptor for Mac-1 (CD11b/CD18). *J Cell Biol.* Dec;111(6 Pt 2):3129-39. 1990.

DICKSON, L.M., RHODES, C.J. Pancreatic beta-cell growth and survival in the onset of type 2 diabetes: a role for protein kinase B in the Akt? **Am J Physiol Endocrinol Metab.** Aug;287(2):E192-8, 2004.

DINAUER M, NEWBURGER P, BORREGAARD N. The Phagocyte System and Disorders of granulopoiesis and Granulocyte Function. In: Nathan DG, Orkin SH, eds. Nathan and Oski's Hematology of Infancy and Childhood: **Elsevier/Saunders.** 2014.

DIRETRIZES DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES 2017-2018 (SBD). **Clanad.** 2017-2018.

DONATH MY, HALBAN PA. Decreased beta-cell mass in diabetes, significance, mechanisms and therapeutic implications. **Diabetol.** 47:581-589, 2004.

- DUSI, S., DONINI M., ROSSI F.. Mechanisms of NADPH oxidase activation in human neutrophils: p67phox is required for the translocation of rac 1 but not of rac 2 from cytosol to the membranes. **Biochem J** 308 (Pt 3): 991-994, 1996.
- DYERBERG, J, BANG, HO. Haemostatic function and platelet polyunsaturated fatty acids in Eskimos. **Lancet**. Sep 1;2(8140):433-5, 1979.
- El Benna J, Faust LP, Babior BM. The phosphorylation of the respiratory burst oxidase component p47phox during neutrophil activation. Phosphorylation of sites recognized by protein kinase C and by proline-directed kinases. **J Biol Chem**. 269:23431-6,1994.
- EL-BENNA, J., M. HURTADO-NEDELEC, V. MARZAIOLI, J. C. MARIE, M. A. GOUGEROTPOCIDALO., P. M. DANg. Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. **Immunol**. Vol. 273: 180–193, 2016.
- ENDRES, R. GHORBANI, V., KELLEY, K., GEORGILIS, G., LONNEMANN, J.M.W., VAN DER MEER, J.G., CANNON, T.S., ROGERS, M.S., KLEMPNER, P.C., WEBER, E.J., SCHAEFFER, S.M., WOLFF, C.A. DINARELLO. The effect of dietary supplementation with n-3 polyunsaturated fatty acids on the synthesis of interleukin-1 and tumor necrosis factor by mononuclear cells. **N. Engl. J. Med**. 320, pp. 265-271, 1989.
- FAURSCHOU, M, BORREGAARD, N. Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. **Microbes Infect.**, v. 5, n. 14, p. 1317-1327, 2003.
- FAUST, L.P.; EL BENNA, J.; BABIOR, B.M.; CHANOCK, S.J.; The phosphorylation targets of p47phox, a subunit of the respiratory burst oxidase. Functions of the individual target serines as evaluated by site-directed mutagenesis. **J Clin Invest.**, 96(3):1499-505, 1995.
- FEARON DT. Identification of the membrane glycoprotein that is the C3b receptor on the human erythrocyte, polymorphonuclear leukocyte, B lymphocyte and monocyte. **J Exp Med**. 152:20-32. 1980.
- FORD, E.S. Leukocyte count, erythrocyte sedimentation rate, and diabetes incidence in a national sample of US adults. **Am J Epidemiol**. Jan 1;155(1):57-64, 2002.
- FUTOSI, K., FODOR, S., MÓCSAI, A. Reprint of Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. **Int Immunopharmacol**. Dec;17(4):1185-97, 2013.
- GEERLINGS, S.E, HOEPELMAN AI. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). **FEMS Immunol Med Microbiol**. Dec;26(3-4):259-65, 1999.
- GELEIJNSE, J.M., KOK, F.J., GROBBEE, D.E. Blood pressure response to changes in sodium and potassium intake: a metaregression analysis of randomised trials. **J Hum Hypertens**. Jul;17(7):471-80, 2003.
- GELONEZE B1, VASQUES AC, STABE CF, PAREJA JC, ROSADO LE, QUEIROZ EC, TAMBASCIA MA; BRAMS Investigators. HOMA1-IR and HOMA2-IR indexes in

identifying insulin resistance and metabolic syndrome: Brazilian Metabolic Syndrome Study (BRAMS). **Arq Bras Endocrinol Metabol.** Mar;53(2):281-7, 2009.

GELONEZE, B., REPETTO, E.M., GELONEZE, S.R., TAMBASCIA, M.A., ERMETICE, M.N. The threshold value for insulin resistance (HOMA-IR) in an admixed population IR in the Brazilian Metabolic Syndrome Study. **Diabetes Res Clin Pract.** May;72(2):219-20, 2006.

GORJÃO, R., VERLENGIA, R., LIMA, .TM., SORIANO, .FG., BOAVENTURA, M.F, KANUNFRE, C.C., PERES, CM., SAMPAIO, S.C., OTTON, R., FOLADOR, A., MARTINS, E.F., CURI, T.C., PORTIOLLI, E.P., NEWSHOLME, P., CURI, R. Effect of docosahexaenoic acid-rich fish oil supplementation on human leukocyte function. **Clin Nutr.** Dec;25(6):923-38, 2006.

GRIVICICH, I., RENER, A., ROCHA, A. B. Morte celular por apoptose. **Rev Bras de Cancer;** 53(3): 335-343,2007.

GROEMPING Y, RITTINGER K. Activation and assembly of the NADPH oxidase: a structural perspective. **Biochem J;** 386:401-16, 2005.

