

DALVA TERESINHA DE SOUZA ZARDO MIRANDA

**SUPLEMENTAÇÃO DA DIETA DE RATOS DIABÉTICOS COM
LECITINA DE SOJA: EFEITOS SOBRE FUNÇÕES DE CÉLULAS DO
SISTEMA IMUNITÁRIO E SOBRE CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS
DE LIPÍDIOS**

CURITIBA

2005

DALVA TERESINHA DE SOUZA ZARDO MIRANDA

**SUPLEMENTAÇÃO DA DIETA DE RATOS DIABÉTICOS COM
LECITINA DE SOJA: EFEITOS SOBRE FUNÇÕES DE CÉLULAS DO
SISTEMA IMUNITÁRIO E SOBRE CONCENTRAÇÕES PLASMÁTICAS
DE LIPÍDIOS**

Dissertação apresentada ao Curso de pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, Área de concentração Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Anita Nishiyama

CURITIBA

2005

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	v
RESUMO	vi
ABSTRACT	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Digestão e absorção da fosfatidilcolina.....	3
1.2. Transporte da fosfatidilcolina plasmática através das lipoproteínas	4
1.3. Lecitina de soja e diabetes mellitus.....	5
1.4. Lipídios e sistema imunitário.....	7
2. OBJETIVOS.....	12
3. MATERIAL E MÉTODOS	13
3.1. Animais.....	13
3.2. Tratamento dos animais.....	13
3.2.1. Indução de diabetes.....	13
3.2.2. Suplementação com lecitina de soja.....	14
3.3. Sacrifício dos animais e coleta das amostras.....	14
3.4. Determinações séricas	15
3.4.1. Determinação da glicemia.....	15
3.4.2. Determinação de triacilglicerolemia.....	16
3.4.3. Determinação de colesterolemia	16
3.4.4. Determinação de colesterol HDL.....	17
3.4.5. Determinação de colesterol VLDL e LDL	17
3.4.6. Determinação de fosfolipídios no soro	17
3.5. Determinação de triacilgliceróis e colesterol nos tecidos	18
3.6. Determinação de fosfolipídios nos tecidos e células	19
3.7. Fagocitose (macrófagos)	19
3.8. Cultivo celular.....	20
3.9. Metabolismo e Proliferação de linfócitos.....	20
3.9.1. Ensaio da redução de MTT	20
3.9.2. Análise morfológica de linfócitos em cultivo	21
3.9.3. Ensaio no citômetro de fluxo.....	21
3.10. Determinação do número de leucócitos do sangue e contagem diferencial	21
3.11. Análise estatística.....	22
4. RESULTADOS.....	23
4.1. Peso dos animais	23
4.2. Determinações séricas	24
4.3. Fagocitose	25
4.4. Metabolismo e Proliferação.....	25
4.4.1. MTT	25
4.4.2. Análise morfológica de linfócitos em cultivo	27
4.4.3. Citômetro de fluxo.....	28
4.5. Conteúdo de triacilgliceróis e colesterol nos tecidos.....	29
4.6. Conteúdo de fosfolipídios no soro, tecidos, macrófagos e linfócitos	29

4.7. Peso dos tecidos	32
4.8. Número de leucócitos do sangue e contagem diferencial	36
5. DISCUSSÃO	37
6. CONCLUSÃO	48
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

LISTA DE ABREVIATURAS

C	–	grupo controle
COL	–	colesterol total
ConA	–	concanavalina A
D	–	grupo diabético
DS 1	–	grupo diabético suplementado 1
DS 2	–	grupo diabético suplementado 2
EPM	–	erro padrão da média
FL	–	fosfolipídios
FSC-H	–	<i>forward scatter</i>
GL	–	glicose
HDL	–	<i>high density lipoprotein</i>
H ₂ O ₂	–	peróxido de hidrogênio
IDL	–	<i>intermediate density lipoprotein</i>
LDL	–	<i>low density lipoprotein</i>
ML	–	microscópio de luz
MTT	–	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
NK	–	<i>natural killer</i>
PAF	–	fator de agregação plaquetária
PKC	–	proteína quinase C
PLA ₁	–	fosfolipase A ₁
PLA ₂	–	fosfolipase A ₂
TG	–	triacilgliceróis
VLDL	–	<i>very low density lipoprotein</i>
S 1	–	grupo suplementado 1
S 2	–	grupo suplementado 2
SFB	–	soro fetal bovino
SSC-H	–	<i>side scatter</i>

RESUMO

A suplementação da dieta com lecitina de soja influencia o metabolismo lipídico e tem sido utilizada por pacientes diabéticos para reduzir as concentrações de lipídios plasmáticos. A adição da fosfatidilcolina, o principal componente da lecitina, modifica as funções de linfócitos em cultura. Se a fosfatidilcolina altera as funções de linfócitos *in vitro*, alterações em células do sistema imunitário *in vivo* também poderiam ocorrer. Investigar essa questão foi o objetivo do presente trabalho. Foram avaliados os efeitos da suplementação da dieta com lecitina de soja sobre a capacidade fagocitária de macrófagos e a proliferação de linfócitos de ratos Wistar não-diabéticos e diabéticos induzidos por aloxana. A lecitina de soja foi administrada diariamente na dose de 1 ou 2g/kg de peso corporal durante 7 dias. Sangue, macrófagos peritoneais e linfócitos do linfonodo mesentérico foram coletados para determinação do conteúdo de lipídios. O ensaio de fagocitose foi realizado pela adição de zimosan corado com vermelho neutro. Linfócitos foram estimulados com concanavalina A (ConA) e o ensaio da redução de MTT (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide*) e a citometria de fluxo foram empregados para avaliar o metabolismo e a proliferação de linfócitos, respectivamente. A capacidade proliferativa dos linfócitos foi aumentada nos ratos diabéticos suplementados em relação aos diabéticos não suplementados. Na mesma condição, a capacidade fagocitária foi aumentada com uma dose menor de lecitina na dieta. Nos animais não diabéticos a suplementação com lecitina de soja aumentou a capacidade fagocitária de macrófagos e diminuiu a resposta proliferativa dos linfócitos. O metabolismo dos linfócitos também foi significativamente aumentado. É provável que esses efeitos resultem da formação de moléculas bioativas e modificações nos sinais de transdução intracelulares. Os mecanismos pelos quais a fosfatidilcolina influencia a funcionalidade de macrófagos e linfócitos foram, presumivelmente, independentes das propriedades redutoras de lipídios, já que as concentrações de triacilgliceróis e colesterol plasmáticas não foram modificadas. Em conclusão, a suplementação da dieta com lecitina a curto-prazo modifica a proliferação de linfócitos e a capacidade fagocitária de macrófagos, indicando um efeito imunomodulador da fosfatidilcolina.

ABSTRACT

Dietary soy lecithin supplementation influences lipid metabolism and it has been used by diabetic patients to decrease plasma lipid levels. The addition of phosphatidylcholine, the main component of lecithin has been reported to alter lymphocyte function. As phosphatidylcholine alters lymphocyte function *in vitro*, it should in turn affect immune cells *in vivo*. To investigate this question was the purpose of this work. The effects of dietary soy lecithin upon macrophage phagocytic capacity and lymphocyte proliferation of non-diabetic and alloxan induced-diabetic Wistar rats were evaluated. Supplementation was carried out daily with 1 or 2g/kg b.w. lecithin during 7 days. Blood was drawn from fasting rats and macrophages and mesenteric lymphocytes were collected to determine the lipid content. Neutral red stained zymosan was used to determine macrophage phagocytic capacity. Lymphocytes were stimulated by concanavalin A (ConA) and the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide dye reduction method (MTT assay) and flow cytometry as a cell counter were employed to evaluate lymphocyte metabolism and proliferative response, respectively. Lymphocyte proliferative capacity was increased in diabetic rats supplemented with lecithin when compared to non-supplemented diabetic group. In the same condition, phagocytosis by resident macrophages was increased by a lower dose of dietary lecithin. In non-diabetic rats, lecithin supplementation resulted in an increased phagocytic capacity and a decreased response of lymphocyte proliferation. Lymphocyte metabolism was also significantly increased. It is probable that these effects are consequence of bioactive molecules formation and modifications on intracellular signal transduction. The mechanisms by which phosphatidylcholine influences macrophage and lymphocyte function presumably were independent of lecithin lowering lipid properties, as the used dose did not modify plasma triacylglycerol and cholesterol levels. In conclusion, short-term lecithin supplementation modifies lymphocyte proliferation rate and macrophage phagocytic capacity suggesting an immunomodulatory effect of phosphatidylcholine.

1. INTRODUÇÃO

A lecitina de soja é um suplemento alimentar utilizado para reduzir as concentrações plasmáticas de lipídios e contribuir para o emagrecimento, o que pode estar relacionado ao seu papel capaz de alterar a absorção e o transporte de lipídios plasmáticos bem como o esvaziamento gástrico e a ingestão de alimentos (LEBLANC *et al*, 1998; MASTELLONE *et al*, 2000; POLICHETTI *et al*, 2000; MEDIC *et al*, 2003; NISHIMUKAI; HARA; AOYAMAE, 2003). A lecitina também influencia a memória (LEVIN *et al*, 1986; BUCHMAN *et al*, 2001) e é empregada nos tratamentos de doenças do fígado (BUCHMAN *et al*, 1992; NAVDER; BARAONA; LIEBER, 1997; ALEYNIK; LIEBER, 2003).

A lecitina foi primeiramente isolada da gema de ovo em 1846 por Gabley (WILLIAMS; LANSFORD, 1967), mas também pode ser obtida a partir de muitas outras fontes animais e vegetais como fígado, amendoim e, principalmente, soja (ZEIZEL; 1988; HARWOOD, 1994). Além de estar presente nesses alimentos, a lecitina é utilizada como emulsificante em produtos industrializados (RADOMSKA; DOBRUCKI, 2000; MANCONI *et al*, 2003), fazendo parte da dieta humana.

O principal constituinte da lecitina de soja é a fosfatidilcolina (HARWOOD, 1994). A molécula de fosfatidilcolina é composta por dois ácidos graxos esterificados a um glicerol-3-fosfato e uma extremidade colina (Figura 1). Os ácidos graxos são cadeias hidrocarbonadas hidrofóbicas de tamanhos variados. A lecitina de soja é rica principalmente em ácido linoleico, o qual apresenta 18 carbonos, e por sua vez, é precursor do ácido araquidônico. Já o grupo fosfato e a colina são hidrofílicos. Por isso essa molécula apresenta propriedade anfipática, comum a outras classes de fosfolipídios (fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina, fosfatidilinositol, fosfatidilglicerol), sendo capaz de formar vesículas em meio aquoso e as bicamadas lipídicas.

A fosfatidilcolina é o principal fosfolipídio presente nas membranas celulares e nas lipoproteínas (VAN MEER, 1989), participando de vários processos

biológicos. Existem também diferentes espécies moleculares de fosfatidilcolina, dependendo dos ácidos graxos esterificados. Geralmente o ácido graxo esterificado na posição 1 do glicerol é saturado, e o ácido graxo esterificado na posição 2 é insaturado. Um dos principais ácidos graxos poliinsaturados encontrados nessa posição, na maioria dos fosfolipídios de membrana, é o ácido araquidônico (SCHERPHOF, 1993; VOET; VOET; PRATT, 2000).

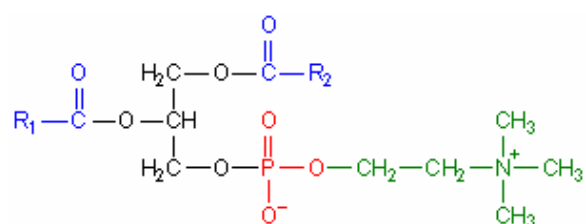


Figura 1 - Representação estrutural da molécula de fosfatidilcolina. Em azul, ácidos graxos; em preto, glicerol; em vermelho, grupo fosfato; e em verde a colina.