GROOP, L.C., BONADONNA, R.C., DELPRATO, S., RATHEISER, K., ZYCK, K., FERRANNINI, E., DEFRONZO, R.A. Glucose and free fatty acid metabolism in non-insulin-dependent diabetes mellitus. Evidence for multiple sites of insulin resistance. **J. Clin. Invest.** Jul;84(1):205-13, 1989.

HAGER, M., COWLAND, J.B, BORREGAARD, N. Neutrophil granules in health and disease. **J.Intern. Med.** 268, 25–34,2010.

HAGER, M., COWLAND, J.B, BORREGAARD, N. Neutrophil granules in health and disease. **J.Intern. Med.** 268, 25–34,2010.

HALVORSEN, D.S., HANSEN, J.B., GRIMSGAARD, S., BONAA, K.H., KIERULF, P., NORDOY A. The effect of highly purified eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on monocyte phagocytosis in man. **Lipids.** Sep;32(9):935-42, 1997.

HAND, W.L., HAND, D.L., VASQUEZ, Y. Increased polymorphonuclear leukocyte respiratory burst function in type 2 diabetes. **Diabetes Res Clin Pract.** Apr;76(1):44-50, 2007.

HARLAN JM, KILLEN PD, SENEAL FM, SCHWARTZ BR, YEE EK, TAYLOR RF, BEATTY PG, PRICE TH, OCHS HD. The role of neutrophil membrane glycoprotein GP-150 in neutrophil adherence to endothelium in vitro. **Blood.** Jul;66(1):167-78, 1985.

HATANAKA, E. CURI, R. Ácidos graxos e cicatrização: uma revisão. **Resv Bras de Farmocologia.** v.88, n.2, p.53-58,2007.

HATANAKA, E; MONTEAGUDO, P.T; MARROCOS, M.S.M; CAMPA, A. Neutrophils and monocytes as potentially important sources of proinflammatory cytokines in diabetes. **Clinical and Experimental Immunology,** v. 146(3), p. 443–447, 2006.

HEYWORTH PG, BOHL BP, BOKOCH GM, CURNUTTE JT. Rac translocates independently of the neutrophil NADPH oxidase components p47phox and p67phox. Evidence for its interaction with flavocytochrome b558. **J Biol Chem.** Dec 9;269(49):30749-52, 1994

HIRAI A, TERANO T, HAMAZAKI T, SAJIKI J, KONDO S, OZAWA A, FUJITA T, MIYAMOTO T, TAMURA Y, KUMAGAI A. The effects of the oral administration of fish oil concentrate on the release and the metabolism of arachidonic acid and eicosapentaenoic acid by human platelets. **Thromb Res.** 28(3):285–298., 1982.

IDF - INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. IDF Atlas. 7th ed. Brussels, 2015.

Imamura F., Renata Micha, Shahab Khatibzadeh, Saman Fahimi, Peilin Shi, John Powles, Dariush Mozaffarian, Dietary quality among men and women in 187 countries in 1990 and 2010: a systematic assessment. **Lancet Glob.**, e 132–e142 .2015.

INSEL, R.A., DUNNE, J.L., ATKINSON, M.A., CHIANG, J.L., DABELEA, D., GOTTLIEB, P.A., GREENBAUM, C.J., HEROLD, K.C., KRISCHER, J.P., LERNMARK, Å., RATNER, RE., REWERS, M.J., SCHATZ, D.A., SKYLER, J.S., SOSENKO, J.M., ZIEGLER, A.G. Staging presymptomatic type 1 diabetes: a scientific statement of JDRF, the Endocrine Society, and the American Diabetes Association. **Diabetes Care.** 38(10):1964-74, 2015.

International Diabetes Federation (IDF) IDF Diabetes Atlas 8th Edition Global fact sheet (pdf), 2017. Disponível em: <https://www.idf.org/aboutdiabetes/what-is-diabetes/facts-figures.html>. Acesso em :25 de abril. 2019.

INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION. (IDF) Atlas. 7th ed. Brussels, Belgium, 2015. Disponível em : <https://www.idf.org/e-library/epidemiology-research/diabetes-atlas/13-diabetes-atlas-seventh-edition.html>. Acesso em: 20 de abril. 2019.

IWASAKI Y, KAMBAYASHI M, ASAI M, YOSHIDA M, NIGAWARA T, HASHIMOTO K. High glucose alone, as well as in combination with proinflammatory cytokines, stimulates nuclear factor kappa-B-mediated transcription in hepatocytes in vitro. **J Diabetes Complications.** Jan-Feb;21(1):56-62, 2007.

KAHN, S, E. The importance of the beta-cell in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **Apr 17;108 Suppl 6a:2S-8S. Am J Med.** 2000.

Karlsson J Exercise, muscle metabolism and the antioxidant defense. **World Rev Nutr Diet** 82:81–100(1997)

KASHYAP S, BELFORT, R., GASTALDELLI, A., PRATIPANAWATR, T., BERRIA, R., PRATIPANAWATR, W., BAJA, J., M,MANDARINO L, DEFRONZO R, CUSI K. A sustained increase in plasma free fatty acids impairs insulin secretion in nondiabetic subjects genetically predisposed to develop type 2 diabetes. **Diabetes.** Oct;52(10):2461-74, 2003.

KASUGA K, YANG R, PORTER TF, AGRAWAL N, PETASIS NA, IRIMIA D, TONER M, SERHAN CN. Rapid appearance of resolvins precursors in inflammatory exudates: novel mechanisms in resolution. **J Immunol**. Dec 15;181(12):8677-87, 2008.

KEW, S., MESA, M.D., TRICON, S., BUCKLEY, R., MINIHAINE, A.M., YAQOUB, P. Effects of oils rich in eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on immune cell composition and function in healthy humans. **Am. J. Clin. Nutr.** Apr;79(4):674-81, 2004.

KHONDKARYAN L, MARGARYAN S., POGHOSYAN D., MANUKYAN G. IMPAIRED. Inflammatory Response to LPS in Type 2 Diabetes Mellitus. **Int J. Inflamm.** Jan 14; 2018:2157434, 2018

Kielian, T., E. D. Bearden, A. C. Baldwin, and N. Esen.. IL-1 and TNF- α play a pivotal role in the host immune response in a mouse model of Staphylococcus aureus-induced experimental brain abscess. **J. Neuropathol. Exp. Neurol.** 63: 381–396. (2004)

KLEBANOFF SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. **J Leukoc Biol.** May;77(5):598-625, 2005.

KOBAYASHI, S. D.; VOYICH, J. M.; DELEO, F. R. Regulation of the neutrophil-mediated inflammatory response to infection. **Microbes Infect**, v. 5, n. 14, p. 1337-1344, 2003.

KOLACZKOWSKA E, KUBES P Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nat Rev Immunol** 13:159–175, 2013.

KORSMEYER, S.J. Regulators of cell death. **Trends Genet.** Mar;11(3):101-5, 1995.

KOYA D, KING GL. Protein Kinase C activation and the development of diabetic complications. **Diabetes.** V.47,p.859-66, 1988.

KROMANN N, GREEN A. Epidemiological studies in the Upernavik district, Greenland. Incidence of some chronic diseases 1950-1974. **Acta Med Scand.** 208(5):401-6, 1980.

KUWABARA WM, CURI R, ALBA-LOUREIRO TC. Autophagy Is Impaired in Neutrophils from Streptozotocin-Induced Diabetic Rats. **Front Immunol.** Jan 20;8:24, 2017.

KUWABARA, W.M.T., YOKOTA, C.N.F., CURI, R., ALBA-LOUREIRO, T.C. Obesity and Type 2 Diabetes mellitus induce lipopolysaccharide tolerance in rat neutrophils. **Sci Rep.** Dec 3;8(1):17534, 2018.

LAGASSE, E., WEISSMAN, I. L Flow cytometric identification of murine neutrophils and monocytes. **J of Immunol Methods** , v. 197, n. 1-2, p 139-150, 1996.

LAGRANHA, C.J., LIMA, T.M., SENNA., S.M., CURI, R., PITNHON-CURI, T.C., Função e apoptose de neutrófilos: Modulação pela maturação sexual, exercício e suplementação com glutamina. **R Bras Cie Mov.** 13(1):95-108, 2005.

LEE, H.N., SURH, Y.J. Resolvin D1-mediated NOX2 inactivation rescues macrophages undertaking efferocytosis from oxidative stress-induced apoptosis. **Biochem Pharmacol.** 2013 Sep 15;86(6):759-69, 2013.

LEVADA-PIRES, A.C., CURY-BOAVENTURA, M.F., GORJÃO, R., HIRABARA, S.M., PUGGINA, E.F., PERES, C.M., LAMBERTUCCI, R.H., CURI, R., PITHON-CURI, T.C. Neutrophil death induced by a triathlon competition in elite athletes. **Med Sci Sports Exerc.** 2008 Aug;40(8):1447-54, 2008.

LIEN, J.C., HUANG, C. C., LU, T.J., TSENG, C. H., SUNG, P.J., LEE, H., BAO, B.Y., KUO Y,H., LU, T.L. Naphthoquinone derivative PPE8 induces endoplasmic reticulum stress in p53 null H1299 cells. *Oxid Med Cell Longe.* v2015:453679, 2015.

LIMA TM, KANUNFRE CC, POMPÉIA C, VERLENGIA R, CURI R. Ranking the toxicity of fatty acids on Jurkat and Raji cells by flow cytometric analysis. **Toxicol In Vitro.** Dec;16(6):741-7, 2002.

LIMA, R.R., COSTA, A.M. R., DE SOUZA, R.D., GOMES-LEAL, W. Inflamação em doenças neurovegetativas. **Rev.Paraense de Medicina,** V.21(2), 2007.

LIPSCHITZ, D.A. Screening for nutritional status in the elderly. **Prim Care.** Mar;21(1):55-67,1994.

LOHMAN, T. G., ROCHE, A. F, MARTORELL, R. Anthropometric standardization reference manual. Champaign, IL, Human Kinetics. **Books.** 1988.

MACFARLANE M. Cell death pathways--potential therapeutic targets. *Xenobiotica.* Aug;39(8):616-24, 2009.

MADANI, S., HICHAMI, A., LEGRAND, A., BELLEVILLE, J., KHAN, N.A. Implication of acyl chain of diacylglycerols in activation of different isoforms of protein kinase C. **FASEB J.** Dec;15(14):2595-601, 2001.

MAIANSKI, N.A., MAIANSKI, A.N., KUIJPERS, T.W., ROOS, D. Apoptosis of neutrophils. **Acta Haematol.** 111: 56-66, 2004.

MAIANSKI, N.A., ROOS, D., KUIJPERS, T.W. Tumor necrosis factor alpha induces a caspase-independent death pathway in human neutrophils. **Blood.** 101: 1987-1995 ,2003.