Apesar da lecitina ser considerada por muitos um nutriente não essencial, os produtos metabólicos da fosfatidilcolina participam dos sinais de transdução intracelulares e da sinalização intercelular, fundamentais para o desencadeamento de respostas fisiopatológicas. O ácido fosfatídico, o diacilglicerol, a lisofosfatidilcolina e o ácido araquidônico estão entre as principais moléculas de sinalização geradas a partir da fosfatidilcolina (CUI; HOUWELING, 2002). O ácido araquidônico é precursor de mediadores químicos da inflamação tais como prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos (EXTON, 1994; POMPÉIA *et al*, 2000), que têm potentes propriedades pró-inflamatórias e imuno-regulatórias (CALDER, 1998b). A administração oral de fosfatidilcolina leva ao aumento da disponibilidade de colina para a síntese de novos substratos no organismo (BUCHMAN *et al*, 1992). A colina é elemento constituinte, por exemplo, do fator de agregação plaquetária (PAF), da esfingomiéline e da acetilcolina. O PAF é um mediador de respostas inflamatórias sintetizado por células endoteliais e expresso na superfície dessas células onde pode ativar células do sistema imunitário (GRANGER; KUBES, 1994). Dietas deficientes em colina também diminuem a imunocompetência em ratos (COURRÈGES *et al*, 2003). Portanto, a fosfatidilcolina

e seus metabólitos estão relacionados com a funcionalidade de células do sistema imunitário. A esfingomielina está presente nas membranas de células neurais tendo importância fundamental para suas funções e a acetilcolina é um neurotransmissor envolvido nas funções de memória. Já foi demonstrado que a deficiência de colina na dieta afeta as funções do sistema nervoso (HOLMES-McNARY *et al*, 1997; NAKAMURA *et al*, 2001).

A fosfatidilcolina tem ação na absorção das gorduras da dieta no intestino delgado, juntamente com os sais biliares, solubilizando os lipídios e proporcionando um mecanismo de transporte desses até os enterócitos (PHAN; TSO, 2001). A fosfatidilcolina também é essencial para a síntese das lipoproteínas (ZEIZEL; BLUSZTAJN, 1994). Quando um suprimento adequado de fosfatidilcolina não está disponível, o fígado é incapaz de exportar os triacilgliceróis, os quais se acumulam no fígado (TIJBURG; VANCE, 1991). Sabe-se que a nutrição parenteral com deficiência de colina a longo-prazo, está relacionada com o desenvolvimento do fígado gorduroso ou esteatose (BUCHMAN *et al*, 1992; ALLARD, 2002). Pacientes submetidos a uma dieta deficiente em colina também apresentam disfunções hepáticas súbitas (HAYASHI *et al*, 1999). Portanto a fosfatidilcolina é essencial para o funcionamento hepático, apresentando estreita relação com o transporte plasmático de triacilgliceróis e colesterol.

Adicionalmente, a fosfatidilcolina suplementada na dieta, pode fornecer fonte para síntese de outros lipídios nas células. O aumento da disponibilidade dessa classe de fosfolípido para o organismo pode aumentar o suprimento dos metabólitos, como colina, ácido fosfatídico, diacilglicerol e ácido araquidônico, gerados a partir dela.

1.1. Digestão e absorção da fosfatidilcolina

A fosfatidilcolina da dieta, assim como os outros fosfolipídios e o colesterol, não é hidrolisada no estômago pelas lipases lingual e gástrica. Os movimentos peristálticos que ocorrem no estômago fazem ação mecânica para a

emulsificação inicial dos lipídios da dieta. Os fosfolipídios presentes na dieta, principalmente fosfatidilcolina, auxiliam nessa emulsificação, que é importante para a posterior hidrólise das gorduras da dieta pela lipase pancreática no intestino delgado (PHAN; TSO, 2001; SHEN; HOWLES; TSO, 2001).

A fosfatidilcolina e o colesterol da dieta, os produtos da hidrólise dos triacilgliceróis (diglicerídeos e ácidos graxos) e outros triacilgliceróis não hidrolisados, entram no intestino delgado onde acontece a maior parte da digestão dos lipídios pela ação combinada da bile e do suco pancreático. A bile é composta de sais biliares, fosfatidilcolina e colesterol endógeno e faz a emulsificação dos lipídios da dieta no intestino delgado. Os lipídios e os sais biliares interagem espontaneamente formando as micelas, que são agregados cilíndricos que captam lipídios e facilitam seu transporte através do meio aquoso (a camada não misturada) até os enterócitos (MU; HOY, 2003). A fosfatidilcolina obtida da dieta é então distribuída entre as micelas e a lipase pancreática pode então hidrolisar os lipídios. A fosfatidilcolina é parcialmente hidrolisada pela fosfolipase A₂ pancreática (PLA₂). Essa fosfolipase hidrolisa a molécula na posição 2 do glicerol, liberando um ácido graxo e uma lisofosfatidilcolina. Também pode ser encontrada alguma atividade da fosfolipase A₁ pancreática (PLA₁) (PHAN; TSO, 2001), que hidrolisa a molécula na posição 1 do glicerol.

1.2. Transporte da fosfatidilcolina plasmática através das lipoproteínas

Nos enterócitos pode haver ressíntese de fosfatidilcolina. A lisofosfatidilcolina absorvida pode ser reacilada para formar fosfatidilcolina, hidrolisada para formar glicerol-3-fosforilcolina, ou ainda combinar-se com outra molécula de lisofosfatidilcolina, formando fosfatidilcolina e glicerol-3-fosforilcolina. Os ácidos graxos liberados são utilizados para a síntese de triacilgliceróis e de outros fosfolipídios e a glicerol-3-fosforilcolina é transportada pela veia porta para utilização no fígado. A fosfatidilcolina e outros fosfolipídios

são utilizados tanto para a manutenção e funcionalidade da membrana do enterócito quanto para a formação de novas lipoproteínas (PHAN; TSO, 2001).

As lipoproteínas formadas nos enterócitos são os quilomícrons e as VLDL, que são liberados nos canais linfáticos. Sabe-se que a absorção e o transporte de lipídios da dieta nos canais linfáticos requerem fosfatidilcolina ou seu precursor biossintético, a colina (PHAN; TSO, 2001). Dos vasos linfáticos essas lipoproteínas alcançam, via ducto torácico, a corrente sangüínea, entrando em contato com outras lipoproteínas plasmáticas e então ocorre a rápida transferência de proteínas entre elas. Os lipídios dos quilomícrons são hidrolisados rapidamente pela atividade lipolítica das lipases lipoproteicas e os ácidos graxos e monoglicerídios vão para os tecidos. Formam-se então os quilomícrons remanescentes, que são ricos em colesterol e podem ser removidos do plasma pelo fígado. O fígado então forma as lipoproteínas VLDL. As apolipoproteínas e os triacilgliceróis das VLDL são removidos gradativamente, formando as IDL e, posteriormente, as LDL. Estas últimas são captadas pelas células, através de endocitose mediada por receptor, levando colesterol para as células (ALLARD, 2002). Os outros lipídios hidrolisados pela ação das lipoproteínas lipases podem então ser distribuídos para todas as células do organismo. As lipoproteínas HDL são formadas no plasma a partir de componentes obtidos através da degradação das outras lipoproteínas e elas removem o colesterol dos tecidos.

1.3. Lecitina de soja e diabetes mellitus

Alguns estudos indicam que a administração de lecitina de soja a animais experimentais induzidos à hipercolesterolemia reduz as concentrações de colesterol total, colesterol LDL e mantém ou aumenta as concentrações de colesterol HDL em comparação com a suplementação da dieta com ácidos graxos poliinsaturados (ROSSENEU *et al*, 1979; ISHIDA *et al*, 1988; O'BRIEN; CORRIGAM, 1988; JIMENEZ *et al*, 1990; IWATA *et al*, 1992; POLICHETTI *et al*, 1996). Em pacientes hipercolesterolêmicos também já foi demonstrada redução significativa

das concentrações de colesterol plasmáticas, o que não acontece em indivíduos normolipidêmicos (TOMPKINS; PARKIN, 1980; SIRTORI *et al*, 1985; KUROUSKA *et al*, 1997; MEDIC *et al*, 2003). Os mecanismos pelos quais a lecitina de soja induz seus efeitos hipocolesterolêmicos ou anti-aterogênicos não estão esclarecidos. Estudos prévios demonstraram que a fosfatidilcolina pode ser parcialmente absorvida intacta no intestino e incorporada preferencialmente nas HDL (MEDIC *et al*, 2003), sugerindo que os efeitos anti-aterogênicos podem resultar da relação entre os fosfolipídios e o colesterol HDL. Outros estudos indicam que a suplementação com lecitina de soja poderia aumentar a disponibilidade de fosfolipídios destinados à secreção biliar modulando a secreção de ácidos biliares (RIOUX *et al*, 1994; LEBLANC *et al*, 1998; POLICHETTI *et al*, 2000).

A suplementação da dieta com lecitina de soja tem sido popularmente utilizada para reduzir hiperlipidemias, inclusive por indivíduos com diabetes mellitus. A diabetes mellitus é uma doença que afeta o metabolismo não só dos carboidratos, mas também das gorduras e das proteínas. Com a deficiência da secreção da insulina pelas células β das ilhotas de Langerhans (diabetes tipo 1) ou o comprometimento na captação de glicose pelas células (diabetes tipo 2), há um aumento do catabolismo lipídico com conseqüente formação excessiva de corpos cetônicos e síntese diminuída de ácidos graxos e triacilgliceróis nas células (LEWIS; STEINER, 1996; VERGES, 1999). As mudanças no metabolismo das gorduras são expressas em acúmulo de lipoproteínas ricas em triacilgliceróis e aumento de colesterol VLDL e LDL (HIRANO *et al*, 1991; STEWART; LAKER; ALBERTI, 1994; STEINER, 2001) e estão também associadas com a redução no HDL (BROWN, 1994; PARIS; SERRANO; GAMBOA, 1996; RASHID *et al*, 2003).

A velocidade de síntese de lipoproteínas VLDL ricas em triacilgliceróis aumenta na diabetes e a hidrólise dessas lipoproteínas pela enzima lipase lipoproteica está diminuída, levando à hipertriacilglicerolemia (LEWIS; STEINER, 1996; BETTERIDGE, 2001). Além disso, o metabolismo das lipoproteínas ricas em

triacilgliceróis está intimamente relacionado com o metabolismo das LDL e HDL (RASHID *et al*, 2003). A longa permanência das lipoproteínas ricas em triacilgliceróis remanescentes na circulação resulta no aumento de triacilgliceróis nas lipoproteínas LDL e HDL e sua hidrólise pela lipase hepática resulta em partículas menores e mais densas de LDL e HDL (BETTERIDGE, 1994; MERO; SYVÄNNE; TASKINEN, 1998; RASHID *et al*, 2003).

A dislipidemia conseqüente da diabetes é um importante fator de risco de doenças cardiovasculares (HAFFNER, 1999; GARBER, 2000; STEINER, 2001). O risco de desenvolvimento da aterosclerose em diabéticos é de duas a quatro vezes maior do que em pessoas não-diabéticas (NATHAN; MEIGS; SINGER, 1997; STEINER, 2001) e a aterosclerose é a maior causa de morte em pessoas com diabetes (GARBER E KARLSSON, 2001).

A regulação do metabolismo lipídico através de drogas ou alimentos naturais, pode ser considerada um alvo importante de intervenção terapêutica para diminuir o risco de doenças cardiovasculares (SCHAEFER, 2002) e a suplementação da dieta com lecitina de soja poderia contribuir para a redução de hiperlipidemias conseqüentes de patologias diversas, incluindo a diabetes mellitus.

Embora estudos da suplementação da dieta com lecitina tenham demonstrado que esta diminui consideravelmente as concentrações plasmáticas de lipídios nos casos de dislipidemias (LEBLANC *et al*, 1998; MASTELLONE *et al*, 2000; POLICHETTI *et al*, 2000), os relatos dos efeitos da suplementação com lecitina de soja, na diabetes, são escassos. Não há estudos *in vivo* sobre a dependência da dose de lecitina de soja que promove esses efeitos no organismo bem como a repercussão sobre outros sistemas.

1.4. Lipídios e sistema imunitário

O sistema imunitário é responsável pela defesa do organismo contra microrganismos invasores. As respostas imunitárias podem ser classificadas em inatas ou adaptativas. As respostas inatas constituem a primeira linha de defesa do

organismo e são mediadas principalmente por células especializadas em fagocitar corpos estranhos, os fagócitos (granulócitos e macrófagos), e essa atividade não exige prévia exposição dessas células aos organismos invasores. Já as respostas imunitárias adaptativas constituem uma imunidade duradoura e são mediadas pelos linfócitos. Essas células quando ativadas podem proliferar e produzir substâncias citotóxicas ou anticorpos específicos contra antígenos invasores (MEDZHITOV; JANEWAY, 1997; BORGHANS; NOEST; BOER, 1999).