MANTOVANI A, CASSATELLA MA, COSTANTINI C, JAILLON S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. **Nat Rev Immunol.** 11:519–531, 2011.

MARTINS C, SANTOS R, GAYA A, TWISK J, RIBEIRO J, MOTA J
Cardiorespiratory fitness predicts later body mass index, but not other cardiovascular risk factors from childhood to adolescence. **Am J Human Biol Off J Human Biol Counc** 21: 121–123, 2009.

MASTEJ, K., ADAMIEC, R. Neutrophil surface expression of CD11b and CD62L in diabetic microangiopathy. **Acta Diabetol.** Sep;45(3):183-90, 2008.

- MATTHEWS, N., NEALE, M.L., JACKSON, S.K., STARK, J.M. Tumour cell killing by tumour necrosis factor: inhibition by anaerobic conditions, free-radical scavengers and inhibitors of arachidonate metabolism. **Immunology**. Sep;62(1):153-5, 1987.
- MAYADAS, T. N.; CULLERE, X.; LOWELL, C. A. The multifaceted functions of neutrophils. Annu Rev Pathol. 9:181-218, 2013. MAYSER, P., GRIMM, H., & GRIMMINGER, F. N-3 fatty acids in psoriasis. **Br J Nutr** **87 (Suppl 1)**, S77–S82, 2002.
- MAYER B, OBERBAUER R. Mitochondrial regulation of apoptosis. **News Physiol Sci**. Jun;18:89-94, 2003.
- MEDOF ME, Iida K, Mold C, Nussenzweig V. Unique role of the complement receptor CR1 in the degradation of C3b associated with immune complexes. **J. Exp Med**.156:1739-54, 1982
- MEYDANI SN, LICHTENSTEIN AH, CORNWALL S, MEYDANI M, GOLDIN BR, RASMUSSEN H, DINARELLO CA, SCHAEFER EJ. Immunologic effects of national cholesterol education panel step-2 diets with and without fish-derived N-3 fatty acid enrichment. *J Clin Invest*. Jul;92(1):105-13, 1993.
- MIRANDA, D.T., BATISTA, V.G., GRANDO, F.C., PAULA, F.M., FELÍCIO, C.A., RUBBO ,G.F., FERNANDES, L.C., CURI, R. Nishiyama A. Soy lecithin supplementation alters macrophage phagocytosis and lymphocyte response to concanavalin A: a study in alloxan-induced diabetic rats. **Cell Biochem Funct**. Dec;26(8):859-65, 2008.
- MOKDAD AH1, FORD ES, BOWMAN BA, DIETZ WH, VINICOR F, BALES VS, MARKS JS. Prevalence of obesity, diabetes, and obesity-related health risk factors, 2001. **JAMA**. Jan 1;289(1):76-9, 2003.
- MOLDOVEANU, A. I., R. J. SHEPHARD., P. N. SHEK. The cytokine response to physical activity and training. *Sports Med* **31(2)**: 115-144,2001
- MOLLINEDO F, NAKAJIMA M, LLORENS A, BARBOSA E, CALLEJO S, GAJATE C, FABRA A. Major co-localization of the extracellular-matrix degradative enzymes heparanase and gelatinase in tertiary granules of human neutrophils. **Biochem J**. Nov 1;327 (Pt 3):917-23, 1997.
- MORISKY, D.E., GREEN, L.W., LEVINE, D.M. Concurrent and predictive validity of a self-reported measure of medication ADHERENCE. **Med Care**. 1986 Jan;24(1):67-74, 1986.
- MORO K, NAGAHASHI M, RAMANATHAN R, TAKABE K, WAKAI T. Resolvins and omega three polyunsaturated fatty acids: Clinical implications in inflammatory diseases and cancer. **World J Clin Cases**. 2016;4(7):155–164, 2016.
- NETTLETON, J.A. Omega-3 Fatty Acids and Health. New York: Springer (formerly Chapman & Hall); 1995.
- NEWMAYER, D.D., FERGUSON-MILLER S. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. **Cell**. Feb 21;112(4):481-90, 2003.

PAROLIN, M.B., REASON, I.M. Apoptose como mecanismo de lesão nas doenças hepatobeliares. **Arq. Gastroenterol.** vol.38 no.2 São Paulo Apr./June 2001.

PASCHOAL, V.A., VINOLO, M.A., CRISMA, A.R., MAGDALON, J., CURI, R. Eicosapentaenoic (EPA) and docosahexaenoic (DHA) acid differentially modulate rat neutrophil function in vitro. **Lipids.** Feb;48(2):93-103, 2013.

PATARROYO M, MAKGOBA MW. Leukocyte adhesion to cells in immune and inflammatory responses. **Lancet.** Nov 11;2(8672):1139-42,1989

PICKUP, J.C., MATTOCK, M.B., CHUSNEY, G.D., BUR, T D. NIDDM as a disease of the innate immune system: association of acute-phase reactants and interleukin-6 with metabolic syndrome X. **Diabetologia.** Nov;40(11):1286-92, 1997.

PICKUP, J.C., CHUSNEY, G.D., THOMAS, S.M., BURT, D. Plasma interleukin 6, tumour necrosis factor alpha and blood cytokine production in type 2 diabetes. **Life Sci.** Jun 8;67(3):291-300, 2000.

POMPÉIA C., LOPES, L.R., MIYASAKA, C.K., PROCÓPIO, J., SANNOMIYA, P., CURI, R. Effect of fatty acids on leukocyte function. **Braz J Med Biol Res.** 2000 Nov;33(11):1255-68, 2000.

PYNE DB. Regulation of neutrophil function during exercise. **Sports Med.** Apr;17(4):245-58, 1994.

QUINN MT, GAUSS KA. Structure and regulation of the neutrophil respiratory burst oxidase: comparison with nonphagocyte oxidases. **J Leukoc Biol;**76:760-81, 2004.

REES D, MILES EA, BANERJEE T, WELLS SJ, ROYNETTE CE, WAHLE KW, CALDER PC. Dose-related effects of eicosapentaenoic acid on innate immune function in healthy humans: a comparison of young and older men. **Am J Clin Nutr.**83:331–342, 2006.

RIGBY, K.M., DELEO, F.R Neutrophils in innate host defense against *Staphylococcus aureus* infections. **Semin Immunopathol.** 34: 237–259, 2012.

RONDEAU, I., PICARD, S., BAH, T.M., ROY, L., GODBOUT, R., ROUSSEAU, G. Effects of different dietary ω -6/3 polyunsaturated fatty acids ratios on infarct size and the limbic system after myocardial infarction. **Can J Physiol Pharmacol.** Mar;89(3):169-76, 2001.

RYTER, S.W., KIM, H.P., HOETZEL, A., PARK, J.W., NAKAHIRA, K., WANG, X., CHOI, A.M. Mechanisms of cell death in oxidative stress. **Antioxid Redox Signal.** 9: 49-89, 2007.

SAMPSON, M.J., DAVIES, I.R., BROWN, J.C., IVORY, K., HUGHES, D.A. Monocyte and neutrophil adhesion molecule expression during acute hyperglycemia and after antioxidant treatment in type 2 diabetes and control patients. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 2002 Jul 1;22(7):1187-93, 2002.

SCAPINI P, LAPINET-VERA JA, GASPERINI S, CALZETTI F, BAZZONI F, CASSATELLA MA. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev* 177:195–203, 2000.

SELVATICI R, FALZARANO S, MOLLICA A, SPISANI S. Signal transduction pathways triggered by selective formylpeptide analogues in human neutrophils. *Eur J Pharmacol*. Mar 18;534(1-3):1-11, 2006.

SERHAN, C.N., CHIANG, N., DALLI, J. New pro-resolving n-3 mediators bridge resolution of infectious inflammation to tissue regeneration. *Mol Aspects Med*. 64:1-17, 2017.

SERHAN, C.N., CHIANG, N., DALLI, LEVY, B.D. Lipid mediators in the resolution of inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. Oct 30;7(2):a01631, 2014.

SHEN J., RASTOGI R., GUAN L., LI F., DU H., GENG X., DING Y. Omega-3 fatty acid supplement reduces activation of NADPH oxidase in intracranial atherosclerosis stenosis. *Neurol Res*. Jun;40(6):499-507, 2018.

SHEPPARD FR, KELHER MR, MOORE EE, MCLAUGHLIN NJ, BANERJEE A, SILLIMAN CC. Structural organization of the neutrophil NADPH oxidase: phosphorylation and translocation during priming and activation. *J Leukoc Biol*. Nov;78(5):1025-42, 2005.

SHIMIZU, S., EGUCHI, Y., KAMIKE, W., FUNAHASHI, Y., MIGNON, A., LACRONIQUE, V., MATSUDA, H., TSUJIMOTO, Y. Bcl-2 prevents apoptotic mitochondrial dysfunction by regulating proton flux. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95: 1455-1459, 1998.

SILVERTHORN, D. U. Fisiologia humana: uma abordagem integrada. v. 7. ed. Porto Alegre: *Artmed*, 2011.

SIMOPOULOS A.P. Omega–3 fatty acids in wild plants, seeds and nuts. *Asian Pacific J Clin Nutr*;(suppl 6):S163–S173, 2002.

SIMOPOULOS, A.P. Essential fatty acids in health and chronic disease. *Am J Clin Nutr*. Sep;70(3 Suppl):560S-569S, 1999.

SMITH, J.A. Neutrophils, host defense, and inflammation: a double-edged sword. *J. Leukoc. Biol*. 56:672–686.1994.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE ENDOCRINOLOGIA E METABOLOGIA, 2017. Disponível em: <https://www.endocrino.org.br/10-coisas-que-voce-precisa-saber-sobre-retinopatia/> Acesso em: 20 de mar. 2019.

SOLOVEY AA, HARKNESS J, HEBBEL RP. Modulation of endothelial cell activation in sickle cell disease: a pilot study. *Blood*. 97(7). 1937-41, 2001

STUART, L. M.; EZEKOWITZ, R. A. B. Phagocytosis: Elegant Complexity. *Immunity*, v. 22, n. 5, p. 539–550, 2005.

TAKEUCHI, O., AKIRA S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell** 140:805–820, 2010.

TANG XN, CAIRNS B, KIM JY, YENARI MA. NADPH oxidase in stroke and cerebrovascular disease. **Neurol Res.** May;34(4):338-45, 2012.

TECCHIO, C., A. MICHELETTI AND M. A. CASSATELLA. Neutrophil-derived cytokines: facts beyond expression. **FRONT IMMUNOL.**5: 508, 2014.

TERADA S, TAKIZAWA M, YAMAMOTO S, EZAKI O, ITAKURA H, AKAGAWA KS. Suppressive mechanisms of EPA on human T cell proliferation. **Microbiol Immunol.** 45(6):473-81, 2001.

TRAYHURN, P., WOOD, I.S. Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity. **Biochem Soc Trans.** Nov;33(Pt 5):1078-81, 2005.