Os macrófagos e linfócitos são agranulócitos e mononucleares. Macrófagos possuem receptores na sua superfície de membrana que lhes permite ligar-se a constituintes comuns de muitas superfícies microbianas, antes de fagocitá-las. Esses fagócitos podem captar antígenos e se deslocar para regiões em que estão localizados os linfócitos, onde apresentam o antígeno aos linfócitos. Os linfócitos estão presentes como células circulantes no sangue e na linfa ou nos órgãos linfóides, como baço, timo, linfonodos, medula óssea e placa de Peyer e podem ser classificados em T, B e NK (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 1995). Normalmente essas células encontram-se no estado quiescente, mas na presença de antígenos tornam-se ativadas e proliferam rapidamente, o que faz com que a resposta imunitária seja eficiente contra antígenos invasores. Os linfócitos T quando ativados, através da ligação de agonistas a seus receptores de membrana, proliferam e podem secretar mediadores químicos para outras células, como por exemplo as infectadas por vírus, ou funcionar como auxiliares ativando macrófagos e outros linfócitos. Esses linfócitos proliferam *in vitro* quando estimulados por mitógenos como a concanavalina A. Os linfócitos B ativados são chamados de plasmócitos e são capazes de proliferar e secretar anticorpos contra antígenos invasores, as imunoglobulinas. *In vitro* eles também proliferam em resposta a lipopolissacarídeos (ARDAWI; NEWSHOLME, 1985; CALDER, 1998a; JANEWAY *et al*, 2000).

Os lipídios da dieta afetam a concentração plasmática de lipídios e são capazes de modular a composição e as funções das células do sistema imunitário. O consumo de lipídios na dieta com alta proporção de ácidos graxos saturados resulta em aumento de colesterol e triacilgliceróis plasmáticos (NICOLOSI *et al*, 2001). E

além dos efeitos potenciais sobre as concentrações de lipídios plasmáticos, os lipídios da dieta têm efeitos imunomodulatórios (KINSELLA *et al*, 1990; JEFFERY *et al*, 1997; CALDER, 1998b; DE PABLO *et al*, 2000). A deficiência de ácidos graxos essenciais na dieta pode, por exemplo, reduzir a imunidade mediada por células (CALDER, 2001a). Um alto teor de lipídios na dieta leva à diminuição da proliferação de linfócitos, quando comparado com o baixo teor de lipídios, e a redução no total de gordura dietética ingerida aumenta a proliferação de linfócitos humanos do sangue estimulados, sugerindo que dietas com alto teor de lipídios modulam a proliferação de linfócitos humanos (CALDER, 2001b).

Os mecanismos pelos quais ácidos graxos saturados presentes na dieta alteram as funções de células do sistema imunitário podem estar relacionados com as concentrações plasmáticas de lipídios. Já se sabe que o colesterol altera algumas funções de células do sistema imunitário *in vitro* e que existe uma correlação positiva entre o colesterol no soro e a função dessas células (CALDER; BEVAN; NEWSHOLME, 1992).

Os efeitos das lipoproteínas sobre a funcionalidade de células do sistema imunitário também já foram demonstrados *in vitro*, e as lipoproteínas VLDL, LDL e HDL inibem a proliferação de linfócitos (DE DECKERE *et al*, 1988). Estudos que examinaram os efeitos da alimentação de ratos contendo lipídios de diferentes composições de ácidos graxos sobre as concentrações e composições de lipoproteínas plasmáticas demonstraram que estas sofrem modificações no perfil de ácidos graxos de acordo com a dieta e, assim, inibem a proliferação de linfócitos (JEFFERY *et al*, 1996). Macrófagos fagocitam avidamente lipoproteínas LDL, acumulando colesterol e podendo transformar-se em *foam cells* (células espumosas) descritas nos processos de aterosclerose (TABAS, 1997). A incorporação de lipídios pelos macrófagos é importante na modulação da fluidez de suas membranas, o que determina sua capacidade fagocitária e de adesão (CALDER *et al*, 1990).

A redução das concentrações séricas de ácido araquidônico, como resultado da composição lipídica da dieta, pode diminuir a formação de moléculas sinalizadoras importantes para as respostas imunitárias, como prostaglandinas e

leucotrienos, (CALDER, 2001b e 2002), o que demonstra mais uma vez que a composição de lipídios no plasma tem influência sobre o sistema imunitário. Como as concentrações plasmáticas de lipídios modificam as respostas imunitárias, a suplementação com lecitina de soja, alterando as concentrações de lipídios plasmáticos em ratos pode modular as funções de células como macrófagos e linfócitos.

Os lipídios da dieta poderiam também afetar as funções de macrófagos e linfócitos através de alterações na composição dos fosfolipídios da membrana plasmática e conseqüentes modificações nas propriedades físicas dessas células como fluidez de membrana ou de regiões específicas da membrana, alterando a habilidade da célula em responder a estímulos. A influência dos lipídios da dieta sobre as células do sistema imunitário pode também resultar da alteração na síntese de mediadores químicos formados a partir dos fosfolipídios de membrana, que poderiam reduzir a afinidade de substratos para enzimas que sintetizam moléculas de sinalização (CALDER, 2001b e 2002).

Tem sido demonstrado que a adição de fosfatidilcolina *in vitro* apresenta efeitos sobre as células do sistema imunitário. Macrófagos incorporam fosfolipídios avidamente (NISHIYAMA-NARUKE; CURI, 2000) e linfócitos apresentam redução na capacidade proliferativa e produção de citocinas (NISHIYAMA *et al.*, 2000). *In vivo* a administração de fosfatidilcolina também poderia apresentar modulação na funcionalidade de macrófagos e linfócitos. Adicionalmente, o conteúdo de fosfolipídios nessas células pode ser modificado, na medida em que se aumenta o fornecimento de fosfatidilcolina na dieta.

GUIMARÃES *et al* (1995) demonstraram que a composição de ácidos graxos do fígado é diferente da dos órgãos linfóides e que os lipídios da dieta modificam a composição de ácidos graxos dos órgãos linfóides, como baço, timo e linfonodo mesentérico, mas não a proporção de ácidos graxos saturados, monoinaturados e poliinsaturados do fígado, um órgão metabólico que exerce várias funções complexas, como as incluídas no metabolismo de glicose e lipídios. Os ácidos graxos poliinsaturados da dieta influenciam a produção de eicosanóides

(INUI *et al*, 1996; KUMAMOTO *et al*, 1998; IHARA *et al*, 1998) e a disponibilidade de ácidos graxos precursores pode ser um fator regulador da biossíntese de eicosanóides nos tecidos linfóides (KINSELLA *et al*, 1990), o que afetaria a funcionalidade das células do sistema imunitário. Mudanças na atividade enzimática nesses tecidos, devido ao tipo de dieta, também poderiam estar alterando suas funções. Assim, a lecitina de soja suplementada na dieta também poderia interferir no conteúdo de lipídios em órgãos linfóides e no fígado.

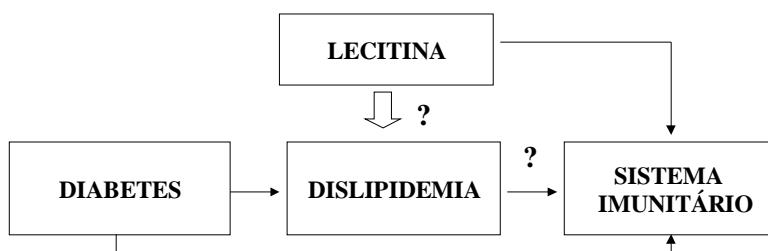


Figura 2 – Representação esquemática da hipótese.

Baseado no fato de que a disponibilidade de lipídios altera a funcionalidade de linfócitos e macrófagos, a hipótese é de que a suplementação da dieta com lecitina de soja, dependendo da dose administrada, influencia as concentrações plasmáticas de colesterol e triacilgliceróis e pode, conseqüentemente, alterar a funcionalidade do sistema imunitário ou ainda ter efeitos diretos sobre a capacidade fagocitária de macrófagos e o metabolismo e a proliferação de linfócitos (Figura 2).

2. OBJETIVOS

2.1. Verificar os efeitos da suplementação da dieta de ratos Wistar normais e diabéticos com diferentes doses de lecitina de soja sobre a capacidade fagocitária de macrófagos e o metabolismo e a proliferação de linfócitos;

2.2. Determinar as concentrações séricas de glicose, triacilgliceróis, colesterol e fosfolipídios nos animais normais e diabéticos que receberam essas diferentes doses de lecitina de soja suplementada na dieta;

2.3. Investigar os efeitos dessa suplementação e suas diferentes doses sobre o conteúdo de triacilgliceróis, colesterol e fosfolipídios do fígado, baço e timo, bem como sobre a quantidade de fosfolipídios em macrófagos e linfócitos.

2.4. Determinar o número e a contagem diferencial de leucócitos do sangue nos animais não-diabéticos e diabéticos suplementados com lecitina de soja.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Animais

Ratos Wistar machos com peso corpóreo de 200 ± 20 g foram obtidos do Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, e foram mantidos nesse local numa sala sob ciclo claro/escuro 12/12 horas à temperatura de 23°C e recebendo água e alimento (ração animal contendo 52% de carboidratos, 21% de proteínas e 4% de lípidos da NUVILAB CR1, Nuvital nutrientes Ltda) *ad libitum*. Os ratos foram divididos em grupos e acondicionados em caixas de plástico com 4 animais cada. Os grupos foram denominados: grupo controle (C); grupo suplementado 1 (S1); grupo suplementado 2 (S2); grupo diabético (D); grupo diabético suplementado 1 (DS1); e grupo diabético suplementado 2 (DS2). O peso dos animais foi monitorado a cada 2 dias em balança digital Urano Modelo VDI 10000/1. Os procedimentos utilizados foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (certificado nº 14).

3.2. Tratamento dos animais

3.2.1. Indução de diabetes

Para indução de diabetes, os grupos de ratos denominados D, DS1 e DS2 foram tratados com injeção (i. v.) de 45mg de aloxana /kg de peso corporal (Sigma - 100mg de aloxana em 5mL de salina 0,9%) em dois dias consecutivos. Os grupos C, S1 e S2 receberam apenas injeção de salina 0,9%. Um jejum de 12 horas precedeu a injeção em ambos os dias e somente após duas horas a partir da injeção os animais voltaram a receber água e comida. Foram considerados diabéticos os animais que apresentaram concentração plasmática de glicose superior ou igual a 220 mg/dL.

3.2.2. Suplementação com lecitina de soja

Os grupos de ratos denominados S1 e DS1 receberam suplementação de 1g de lecitina de soja/kg de peso corporal; os grupos denominados S2 e DS2 receberam a dose de 2g de lecitina de soja/kg de peso corporal; os outros grupos (C e D) não receberam suplementação. A lecitina de soja (Herbarium) foi administrada oralmente durante 7 dias consecutivos a partir de dois dias após a indução de diabetes ou injeção de salina.

3.3. Sacrifício dos animais e coleta das amostras

Após os 7 dias de suplementação, os ratos foram sacrificados por decaptação sem anestesia para coleta de sangue. O sangue foi colocado sem anti-coagulante em tubos de ensaio de 10 mL e centrifugado a 1500 rpm durante 5 minutos a 4°C (centrífuga Eppendorf modelo 5810R), para obtenção do soro (sobrenadante). Os macrófagos peritoneais residentes foram coletados em tubos estéreis, após injeção intraperitoneal de 40 mL de salina estéril à temperatura ambiente e massagem abdominal de 30 segundos, através de laparotomia mediana e aspiração do fluido com uma pipeta Pasteur de plástico.

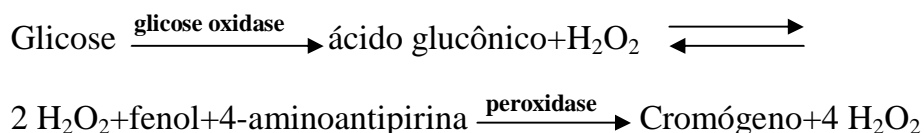
Os linfonodos mesentéricos foram cirurgicamente removidos, coletados em tubos contendo salina estéril. Os linfócitos foram então separados pela compressão mecânica dos linfonodos em malhas de aço. Os macrófagos foram centrifugados a 1200 rpm por 8 minutos (centrífuga Eppendorf modelo 5810R). O precipitado celular de macrófagos foi ressuspenso em meio de cultura estéril RPMI com SFB (10%, v/v) e antibióticos (100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina), sendo uma alíquota dessas células diluída com azul de Tripán para contagem na câmara de Neubauer. A suspensão de linfócitos foi filtrada (filtro Whatman 105 cat. no.2105-841, UK) e lavada por 3 vezes (centrifugando-se a 1200 rpm por 8 minutos à 10 °C em centrífuga Eppendorf modelo 5810R e retirando-se o sobrenadante). Foram coletados também órgãos como timo, baço e fígado, os quais foram pesados.