TULL, S.P., YATES, C.M., MASKREY, B.H., O'DONNELL, V.B., MADDEN, J., GRIMBLE, R.F., CALDER, P.C., NASH, G.B., RAINGER, G.E. Omega-3 Fatty acids and inflammation: novel interactions reveal a new step in neutrophil recruitment. **PLoS Biol.** Aug;7(8):e1000177, 2009.

VERBRUGGE, I. AND R. W. JOHNSTONE. Regulating the trail of destruction: how a20 protects glioblastomas from trail-mediated death. **Cancer disco.**v 2(2): 112-114, 2012.

VIGNAIS PV. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism. **Cell Mol Life Sci**;59:1428-59, 2002.

VINOLO MA, HATANAKA E, LAMBERTUCCI RH, NEWSHOLME P, CURI R. Effects of short chain fatty acids on effector mechanisms of neutrophils. **Cell Biochem Funct.** Jan;27(1):48-55, 2009.

VIRELLA, G., KILPATRICK, J.M.K., RUGELES, M.T., HYMAN, B, RUSSELL, G. Depression of humoral responses and phagocytic functions in viva and in vitro by fish oil and eicosapentanoic acid. **Clin Immu and Immunopathology.** 52, 257-270, 1989.

WALSH, N.P., GLEESON, M., PYNE, D.B., NIEMAN, D.C., DHABHAR, F.S., SHEPHARD, R.J., OLIVER, S.J., BERMON, S, KAJENIENE, A. Position statement. Part two: Maintaining immune health. **Exerc Immunol Rev.**17:64-103, 2011.

WITKO-SARSAT V.,RIEU P.,DESCAMPS-LATSCHA B.,LESAVRE P. HALBWACHS-MECARELLI L. Neutrophils: molecules, functions and pathophysiological aspects. **Lab Invest.** May;80(5):617-53, 2000.

WOODMAN, R.J., MORI, T.A., BURKE, V., PUDDEY, I.B., BARDEN, A., WATTS, G.F., BEILIN, L.J. Effects of purified eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on platelet, fibrinolytic and vascular function in hypertensive type 2 diabetic patients. **Atherosclerosis.** Jan;166(1):85-93, 2003.

WYLLIE, A.H., KERR, J.F., CURRIE, A.R. Cell death: the significance of apoptosis. **Int Ver Cytol.** 68: 251-306, 1980.

YAQOOB, P. Monounsaturated fats and immune function. **Braz J Med Biol Res.** Apr;31(4):453-65, 1998.

YERNENI, K, K., BAI, W., KHAN, B.V., MEDFORD, R.M., NATARAJAN, R., Hyperglycemia-induced activation of nuclear transcription factor kappaB in vascular smooth muscle cells. *Diabetes.* 1999 Apr;48(4):855-64.

YESSOUFOU, A., SOULAIMANN, N., MERZOUK, S.A., MOUTAIROU, K., AHISSOU, H., PROST, J., SIMONIN, A.M., MERZOUK, H., HICHAMI, A., KHAN N, A. N-3 fatty acids modulate antioxidant status in diabetic rats and their macrosomic offspring. **Int J Obes (Lond).** May;30(5):739-50, 2006.

ZHANG Y, HU G, YUAN Z, CHEN L. Glycosylated hemoglobin in relationship to cardiovascular outcomes and death in patients with type 2 diabetes: a systematic review and meta-analysis. **PLoS One.**7(8), 2012.

ZHANG, Y., SANTOS, A. A., WANG, N., WANG, W. N.G N,, ZHAO Q, JIANG Y, WEINEHALL, L., ZHAO, G. Prevalence and the Association of Body Mass Index and Other Risk Factors with Prediabetes and Type 2 Diabetes Among 50,867 Adults in China and Sweden: A Cross-Sectional Study. **Diabetes Ther.** Sep 11, 2019.

8. ANEXOS

8.1 Anexo 1



PROJETO ÔMEGA-3

PREVENÇÃO E COMBATE:



Requisitos importantes:

Pessoas com 45 anos ou mais

Sem uso de ômega-3 atualmente

Jejum de 8 h ou mais nas visitas

LOCAL:
UNIVERSIDADE
CRUZEIRO DO
SUL
RUA GALVÃO
BUENO, 868,
ICAFE,
LIBERDADE

**AVALIAÇÕES
GRATUITAS!**
Diabetes,
Hipertensão,
Gordura Corporal

**SUPLEMENTAÇÃO
COM ÔMEGA-3 OU
LECITINA DE SOJA
DURANTE 3 MESES
GRÁTIS!**

***OCORRERÃO
3 VISITAS:**
✓ 1a) 19 a 23/02
✓ 2a) 19 a 22/03
✓ 3a) 18 a 21/06
*Ajuda de custo:
R\$ 40,00 por visita

PARTICIPE!

INSCRIÇÕES:
3385-3103 – REBECA,
SANDRO ou RENATA
95965-8198 : WhatsApp

8.2 Anexo 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o(a) Sr(a) para participar da Pesquisa " Avaliação da Atividade Imunomoduladora do Fitoterápico *Ganoderma lucidum* em idosos", sob a responsabilidade da pesquisadora Patricia Nancy Iser Bem, a qual pretende avaliar a efetividade de um cogumelo em modular o perfil do sistema imune.