3.4. Determinações séricas

Foram realizadas determinações séricas de glicose, triacilgliceróis, colesterol total e colesterol HDL por métodos espectrofotométricos. Foram empregados sistemas colorimétricos e enzimáticos, cujos procedimentos técnicos utilizados seguiram os protocolos descritos nos kits comercialmente disponíveis.

3.4.1. Determinação da glicemia

A determinação da concentração de glicose circulante foi realizada pelo método enzimático colorimétrico, utilizando o kit glicose PAP Liquiform da Labtest Diagnóstica (TRINDER, 1969; SACKS *et al*, 2002). A glicose na amostra sofre a seguinte reação:



A intensidade de cor emitida é diretamente proporcional à quantidade de glicose na amostra do soro. A leitura de absorvância foi feita no espectrofotômetro Ultrospec 2000 (Pharmacia) a 505 nm. A concentração de glicose foi expressa em mg/dL, e calculada pela fórmula:

$$[\text{Glicose}] = \frac{\text{absorbância da amostra}}{\text{absorbância do padrão}} \times N$$

onde,

$$[\text{Glicose}] = \text{concentração de glicose na amostra (mg/dL)}$$

$$N = \text{concentração no padrão (100 mg / dL)}$$

3.4.2. Determinação de triacilglicerolemia

A triacilglicerolemia foi determinada pelo método enzimático colorimétrico que utiliza quatro enzimas, conforme o kit triacilgliceróis GPO-ANA da Labtest. O glicerol liberado pela hidrólise do triacilglicerol contido no soro, catalisada pela lipase da lipoproteína é convertido pela ação da glicerolquinase em glicerol-3-fosfato, que é oxidado a dihidroxiacetona e peróxido de hidrogênio na presença de glicerolfosfato oxidase. A reação de acoplamento entre o peróxido de hidrogênio, 4-aminoantipirina e ESPAS é catalisada pela peroxidase produzindo a quinoneimina que tem máximo de absorvância em 540nm (TRINDER, 1969). O Kit é composto de: solução tampão 50mmol/L, pH 6,5; acetado de Mg 5mmol/L, ESPAS 1 mmol/L, 4-aminoantipirina 0,7 mmol/L, ATP 0,3 mmol/L, glicerolquinase ≥ 800 U/L, glicerolfosfato ≥ 2500 U/L, lipase da lipoproteína ≥ 100 KU/L, peroxidase ≥ 350 U/L, azida sódica 1,54mmol/L. As amostras foram preparadas de acordo com as instruções do fabricante, e após a leitura da absorvância em 540nm, a concentração de triacilgliceróis foi calculada em mg/dL.

3.4.3. Determinação de colesterolemia

A colesterolemia foi determinada pelo método enzimático, conforme kit colesterol Liquiform da Labtest, utilizando-se associação da reação de oxidação catalisada pela colesterol oxidase, após hidrólise dos ésteres de colesterol, com leitura de absorvância em 500 nm (TRINDER, 1969). O Kit de dosagem é composto: tampão 50 mmol/L contendo 0,01g/dL, pH 7.0, colesterol esterase (≥ 150 U/L), colesterol oxidase (≥ 175 U/L), peroxidase (≥ 1000 U/L), 4-aminoantipirina 0,5nmol/L, fenol 2,4mmol/L, solução padrão 200mg/dL, preservativos e conservantes. As amostras foram preparadas de acordo com as instruções do fabricante do kit, e após a leitura da absorvância em 500 nm, foi calculada a concentração de colesterol em mg/dL.

3.4.4. Determinação de colesterol HDL

Foi utilizado o sistema enzimático do kit colesterol HDL da Labtest para precipitação das lipoproteínas de baixa e de alta densidade (LDL e VLDL) e determinação do colesterol HDL no sobrenadante após centrifugação (WARNICK; NAUCK; RIFAI, 2001). O kit contém: precipitante com ácido fosfotúrgstico 1,5nmol/L e cloreto de magnésio 54 mmol/L, solução padrão 20mg/dL de HDL e reagente de cor - colesterol Liquiform Labtest. Após a medida da absobância das amostras em 500nm, foi calculada a concentração de colesterol HDL em mg/dL.

3.4.5. Determinação de colesterol VLDL e LDL

Os valores das concentrações do colesterol VLDL serão obtidos pela divisão dos valores de triacilgliceróis por 5 e os valores do colesterol LDL pela subtração de colesterol HDL e VLDL do colesterol total, de acordo com FRIEDEWALD, LEVY e FREDRICKSON (1972).

3.4.6. Determinação de fosfolipídios no soro

Em eppendorfs de 2 mL foram colocados 0,4 mL de soro e a eles acrescentados 0,5 mL de metanol e 1,0 mL de clorofórmio para extração lipídica por método modificado do procedimento descrito por FOLCH e STANLEY (1957). As amostras foram então centrifugadas a 14000 rpm por 2 minutos (centrífuga Eppendorf modelo 5810R), e formaram-se duas fases no eppendorf: a fase superior aquosa e a fase inferior lipídica. Retirou-se a fase inferior, passando-a para um tubo de ensaio, enquanto o que ficou no eppendorf foi misturado com 0,5 mL de clorofórmio, agitado e centrifugado a 14000 rpm por 2 minutos (centrífuga Eppendorf modelo 5810R). Novamente formaram-se duas fases: a superior aquosa foi descartada e a inferior lipídica foi adicionada ao tubo de ensaio, que recebeu então 0,5 mL de solução de Folch (clorofórmio: metanol: água, na proporção 3:

48:47). Os tubos foram centrifugados a 4000 rpm por 4 minutos (centrífuga Eppendorf modelo 5810R), formando-se novamente duas fases: a superior aquosa foi descartada e a inferior lipídica foi levada para secar em banho-maria fervente. O conteúdo de fosfolipídios foi determinado como descrito por ANDERSON e DAVIS (1982). Aos extratos lipídicos foram acrescentados 100µL de ácido sulfúrico e as amostras foram aquecidas a 130°C por 25 minutos. Em seguida foram acrescentados 50µL de peróxido de hidrogênio 6% para completa oxidação dos compostos orgânicos após 40 minutos. Foram então colocados 2 mL de água e a seguir 800µL de uma solução 1:1 de molibdato de amônio e ácido ascórbico. Esta solução, que deve ser preparada na hora, tem cor amarela e deve ser mantida em gelo. A solução deve ficar azul somente quando reagir com o fósforo presente nas amostras. As amostras, assim como os padrões com concentrações conhecidas de fosfato de sódio bibásico foram lidas utilizando-se espectrofotômetro Ultrospec 2000 (Pharmacia) a 824nm. A intensidade de cor emitida é diretamente proporcional à quantidade de fósforo na amostra. A concentração de fosfolipídios foi calculada de acordo com a equação da reta da curva padrão de concentrações conhecidas e expressa em mol/L.

3.5. Determinação de triacilgliceróis e colesterol nos tecidos

Os tecidos (baço, timo e fígado) foram mantidos em gelo. Baço, timo e fígado em *pools* foram homogeneizados com salina (300mg de tecido em 1mL de salina). Em eppendorfs de 2mL foram colocados, em triplicata para cada grupo: 0,4mL do homogenato de baço; 0,4mL de homogenato de timo; 0,4mL do homogenato de fígado. A extração lipídica foi feita pelo método modificado de FOLCH e STANLEY (1957). Para determinação de triacilgliceróis e colesterol total foram adicionados 100uL de etanol aos extratos lipídicos e desta solução, retirou-se 20uL para determinação de colesterol e triacilgliceróis utilizando kits comerciais da Labtest conforme descrito nos itens 3.4.2 e 3.4.3.

3.6. Determinação de fosfolipídios nos tecidos e células

Os tecidos (baço, timo e fígado) foram mantidos em gelo. Baço, timo e fígado foram homogeneizados em salina (300mg de tecido em 1 mL de salina). Em eppendorfs de 2 mL foram colocados: 0,2 mL do homogenato de baço com 0,2 mL de salina; 0,2 mL de homogenato de timo com 0,2mL de salina; 0,1mL do homogenato de fígado com 0,3 mL de salina; e 0,4 mL de soro. Macrófagos e linfócitos foram colocados em eppendorfs, numa densidade de 6×10^6 células. Para a extração lipídica também foi utilizado o método modificado de FOLCH e STANLEY (1957), já descrito. O conteúdo de fosfolipídios foi determinado como descrito por ANDERSON e DAVIS (1982), também já descrito. A leitura de absorvância foi feita no espectrofotômetro Ultrospec 2000 (Pharmacia) a 824 nm. A concentração de fosfolipídios foi calculada de acordo com a equação da reta da curva padrão de concentrações conhecidas e expressa em mg/g de tecido ou em μmol /número de células.

3.7. Fagocitose (macrófagos)

Os macrófagos foram colocados em placas de 96 escavações, com 2×10^5 células por escavação e deixados para aderir por 30 minutos em estufa a 37°C com ar umidificado com 5% de CO_2 . As escavações foram lavadas com salina (200 μL) e foram adicionados 100 μL de meio de cultura e 10 μL de solução de zimosan não-opsionizado (1×10^8 partículas/mL) para incubação por 30 minutos. Depois foram adicionados 200 μL de fixador (4% formaldeído, 2% cloreto de sódio, 1% acetato de cálcio) para incubação por mais 30 minutos. Então o sobrenadante foi desprezado, as escavações lavadas com salina e a placa centrifugada a 1500 rpm, por 5 minutos, a 4°C (centrífuga Eppendorf modelo 5810R). O sobrenadante foi novamente desprezado e foram adicionados 200 μL de solução de extração (10% de ácido acético glacial e 40% etanol em água destilada) para nova incubação por 30

minutos. As absorbâncias foram obtidas em leitor de microplacas a 550 nm (PIPE; COLES; FARLEY, 1995).

3.8. Cultivo celular

O precipitado celular de linfócitos foi ressuspenso em meio de cultura estéril RPMI 1640 com SFB (10%, v/v) e antibióticos (100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina), sendo feitas alíquotas para contagem na câmara de Neubauer no ML com azul de tripan. As células foram cultivadas em placas de 96 escavações (5 x 10⁵ células/escavação). Os linfócitos foram ativados com mitógeno pela adição de concanavalina A numa concentração final de 5 µg/mL. As células foram deixadas a 37°C na estufa com ar umidificado com 5% de CO₂ por 24, 48 ou 66 horas.

3.9. Metabolismo e Proliferação de linfócitos

3.9.1. Ensaio da redução de MTT

O ensaio da redução do MTT foi utilizado para avaliar o metabolismo dos linfócitos. Após 48 ou 66 horas de cultivo, as placas foram centrifugadas a 1200 rpm por 8 minutos (centrífuga Eppendorf modelo 5819R). O sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 100µL de uma mistura 1:10 de MTT (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide*) (5 mg/mL) e meio de cultivo com soro fetal bovino em cada escavação. As células foram deixadas na estufa novamente por 3 horas e centrifugadas novamente a 1200 rpm por 8 minutos (centrífuga Eppendorf modelo 5810R). O sobrenadante foi desprezado e foram então aplicados 100µl de dimetilsulfóxido. As desidrogenases mitocondriais das células ativas reduzem o MTT a um precipitado de cor púrpura (formazan) que é solubilizado pela subsequente adição do dimetilsulfóxido. A absorbância do sobrenadante foi obtida em leitor de microplacas a 550 nm (MOSMANN, 1983).

3.9.2. Análise morfológica de linfócitos em cultivo

Após 66 horas de cultivo, antes da realização da citometria de fluxo, foi feita a fotomicrografia dos linfócitos em cultivo, utilizando-se microscópio invertido Leica DM IL com aumento de 400 x.

3.9.3. Ensaio no citômetro de fluxo

O ensaio no citômetro de fluxo foi utilizado para avaliar a capacidade proliferativa dos linfócitos. Após 24, 48 ou 66 horas de cultivo o conteúdo de cada escavação foi transferido para tubos específicos de citômetro de fluxo e as mesmas escavações foram lavadas com 300 μ L de PBS que foram acrescentadas aos tubos do citômetro. Foi utilizado um citômetro de fluxo (FACS Calibur Becton Dickinson, CA, USA) para a coleta das células em 30 segundos e a contagem foi feita com o software CELLQUEST (WANG; ZHENG, 2002).

3.10. Determinação do número de leucócitos do sangue e contagem diferencial

Para contagem do número de leucócitos/ mm^3 , o sangue foi coletado com anticoagulante EDTA (2mg de EDTA para cada mililitro de sangue). Foi adicionada solução hemolítica e após 15 minutos em banho-maria (37°C) as células foram contadas na câmara de Neubauer utilizando-se microscópio de luz (ML). A porcentagem diferencial de leucócitos foi obtida por exame microscópico de lâminas coradas com MayGrünwald-Giemsa.

Gotas de sangue (sem anticoagulante) foram coletadas de cada animal em lâminas, a partir das quais foi realizado um esfregaço. A lâmina foi coberta completamente com MayGrünwald (eosina-azul de metileno 0,3% em metanol). Após 3 minutos, o corante sobre a lâmina foi diluído com gotas de água destilada (pH 6,8) e após 1 minuto, a lâmina foi lavada. Em seguida o corante Giemsa (1% em metanol) foi diluído (1 gota em 1mL de H₂O tamponada) e adicionado à lâmina.

Após 20 minutos esta foi lavada e deixada para secar ao ar. No dia seguinte foi feita contagem diferencial utilizando-se ML (SILVA; HASHIMOTO, 2003).

3.11. Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm E.P.M. (Erro Padrão da Média) de, no mínimo, 3 preparações, cada uma proveniente de animais diferentes. As comparações entre grupos foram realizadas empregando-se o teste *t* de Student. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Peso dos animais

A variação de peso corporal dos animais estudados está apresentada na Figura 3. Não houve diferença na variação de peso entre os grupos C ($109\% \pm 1$) e S1 ($107\% \pm 2$), bem como entre os grupos DS1 ($91\% \pm 2$) e D ($91\% \pm 2$) após os sete dias de suplementação (Figura 3). A variação do peso dos animais do grupo S2 ($110\% \pm 1$) não foi alterada quando comparada com a do grupo C ($109\% \pm 1$), assim como a do grupo DS2 ($97\% \pm 2$) quando comparada com a do grupo D ($100\% \pm 2$), após os sete dias de suplementação (Figura 3). Os grupos de animais diabéticos apresentaram diminuição estatisticamente significativa do peso corporal em relação aos animais controle.

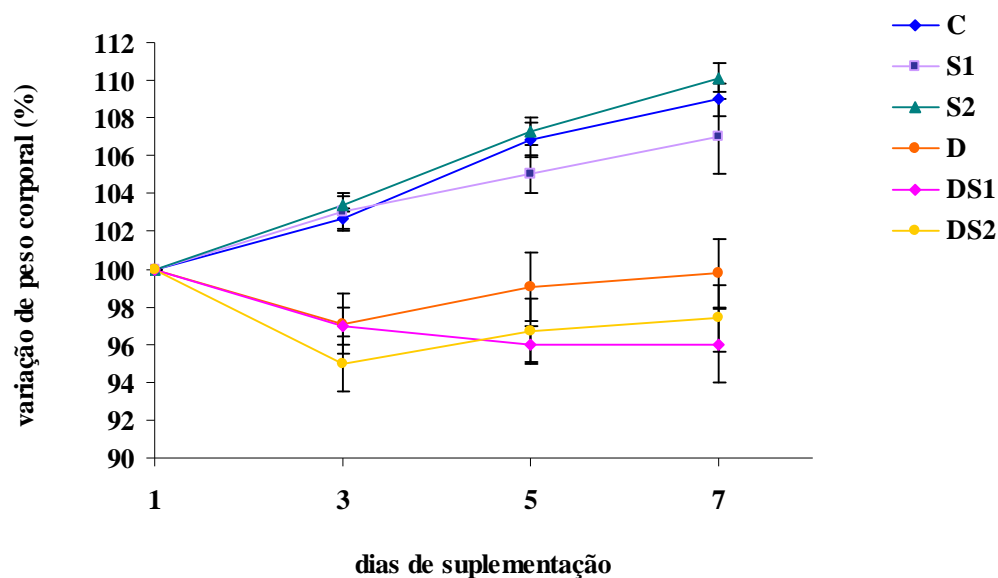


Figura 3 – Porcentagem de variação do peso corporal dos animais dos grupos controle (C), suplementado com 1g de lecitina de soja/kg de peso corporal (S1), suplementado com 2g de lecitina de soja/kg de peso corporal (S2), diabético (D), diabético suplementado com 1g de lecitina de soja/kg de peso corporal (DS1), e diabético suplementado com 2g de lecitina de soja/kg de peso corporal (DS2), do primeiro (100%) ao sétimo dia de suplementação, em intervalo de dois dias. Valores expressos como média \pm EPM de 16 animais de cada grupo.

4.2. Determinações séricas

As concentrações séricas de glicose, triacilgliceróis, colesterol total e colesterol HDL dos animais estudados estão apresentadas na Tabela 1. Na Tabela 2 estão os dados das concentrações séricas de colesterol VLDL e LDL.

Os grupos de animais diabéticos apresentaram valores significativamente maiores de glicemia que os animais controle, porém não apresentaram modificações nas concentrações de triacilgliceróis, colesterol total e colesterol HDL séricas.

As concentrações séricas de glicose, triacilgliceróis, colesterol total e colesterol HDL dos animais do grupo suplementado com 1g de lecitina de soja/kg de peso corporal (S1) não foram diferentes dos do grupo controle (C). O grupo DS1 também não apresentou diferença em relação ao grupo D. Os mesmos parâmetros nos grupos S2 e DS2 também não foram modificados quando comparados com os referentes aos grupos C e D, respectivamente.

GRUPO	GL (mg/dL)	TG (mg/dL)	COL (mg/dL)	HDL (mg/dL)
C	139,58 ± 7,32 (n = 29)	80,91 ± 4,50 (n = 28)	91,83 ± 7,01 (n = 28)	39,60 ± 1,03 (n = 25)
S1	150,22 ± 8,41 (n = 11)	80,56 ± 0,77 (n = 11)	84,93 ± 6,25 (n = 4)	42,57 ± 5,60 (n = 5)
S2	149,34 ± 7,49 (n = 29)	83,82 ± 4,41 (n = 27)	96,05 ± 7,98 (n = 27)	41,98 ± 2,43 (n = 25)
D	302,69 ± 16,59* (n = 28)	86,66 ± 4,28 (n = 29)	93,59 ± 6,68 (n = 21)	38,65 ± 2,69 (n = 24)
DS1	327,22 ± 25,47* (n = 7)	83,90 ± 3,97 (n = 7)	89,04 ± 3,26 (n = 4)	44,13 ± 1,47 (n = 5)
DS2	267,10 ± 20,94* (n = 28)	80,03 ± 8,24 (n = 25)	92,19 ± 7,20 (n = 20)	37,65 ± 2,85 (n = 23)

Tabela 1 – Glicose (GL), triacilgliceróis (TG), colesterol total (COL) e colesterol HDL (HDL). Grupos: controle (C), suplementado com 1g (S1), suplementados com 2g (S2), diabéticos (D), diabéticos suplementados com 1g (DS1) e diabéticos suplementados com 2g (DS2) de lecitina de soja/kg de peso corporal. Valores de média ± EPM.

* diferença estatística quando comparado ao grupo C ($P < 0,05$).

As concentrações de colesterol VLDL e LDL não foram modificados com a suplementação de 1 ou 2g de lecitina de soja/kg de peso corporal. Os grupos de

animais diabéticos também não apresentaram valores de VLDL e LDL diferentes em relação ao do grupo controle.

GRUPO	VLDL (mg/dL)	LDL (mg/dL)
C	16,18 ± 0,90 (n = 28)	36,05 ± 5,08 (n = 25)
S1	16,11 ± 2,15 (n = 11)	36,25 ± 2,49 (n = 4)
S2	16,76 ± 0,88 (n = 27)	37,31 ± 4,67 (n = 25)
D	17,33 ± 0,86 (n = 29)	37,61 ± 3,13 (n = 24)
DS1	18,78 ± 0,79 (n = 7)	36,86 ± 3,74 (n = 4)
DS2	16,01 ± 1,65 (n = 25)	38,46 ± 2,70 (n = 23)

Tabela 2 – Colesterol VLDL (VLDL) e colesterol LDL (LDL). Grupos: controle (C), suplementado com 1g (S1), suplementados com 2g (S2), diabéticos (D), diabéticos suplementados com 1g (DS1) e diabéticos suplementados com 2g (DS2) de lecitina de soja/kg de peso corporal. Valores de média ± EPM.

4.3. Fagocitose

Na fagocitose, houve aumento estatisticamente significativo do grupo DS1 ($0,620 \pm 0,019$) em relação ao grupo D ($0,271 \pm 0,017$), sendo que esse valor foi maior do que o do grupo C ($0,359 \pm 0,012$). Não houve diferença entre os grupos C ($0,359 \pm 0,012$) e S1 ($0,412 \pm 0,032$). A fagocitose foi significativamente maior no grupo S2 ($0,464 \pm 0,018$) quando comparada com o grupo C, porém não houve diferença entre os grupos DS2 ($0,298 \pm 0,021$) e D ($0,271 \pm 0,017$). O grupo D apresentou menor fagocitose em relação ao grupo C (Figura 4).

4.4. Metabolismo e Proliferação

4.4.1. MTT

Os grupos de linfócitos estimulados com ConA apresentaram maior redução do MTT do que os grupos de linfócitos não-estimulados após 48 horas de cultivo (Figura 5). Quando a redução do MTT entre os linfócitos estimulados foi comparada entre os grupos de animais estudados, o grupo S2ConA ($0,672 \pm 0,077$)

apresentou aumento no metabolismo significativo em relação ao grupo CConA ($0,378 \pm 0,041$), no entanto o grupo DS2ConA ($0,835 \pm 0,108$) não apresentou diferenças em relação ao grupo DConA ($0,879 \pm 0,099$). Entre os grupos S1ConA ($0,527 \pm 0,112$) e CConA não houve diferença estatística, nem entre os grupos DS1ConA ($0,794 \pm 0,122$) e DConA. Os grupos DConA, DS1ConA e DS2ConA apresentaram redução do MTT significativamente maior que o grupo CConA. A partir desses resultados passou-se a utilizar somente a suplementação com a dose de 2g de lecitina de soja/kg de peso corporal.

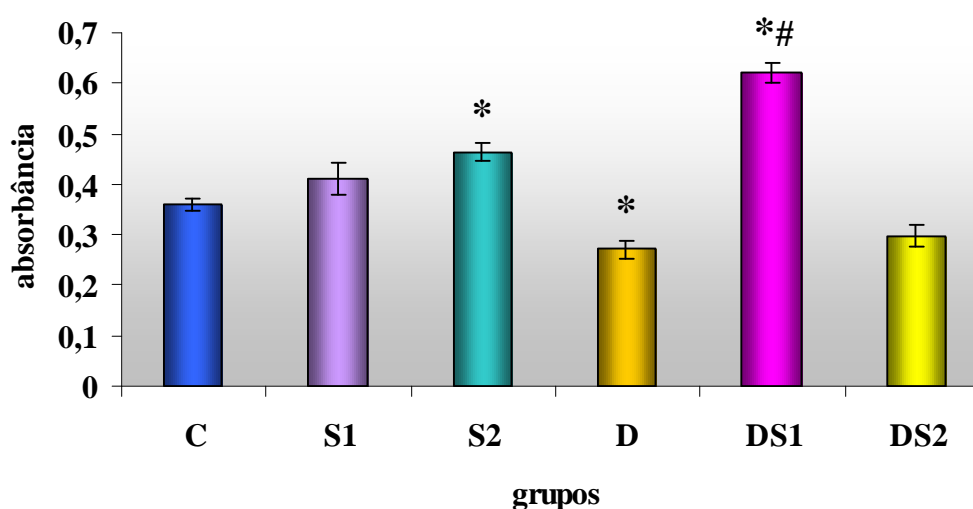


Figura 4 – Capacidade fagocitária de macrófagos. Grupos: controle (C), suplementado com 1g de lecitina de soja/kg de peso corporal (S1), suplementado com 2g de lecitina de soja/kg de peso corporal (S2), diabético (D), diabético suplementado com 1g de lecitina de soja/kg de peso corporal (DS1) e diabético suplementado com 2g de lecitina de soja/kg de peso corporal (DS2). Os valores estão expressos em média \pm EPM de quadruplicatas de 4 experimentos diferentes.