Sua participação é voluntária e se dará por meio de três encontros com duração aproximada de 1 hora ao longo de dois meses e que consistirá em:

- 1) Anamnese (perguntas sobre doenças, medicamentos, histórico familiar etc);
- 2) Avaliação da Composição Corporal através das técnicas de bioimpedância e análise antropométrica;
- 3) Inquérito Alimentar;
- 4) Coleta de Sangue (serão coletados 30 mL de sangue por um enfermeiro (a), com conhecimento teórico e prático das técnicas de coleta de sangue, dentro das normas de biossegurança e em ambiente apropriado);
- 5) Verificação da Pressão Arterial. Você receberá quatro cápsulas de 500 mg de *Ganoderma lucidum* ou Placebo (substância inerte ao organismo e utilizada frequentemente em farmácias de manipulação. O *Ganoderma lucidum* é um cogumelo muito utilizado na medicina chinesa, cuja venda é permitida no Brasil. Não foram descritos efeitos colaterais decorrentes da utilização deste composto até o momento. A dose que será administrada neste estudo está abaixo das doses utilizadas na literatura.

Os riscos decorrentes de sua participação na pesquisa são mínimos. Se o(s) Sr(a) aceitar participar, estará contribuindo para a ampliação do conhecimento sobre os benefícios do fitoterápico para os idosos, bem como para a melhor compreensão a respeito de seus efeitos no que diz respeito à glicemia, diurese, perfil lipídico e qualidade de vida.

Como benefícios, após a análise dos dados obtidos durante esta avaliação, serão fornecidos a cada participante seus resultados para pressão

arterial, glicemia, lipídios plasmáticos e composição corporal.

Se depois de consentir em sua participação o(s) Sr(a) desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a Vossa Senhoria. O(a) Sr(a) não terá qualquer despesa e também não receberá qualquer remuneração.

Caso seja observado qualquer efeito colateral você pode entrar em contato com os responsáveis pela pesquisa através do telefone 11 3385 31.

Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, sendo sua identidade preservada e guardada em sigilo. Para qualquer outra informação, o(a) Sr(a) pode entrar em contato com o pesquisador responsável (inserir endereço profissional do pesquisador responsável), pelo telefone (inserir telefone do pesquisador responsável) ou com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Cruzeiro do Sul, Av. Dr. Ussiel Cirilo, 225, São Miguel, São Paulo, SP, telefone (11) 2037 5708.

Se o(a) Sr(a) se sentir suficientemente esclarecido sobre essa pesquisa, objetivo, procedimentos e eventuais riscos e benefícios, convido-o(a) a assinar este Termo, elaborado em duas vias, sendo que uma ficará com o(a) Sr(a) e a outra com o pesquisador.

São Paulo, ___ de _____ de 2018.

Assinatura do participante

(Renata Gorjão)

(Responsável pela pesquisa)

8.3 Anexo 3



FICHA DE IDENTIFICAÇÃO E COLETA DE DADOS

Nome: _____

Telefone: _____ E-mail: _____

Data de nascimento: ____/____/____ Idade (anos): _____ Sexo: M FHábito de fumar: Nunca Parou: Há quanto tempo? _____ Fuma: cigarros/dia _____Pratica atividade física? Não Sim: Qual(is)? _____

Frequência (vezes por semana): _____ Duração por sessão (min): _____

Consome bebida alcoólica? Não Sim: Quantas doses por semana: _____Você considera seu peso: Normal Abaixo Acima Muito acimaTema alguma doença? Não Sim: Qual(is)? _____ *Diabetes Mellitus* Hipertensão Outro: _____Já teve infarto? Não Sim Há quanto tempo? _____Toma medicamento(s)? Não Sim: Qual(is)? _____

Em que dosagem? _____

Que horas foi sua última refeição? _____

O que você comeu/bebeu: _____

MEDIDAS E TESTES

Glicemia (mg/dL): _____ Horário: _____ Tempo de jejum: _____

Pressão arterial (mmHg): _____ Confirmação: _____

Altura (cm): _____ Peso (Kg): _____ IMC: _____

Circunfs.: Cintura (cm): _____ Quadril: _____ RCQ: _____

8.4 Anexo 4

AVALIAÇÃO DO USO DE MEDICAMENTOS QUESTIONÁRIO MORINSKY-GREEN- LEVINE

1. Você, alguma vez, esquece de tomar seu remédio?

() Sim

() Não

2. Você, às vezes, é descuidado quanto ao horário de tomar seu remédio?

() Sim

() Não

3. Quando você se sente bem, alguma vez, você deixa de tomar o remédio?

() Sim

() Não

4. Quando você se sente mal com o remédio, às vezes, deixa de tomá-lo?

() Sim

() Não

8.5 Anexo 5

AVALIAÇÃO DO USO DE MEDICAMENTOS
Teste Brief Medication Questionnaire

1) Quais medicamentos que o Sr(a) usou na última semana? Entrevistador: para cada medicamento, anote as respostas no quadro abaixo: Se o entrevistado não souber ou se recusar a responder coloque NR					
NA ÚLTIMA SEMANA					
Nome do medicamento e dosagem	Quantos dias o Sr(a) tomou esse medicamento	Quantas vezes por dia o Sr (a) tomou esse medicamento	Quantos comprimidos o Sr(a) tomou em cada vez	Quantas vezes o Sr(a) esqueceu de tomar algum comprimido	Como esse medicamento funciona para o Sr(a) 1 = funciona bem 2 = funciona regular 3 = não funciona bem
2) Alguma de seus medicamentos causam algum problema para o Sr(a)? () não () sim Se o entrevistado respondeu SIM, por favor, liste os nomes dos medicamentos e quanto eles o incomodaram Quanto esse medicamento incomodou o Sr(a)					
Medicamento	Muito	Um pouco	Muito pouco	Nunca	De que forma o Sr(a) é incomodado por ela?
3) Agora, citarei uma lista de problemas que as pessoas, às vezes, têm com seus medicamentos:					
Quanto é difícil para o Sr(a):	Muito difícil	Um pouco difícil	Não muito difícil	Comentário (qual medicamento)	
Abrir ou fechar a embalagem					
Ler o que está escrito na embalagem					
Lembrar de tomar todos medicamentos					
Conseguir o medicamento					
Tomar tantos comprimidos ao mesmo tempo					