* diferença estatística quando comparado ao grupo C ($P < 0,05$).

diferença estatística quando comparado ao grupo D ($P < 0,05$).

Os resultados do ensaio de MTT em linfócitos cultivados por 66 horas estão apresentados na Figura 6. Os grupos de linfócitos estimulados com ConA apresentaram maior redução do MTT do que os dos grupos de linfócitos não-estimulados. Entre os grupos estimulados, o grupo DS2ConA ($1,301 \pm 0,105$)

apresentou metabolismo significativamente maior em relação aos do grupo CConA ($0,849 \pm 0,093$), e os grupos S2ConA ($0,886 \pm 0,077$) e DConA ($0,902 \pm 0,098$) apresentaram metabolismo semelhante ao do grupo CConA.

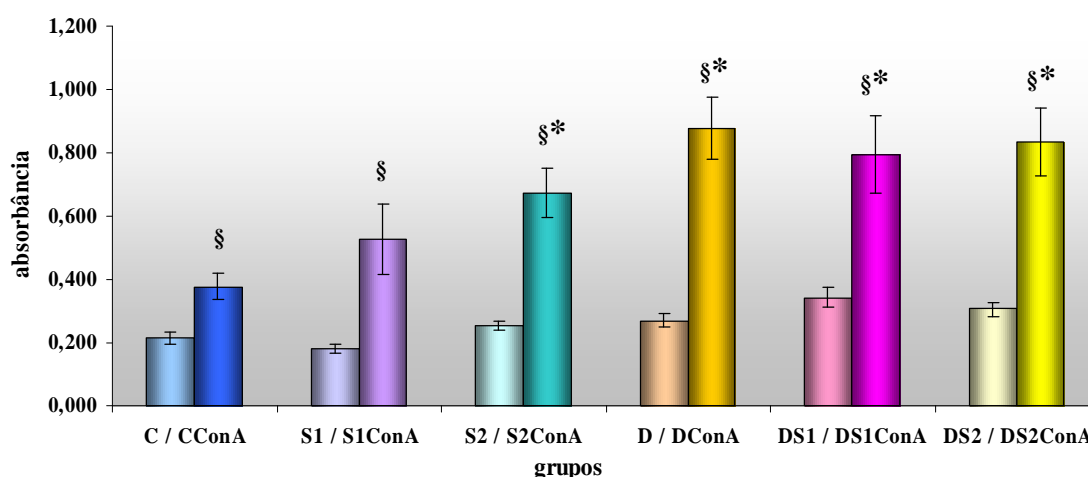


Figura 5 – Redução do MTT em linfócitos cultivados por 48 horas. Grupos: controle (C), suplementado com 1g (S1), suplementado com 2g (S2), diabético (D), diabético suplementado com 1g (DS1), e diabético suplementado com 2g (DS2) de lecitina de soja/kg de peso corporal e nos linfócitos dos respectivos grupos estimulados - (CConA, S1ConA, S2ConA, DConA, DS1ConA, DS2ConA). Valores de média \pm EPM de quadruplicatas de 4 experimentos diferentes.

§ diferença estatística quando comparado ao respectivo grupo não-estimulado ($P < 0,05$).

* diferença estatística quando comparado ao grupo CConA ($P < 0,05$).

4.4.2. Análise morfológica de linfócitos em cultivo

Fotomicrografias representativas dos grupos de linfócitos estimulados ou não com ConA após 66 horas de cultivo estão apresentadas nas Figuras 7 e 8. Pode-se observar que os linfócitos estimulados apresentam maior tamanho em relação aos não estimulados. A presença de linfócitos agrupados também pode ser observada.

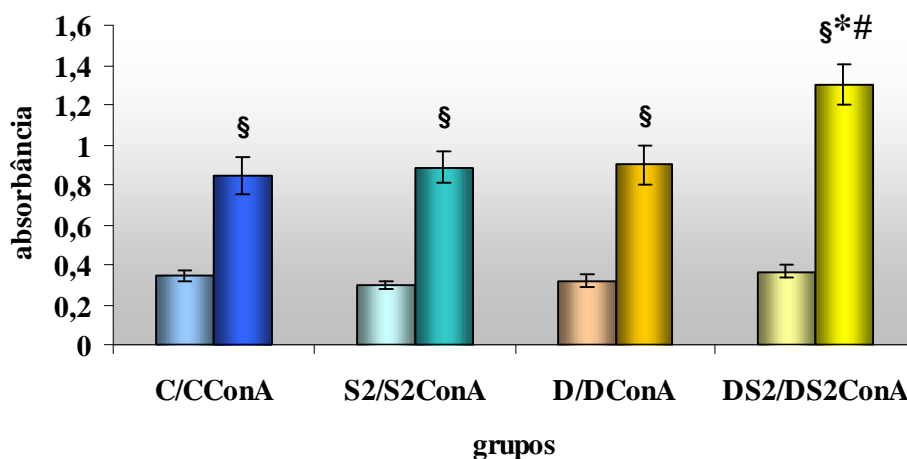


Figura 6 – Redução do MTT em linfócitos cultivados por 66 horas. Grupos: controle (C), suplementado com 2g (S2) diabético (D), e diabético suplementado com 2g (DS2) de lecitina de soja/kg de peso corporal e nos linfócitos dos respectivos grupos estimulados (CCon A, S2ConA, DConA, e DS2ConA). Valores de média \pm EPM de quadruplicatas de 4 experimentos diferentes.

§ diferença estatística quando comparado ao respectivo grupo não-estimulado ($P < 0,05$).

* diferença estatística quando comparado ao grupo CConA ($P < 0,05$).

diferença estatística quando comparado ao grupo DConA ($P < 0,05$).

4.4.3. Citômetro de fluxo

Os dados obtidos através dos ensaios de citometria de fluxo estão apresentados nas Figuras 9, 10 e 11. Conforme mostra a Figura 9, o número de linfócitos estimulados com ConA foi maior do que o de linfócitos não-estimulados dos respectivos grupos, exceto no grupo controle. O número de linfócitos, após 48 horas de cultivo, não foi diferente entre os grupos CConA ($119\% \pm 14$), S2ConA ($132\% \pm 7$), DConA ($137\% \pm 13$), e DS2ConA ($133\% \pm 15$). Também não houve diferença significativa entre os grupos C, S2, D e DS2.

Na curva de tempo, apresentada na Figura 10, o grupo de linfócitos estimulados com ConA apresentou aumento significativo de 46% após 66 horas de cultivo. O número de linfócitos estimulados diminuiu em 25% após 24 horas de cultivo e aumentou em 13% após 48 horas em relação ao de linfócitos não estimulados, mas essas diferenças não foram significativas. O número de linfócitos

não-estimulados ou estimulados com ConA não foi diferente em relação ao tempo 0 (100%) após 24, 48 ou 66 horas de cultivo.

A Figura 11 mostra o número de linfócitos dos grupos CConA, S2ConA, DConA e DS2ConA em relação ao grupo C não estimulado (100%) após 66 horas de cultivo. Os valores dos grupos S2ConA ($124\% \pm 9$) e DConA ($109\% \pm 10$) foram significativamente menores que os do grupo CConA ($156\% \pm 13$). O grupo DS2ConA ($148\% \pm 14$) apresentou porcentagem estatisticamente maior que a do grupo DConA e semelhante à do grupo CConA. O número de linfócitos não-estimulados do grupo D ($75\% \pm 5$) estava significativamente menor do que no grupo C.

Na Figura 12 são mostrados gráficos de dispersão do volume celular e granulosidade representativos (uma amostra de linfócitos estimulados e não-estimulados), obtidos no citômetro de fluxo após 48 e 66 horas de cultivo. Os gráficos de linfócitos estimulados com concanavalina A apresentaram população de células com maior tamanho.

4.5. Conteúdo de triacilgliceróis e colesterol nos tecidos

Os resultados obtidos das determinações do conteúdo de triacilgliceróis e colesterol no fígado, baço e timo dos animais estudados estão apresentados na Tabela 3. Não houve diferença estatística entre os grupos C e S1 ou C e S2, nem entre os grupos D e DS1 ou D e DS2 em nenhum dos tecidos.

4.6. Conteúdo de fosfolipídios no soro, tecidos, macrófagos e linfócitos

Os dados do conteúdo de fosfolipídios do soro e dos tecidos estão apresentados na Tabela 4. A suplementação com lecitina de soja não alterou as concentrações de fosfolipídios do soro, do fígado, do baço e do timo. O conteúdo de fosfolipídios em macrófagos e linfócitos está apresentado na Tabela 5. Não houve diferença estatística entre os grupos.

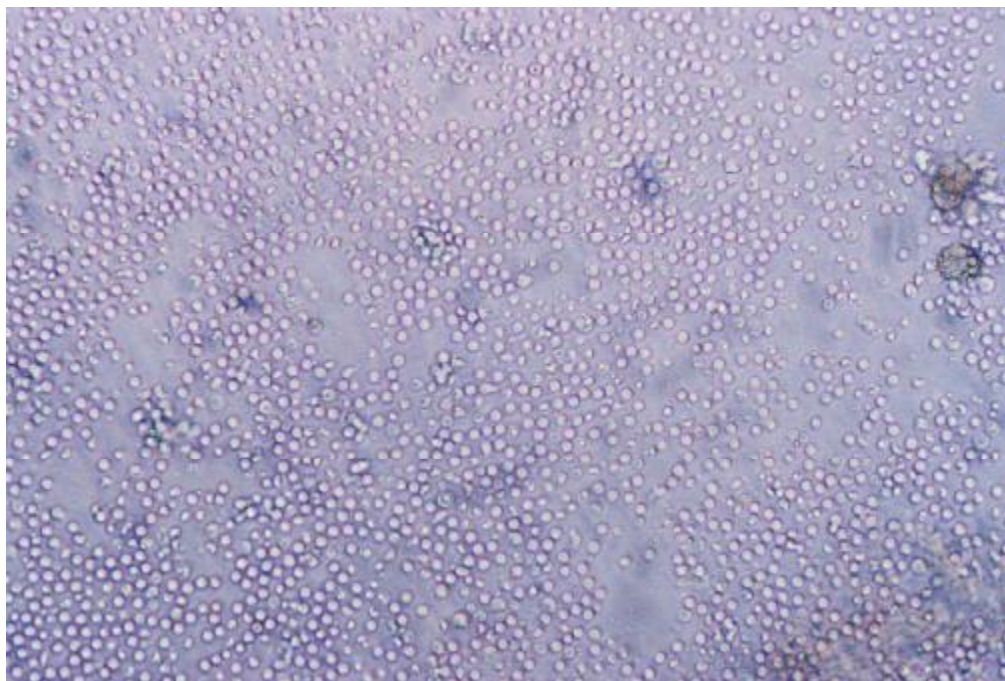


Figura 7 – Fotomicrografia representativa de linfócitos obtidos do linfonodo mesentérico de ratos não estimulados em cultivo de 66 horas. Aumento de 400 x.

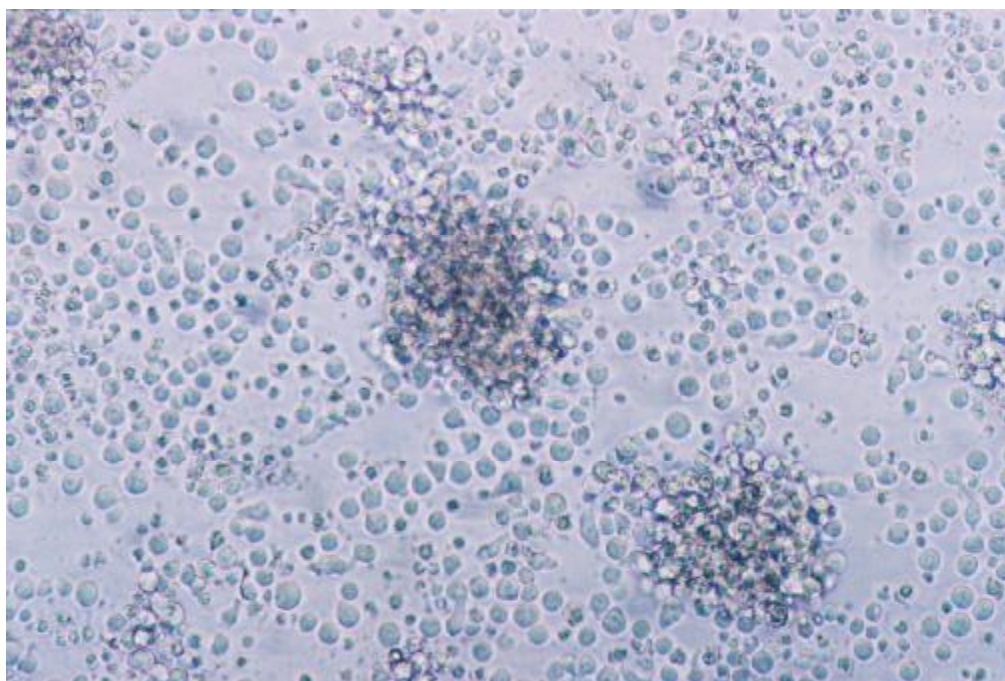


Figura 8 – Fotomicrografia representativa de linfócitos obtidos do linfonodo mesentérico obtidos do linfonodo mesentérico estimulados com Concanavalina A em cultivo de 66 horas. Aumento de 400 x.

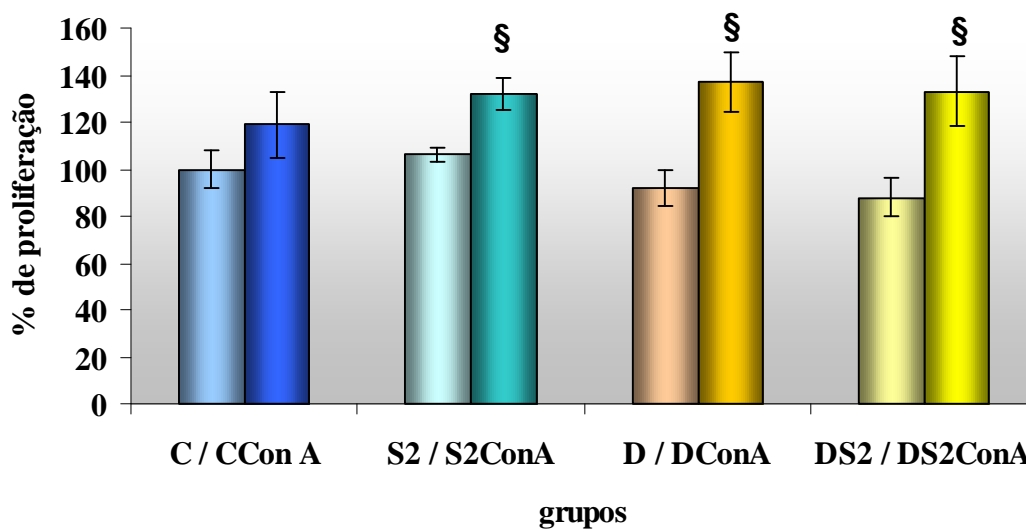


Figura 9 – Proliferação de linfócitos após 48 horas de cultivo. Grupos: controle (C), suplementado com 2g de lecitina de soja/kg de peso corporal (S2), diabético (D), e diabético suplementado com 2g de lecitina de soja/kg de peso corporal (DS2) estimulados ou não com Concanavalina A. Os valores referem-se à porcentagem em relação ao grupo controle não estimulado (100%) e estão expressos como média \pm EPM de quadruplicatas de 4 experimentos diferentes.

§ diferença estatística quando comparado ao respectivo grupo não-estimulado ($P < 0,05$).

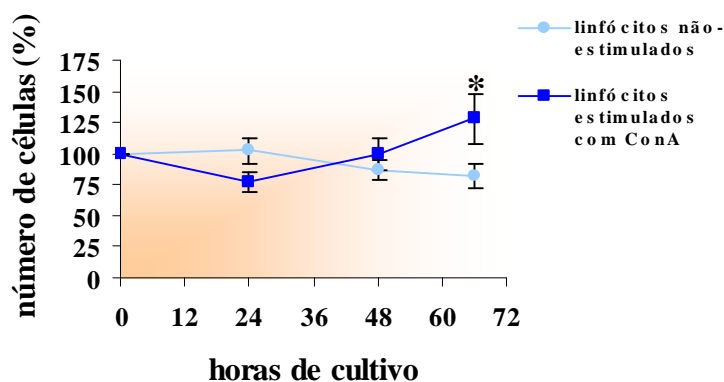


Figura 10 – Número de linfócitos não estimulados e estimulados com Concanavalina A, em 0, 24, 48 e 66 horas de cultivo. Valores apresentados em porcentagem, considerando o número de células na 0 hora como 100%. Valores expressos como média \pm EPM de 4 experimentos diferentes.

* diferença estatística quando comparado aos linfócitos não estimulados ($P < 0,05$).

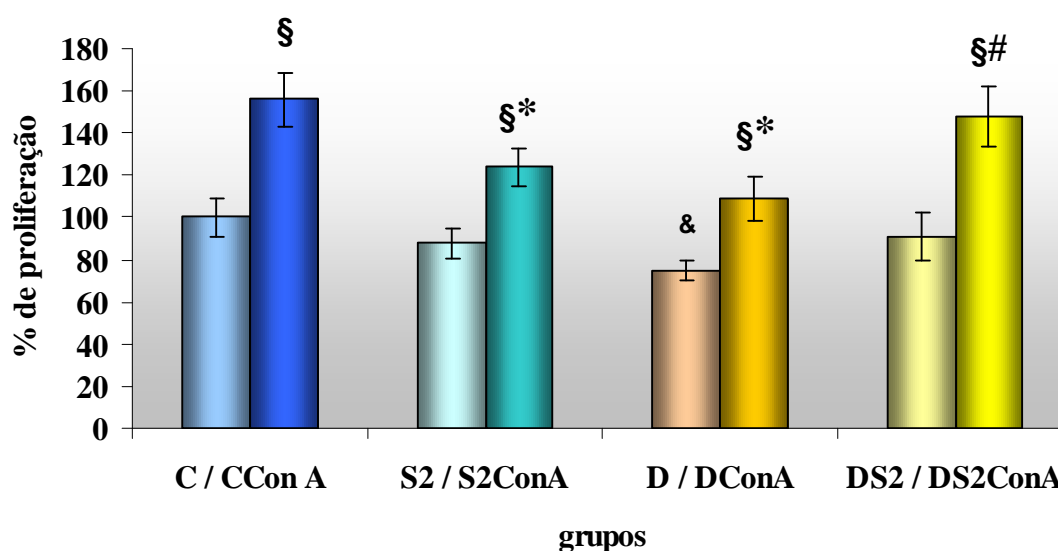


Figura 11 – Proliferação de linfócitos após 66 horas de cultivo. Grupos: controle (C), suplementado com 2g de lecitina de soja/kg de peso corporal (S2), diabético (D), e diabético suplementado com 2g de lecitina de soja/kg de peso corporal (DS2) estimulados ou não com Concanavalina A. Os valores referem-se à porcentagem em relação ao grupo controle não estimulado (100%) e estão expressos como média \pm EPM de quadruplicatas de 4 experimentos diferentes.

§ diferença estatística quando comparado ao respectivo grupo não-estimulado ($P < 0,05$).

* diferença estatística quando comparado ao grupo CConA ($P < 0,05$).

diferença estatística quando comparado ao grupo DConA ($P < 0,05$).

& diferença estatística quando comparada ao grupo C ($P < 0,05$).

4.7. Peso dos tecidos

Os dados de peso do fígado, baço e timo dos animais estão apresentados na Tabela 6. O baço e o timo dos grupos D e DS2 apresentaram peso absoluto significativamente menor quando comparados com o dos animais controle. Não houve diferença estatística entre o peso absoluto do fígado entre os grupos. A suplementação com lecitina de soja não modificou esses parâmetros. Os pesos relativos dos tecidos estão apresentados na Tabela 7. Nos grupos D e DS2 o peso relativo do timo foi significativamente menor que em relação ao controle, o que não aconteceu com o peso relativo do baço. Já o peso relativo do fígado nos grupos D e

DS2 foi significativamente maior em comparação com o do controle. Os pesos relativos não foram alterados pela suplementação com lecitina de soja.

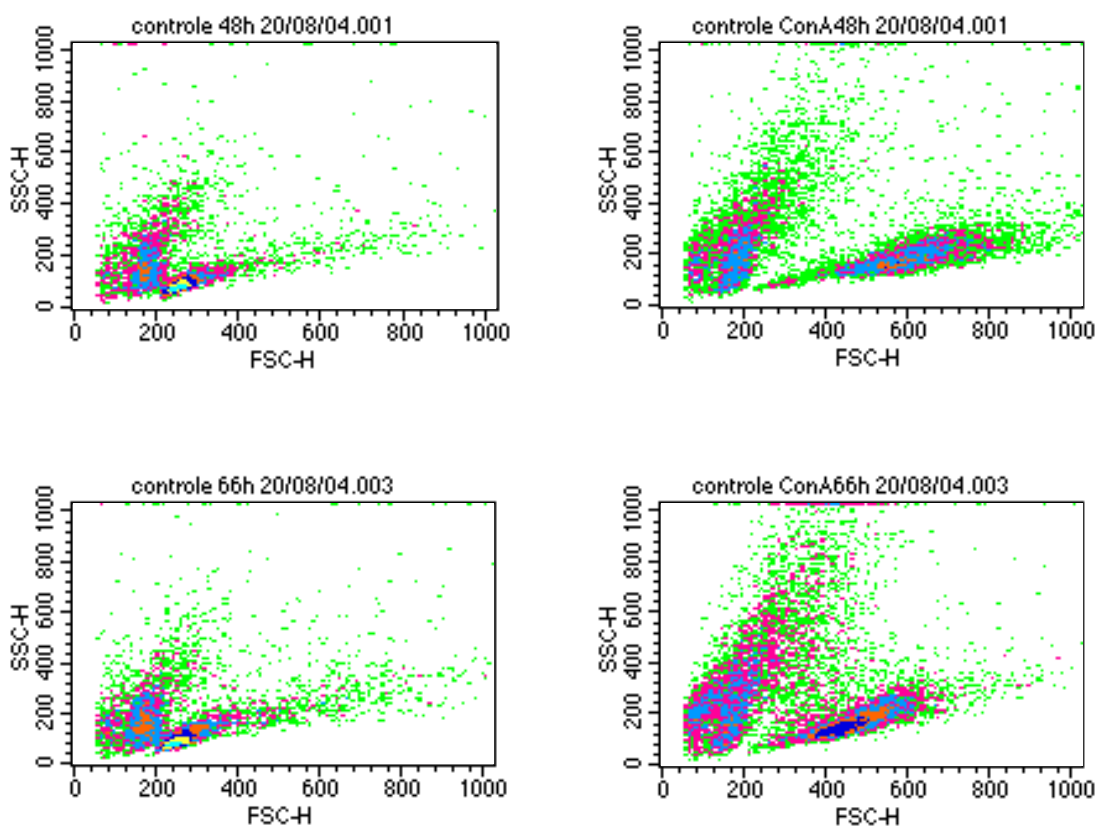


Figura 12 – Representação esquemática do número de linfócitos (adquiridos em 30 segundos no citômetro de fluxo) não estimulados e estimulados com Concanavalina A dos animais do grupo C, após 48 e 66 horas de cultivo. O eixo das abscissas refere-se ao tamanho das células (FSC-H) e o eixo das ordenadas refere-se à granulosidade (SSC-H) das células. Os valores das escalas são arbitrários.