Escore de problemas encontrados pelo BMQ		
DR – REGIME (questões 1a-1e)	1 = sim	0 = não
DR1. O R falhou em listar (espontaneamente) os medicamentos prescritos no relato inicial?	1	0
DR2. O R interrompeu a terapia devido ao atraso na dispensação da medicação ou outro motivo?	1	0
DR3. O R relatou alguma falha de dias ou de doses?	1	0
DR4. O R reduziu ou omitiu doses de algum medicamento?	1	0
DR5. O R tomou alguma dose extra ou medicação a mais do que o prescrito?	1	0
DR6. O R respondeu que “não sabia” a alguma das perguntas?	1	0
DR7. O R se recusou a responder a alguma das questões?	1	0
NOTA: ESCORE ≥ 1 INDICA POTENCIAL NÃO ADESÃO soma:		<i>Tregime</i>
CRENÇAS		
DC1. O R relatou “não funciona bem” ou “não sei” na resposta 1g?	1	0
DC2. O R nomeou as medicações que o incomodam?	1	0
NOTA: ESCORE ≥ 1 INDICA RASTREAMENTO POSITIVO PARA BARREIRAS DE CRENÇAS soma:		<i>Tcrencas</i>
RECORDAÇÃO		
DRE1. O R recebe um esquema de múltiplas doses de medicamentos (2 ou mais vezes/dia)?	1	0
DRE2. O R relata “muita dificuldade” ou “alguma dificuldade” em responder a 3c?	1	0
NOTA: ESCORE ≥ 1 INDICA ESCORE POSITIVO PARA BARREIRAS DE RECORDAÇÃO soma:		<i>Trecord</i>

R = respondente NR = não respondente

Classificação:

- Aderente: nenhuma resposta positiva
- Provável adesão: resposta positiva em um domínio
- Provável baixa adesão: resposta positiva em dois domínios

Baixa adesão: resposta positiva em três domínios

8.6 Anexo 6

Grupo Suplementado com Ômega 3		
NÃO FAZ USO DE MEDICAMENTO PARA DIABETES		
Amostra	Medicamentos DM	Outros Medicamentos
28	-	Losartana 50mg
INSULINA		
Amostra	Medicamentos DM	Outros Medicamentos
6	Insulina 42 UI	Levoid 75mg
INSULINA + HIPOGLICEMIANTE		
Amostra	Medicamentos DM	Outros Medicamentos
42	Insulina 45 UI Metformina 2550mg	Losartana 100mg
81	Insulina 10 UI Metformina 2550mg	Captopril 40mg Aspirina 100mg Omeprazol 20mg Sinvastina 40mg
440	Insulina 20 UI Metformina 1700mg Gliclazida 60mg	Nifedipino 40mg Aspirina 100mg Sinvastatina 10mg
760	Insulina 30 UI Metformina 1700mg	Enalapril 40mg
HIPOGLICEMIANTE		
Amostra	Medicamentos DM	Outros Medicamentos
3	Glifage 500mg	Losartana 50mg Diurético 25mg Aspirina 100mg Ezetimibe 10mg Puran t4 88mg
53	Glifage 1000mg	Atenolol 100mg Sinvastatina 25mg
77	Glifage 1000mg	Losartana 50mg Diurético 25mg
106	Metformina 2550mg Gliclazida 60mg	Sinvastatina 20mg
110	Metformina 1000mg	Losartana 10mg Captopril 40mg
129	Glifage 800mg	Ezetimibe 10mg Sinvastatina 10mg
400	Glifage 500 mg	Diltiazem 80mg
410	Glifage 2000mg Gliclazida 120mg	Sinvastatina 10mg

Grupo Suplementado com Lecitina de Soja

HIPOGLICEMIANTE		
Amostra	Medicamentos DM	Outros Medicamentos
13	Metformina 850 mg Gliclazida 60mg	Aspirina 100mg Omeprazol 20mg Sinvastatina 50mg
36	Glifage 1000mg	Losartana 50mg Diltiazem 90mg Sinvastatina 5mg
40	Glifage 500 mg	Diltiazem 80mg
41	Glifage 2000mg Gliclazida 120mg	Sinvastatina 10mg
91	Glifage 500mg	Losartana 100mg Diurético 25mg
134	Glifage 500mg	Atenolol 25mg Diurético 12mg
1.110	Metformina 1000mg	Losartana 10mg Captopril 40mg

INSULINA + HIPOGLICEMIANTE		
Amostra	Medicamentos DM	Outros Medicamentos
44	Insulina 20 UI Metformina 1700mg Gliclazida 60mg	Nifedipino 40mg Aspirina 100mg Sinvastatina 10mg
52	Insulina 12 UI Metformina 2550mg	Losartana 100mg Atenolol 25mg Diurético 25mg
76	Insulina 30 UI Metformina 1700mg	Enalapril 40mg
81	Insulina 10 UI Metformina 2550mg	Captopril 40mg Aspirina 100mg Omeprazol 20mg Sinvastatina 40mg