	TG no fígado	COL no fígado	TG no baço	COL no baço	TG no timo	COL no timo
C	4,62 ± 0,46 (n = 13)	2,05 ± 0,28 (n = 19)	0,96 ± 0,24 (n = 13)	3,19 ± 0,19 (n = 19)	4,80 ± 1,20 (n = 13)	1,69 ± 0,12 (n = 19)
S1	3,59 ± 2,01 (n = 5)	1,94 ± 0,20 (n = 5)	0,91 ± 0,56 (n = 4)	3,69 ± 0,18 (n = 4)	6,87 ± 0,65 (n = 2)	1,37 ± 0,37 (n = 4)
S2	4,27 ± 0,47 (n = 11)	2,26 ± 0,25 (n = 19)	0,84 ± 0,09 (n = 15)	3,26 ± 0,28 (n = 19)	5,23 ± 1,29 (n = 8)	2,14 ± 0,21 (n = 16)
D	3,46 ± 0,53 (n = 12)	2,34 ± 0,46 (n = 11)	0,78 ± 0,08 (n = 12)	3,23 ± 0,42 (n = 11)	7,33 ± 1,27 (n = 4)	1,04 ± 0,36 (n = 2)
DS1	3,42 ± 0,43 (n = 5)	2,08 ± 0,18 (n = 5)	0,92 ± 0,68 (n = 5)	2,86 ± 0,51 (n = 8)	8,95 ± 0,43 (n = 2)	1,90 ± 0,89 (n = 2)
DS2	3,27 ± 0,64 (n = 12)	2,19 ± 0,46 (n = 11)	0,60 ± 0,05 (n = 12)	3,10 ± 0,44 (n = 11)	6,83 ± 1,42 (n = 6)	1,03 ± 0,31 (n = 3)

Tabela 3 – Triacilgliceróis e colesterol total no fígado baço e timo dos grupos controle (C), suplementado com 1g (S1), suplementado com 2g (S2), diabético (D), diabético suplementado com 1g (DS1) e diabético suplementado com 2g (DS2) de lecitina de soja/kg de peso corporal (em mg/g de tecido). Valores de média ± EPM.

GRUPO	FL no soro	FL no fígado	FL no baço	FL no timo
C	4,492 ± 1,379 (n = 7)	0,216 ± 0,041 (n = 16)	0,062 ± 0,003 (n = 16)	0,093 ± 0,004 (n = 12)
S1	3,177 ± 1,118 (n = 7)	0,133 ± 0,049 (n = 8)	0,050 ± 0,013 (n = 5)	0,055 ± 0,015 (n = 6)
S2	4,466 ± 1,129 (n = 9)	0,197 ± 0,043 (n = 15)	0,052 ± 0,005 (n = 16)	0,084 ± 0,006 (n = 13)
D	3,422 ± 0,968 (n = 9)	0,182 ± 0,034 (n = 12)	0,060 ± 0,005 (n = 12)	0,087 ± 0,011 (n = 4)
DS1	3,501 ± 1,563 (n = 5)	0,142 ± 0,055 (n = 8)	0,054 ± 0,009 (n = 5)	0,073 ± 0,017 (n = 7)
DS2	4,228 ± 0,907 (n = 9)	0,165 ± 0,035 (n = 12)	0,063 ± 0,006 (n = 12)	0,087 ± 0,024 (n = 6)

Tabela 4 – Fosfolipídios (FL) do soro, do fígado, do baço e do timo dos grupos controle (C), suplementado com 1g (S1), suplementado com 2g (S2), diabético (D), diabético suplementado com 1g (DS1) e diabético suplementado com 2g (DS2) de lecitina de soja/kg de peso corporal (em mg/g de tecido). Valores de média ± EPM.

GRUPO	FL nos macrófagos	FL nos linfócitos
C	0,20 ± 0,05	0,20 ± 0,04
S1	0,21 ± 0,04	0,19 ± 0,04
S2	0,23 ± 0,05	0,20 ± 0,04
D	0,19 ± 0,01	0,12 ± 0,03
DS1	0,16 ± 0,03	0,15 ± 0,03
DS2	0,22 ± 0,02	0,10 ± 0,03

Tabela 5 – Fosfolipídios (FL) de macrófagos e linfócitos dos grupos controle (C), suplementado com 1g (S1), suplementado com 2g (S2), diabético (D), diabético suplementado com 1g (DS1) e diabético suplementado com 2g (DS2) de lecitina de soja/kg de peso corporal (em $\mu\text{mol}/10^7$ células). Valores de média \pm EPM de 16 determinações.

GRUPO	fígado	baço	timo
C	8,67 ± 0,34	0,72 ± 0,09	0,37 ± 0,01
S2	8,89 ± 0,26	0,61 ± 0,05	0,33 ± 0,02
D	8,12 ± 0,26	0,47 ± 0,03*	0,15 ± 0,02*
DS2	7,47 ± 0,23	0,37 ± 0,06*	0,13 ± 0,03*

Tabela 6 – Peso absoluto em gramas do timo dos grupos controle (C), suplementado com 2g/kg de peso corporal (S2), diabético (D) e diabético suplementado com 2g/kg de peso corporal (DS2). Valores de média \pm EPM de 12 animais de cada grupo.

* diferença estatística em relação ao grupo C ($P < 0,05$).

GRUPO	fígado	Baço	timo
C	3,34 ± 0,08	0,27 ± 0,03	0,14 ± 0,01
S2	3,53 ± 0,09	0,29 ± 0,06	0,13 ± 0,01
D	4,06 ± 0,08*	0,30 ± 0,05	0,08 ± 0,01*
DS2	3,94 ± 0,06*	0,20 ± 0,03	0,07 ± 0,01*

Tabela 7 – Peso relativo (% em relação ao peso corporal total) do fígado, baço e timo dos grupos controle (C), suplementado com 2g/kg de peso corporal (S2), diabético (D) e diabético suplementado com 2g/kg de peso corporal (DS2). Valores de média \pm EPM de 12 animais de cada grupo.

* diferença estatística em relação ao grupo C ($P < 0,05$).

4.8. Número de leucócitos do sangue e contagem diferencial

O número de leucócitos/mm³ está apresentado na Tabela 8 e a contagem de linfócitos, bastonetes, segmentados e monócitos na Tabela 9. O número total de leucócitos não foi diferente entre os grupos. Na contagem diferencial observa-se uma diminuição de linfócitos do grupo diabético em relação ao controle e aumento de segmentados.

GRUPO	leucócitos/mm ³ de sangue
C	9788 ± 1304
S2	9525 ± 1252
D	6133 ± 994
DS2	6700 ± 844

Tabela 8 – Número de leucócitos/mm³ de sangue dos animais dos grupos controle (C), suplementado com 2g/kg de peso corporal (S2), diabético (D) e diabético suplementado com 2g/kg de peso corporal (DS2). Valores de média ± EPM de 8 animais do grupo C, 8 do S2, 3 do D, 4 do DS2 cada grupo.

GRUPO	linfócitos	bastonetes	segmentados	monócitos
C	65 ± 1	9 ± 2	22 ± 3	4 ± 1
S2	62 ± 2	7 ± 2	26 ± 2	5 ± 1
D	47 ± 6*	9 ± 2	40 ± 5*	4 ± 1
DS2	55 ± 7	7 ± 2	34 ± 4*	4 ± 1

Tabela 9 – Contagem diferencial de leucócitos dos animais dos grupos controle (C), suplementado com 2g/kg de peso corporal (S2), diabético (D) e diabético suplementado com 2g/kg de peso corporal (DS2). Valores de média ± EPM de 8 animais do grupo C, 8 do S2, 6 do D, 4 do DS2 cada grupo.

* diferença estatística em relação ao grupo C ($P < 0,05$).

5. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou os efeitos da suplementação da dieta de ratos Wistar diabéticos e não diabéticos com lecitina de soja sobre funções de células do sistema imunitário e sobre as concentrações de lipídios no plasma, fígado e tecidos linfóides. Estudos da administração de lecitina de soja na dieta tanto em animais experimentais quanto em humanos têm enfatizado principalmente suas propriedades redutoras de lipídios plasmáticos (WILSON; MESERVEY; NICOLSI, 1998; POLICHETTI *et al*, 2000; MASTELLONE *et al*, 2000; LE BLANC *et al*, 2003; MEDIC *et al*, 2003). Adicionalmente a lecitina promove modificações no metabolismo das lipoproteínas (WILLIAMS; WERTH; WOLF, 1984; MARTINS; LENZO; REDGRAVE, 1989; JIMENEZ *et al*, 1990) e da atividade de enzimas envolvidas na transferência de lipídios, além de aumento da secreção biliar de colesterol e diminuição da absorção de colesterol da dieta (POLICHETT *et al*, 2000; LE BLANC *et al*, 2003; MASTELLONE *et al*, 2000).

Os animais diabéticos induzidos por aloxana apresentam hipoglicemia transitória devido à elevação aguda da concentração de insulina em decorrência da destruição das células β -pancreáticas pela aloxana (LENZEN; PANTEN, 1988; WEEKERS *et al*, 2003), seguida por hiperglicemia e hipoinsulinemia, estabelecida após 24 - 48 horas. A concentração sérica de glicose nos animais diabéticos se apresentou elevada em relação à dos animais do grupo controle durante todo o período experimental (Tabela 1) e a suplementação com lecitina de soja não foi capaz de diminuir a glicemia. Não existem relatos sobre modificações na concentração de glicose pela suplementação com lecitina. A deficiência de insulina influencia o metabolismo de lipídios, sendo que indivíduos diabéticos apresentam dislipidemias (STEWART; LAKER; ALBERTI, 1994; STEINER, 2001). Neste estudo, o grupo de animais diabéticos não apresentou diferenças na lipidemia em relação ao grupo controle. Esse dado possivelmente explica o fato de a suplementação da dieta com lecitina de soja não ter causado alterações significativas nas concentrações séricas de triacilgliceróis e colesterol (Tabelas 1 e

2). De fato, estudos demonstram que a diminuição de lipídios plasmáticos pela utilização da lecitina é observada apenas quando há hiperlipidemia, e não em estados normolipidêmicos (WILSON; MESERVEY; NICOLOSI, 1998). Outra possibilidade seria o fato do tempo de suplementação ser curto para causar tais alterações, já que em outros estudos a suplementação é realizada por períodos mais longos.

A suplementação da dieta com lecitina de soja alterou as funções de células do sistema imunitário, independentemente de modificações significativas nas concentrações séricas de colesterol e triacilgliceróis. A capacidade fagocitária de macrófagos e a proliferação de linfócitos foram influenciadas pela adição de lecitina à dieta. É importante ressaltar que a suplementação foi realizada por um período curto de tempo (7 dias) e foi observado um aumento de 29% na capacidade fagocitária (Figura 4). Esses efeitos podem resultar da alta incorporação de fosfatidilcolina pelos macrófagos, assim como foi demonstrado previamente *in vitro* (NISHIYAMA-NARUKE; CURI, 2000). A incorporação de lipídios influencia a capacidade fagocitária através de modificações na fluidez de membrana, na função de receptores e na transdução de sinais intracelulares (CALDER *et al*, 1990). Os resultados da fagocitose neste estudo indicam que os efeitos são dependentes da dose (Figuras 4) assim como os observados na presença de outros lipídios tais como ácido linoleico (TRICON *et al*, 2004), ácido γ -linolênico (PETERSON; THIES; CALDER, 1999; KAKU *et al*, 2001), ácido eicosapentaenóico (KEW *et al*, 2003), ácido araquidônico (POMPÉIA; CURY-BOAVENTURA; CURI, 2003) sobre as funções de células imunitárias. Durante a fagocitose ocorre a liberação de ácido araquidônico a partir dos fosfolipídios pela ação da fosfolipase A₂ citossólica (GIROTTI *et al*, 2004). Este é um dos primeiros eventos que seguem a estimulação de macrófagos (BALSINDE *et al*, 1992), levando à produção de eicosanóides. Assim, além dos conhecidos efeitos biológicos diretos dos ácidos graxos sobre as funções de macrófagos, o ácido linoleico, principal ácido graxo contido na lecitina de soja, poderia influenciar indiretamente a fagocitose através da formação e liberação de ácido araquidônico.

A significativa redução na capacidade fagocitária dos animais diabéticos, quando comparada à do controle (Figura 4), corrobora com estudos que demonstram que as respostas imunitárias mediadas por células estão diminuídas em diabéticos (PTAK *et al*, 1998; LOFFREDA *et al*, 1998; LIU *et al*, 1999; LLORENTE *et al*, 2000; ZYKOVA *et al*, 2000; OLUBADEWO; SPITZER, 2003; WEEKERS *et al*, 2003). Possíveis explicações para esse fenômeno são as alterações metabólicas e o estresse oxidativo. A deficiência de insulina reduz a conversão de ácido linoleico a ácido araquidônico pela inibição da atividade das enzimas $\Delta 6$ -desaturase e $\Delta 5$ -desaturase (HOLMAN *et al*, 1983; BROWN; LINDSAY; RIEMERSMA, 2000; BRENNER, 2003). A síntese e liberação de ácido araquidônico e conseqüentemente a produção de eicosanóides estão prejudicadas em diabéticos (CHO; NAKAMURA; CLARKE, 1999; TSIMARATOS *et al*, 2001). Como os ácidos graxos essenciais têm papel fundamental na função de macrófagos (LEFKOWITH *et al*, 1991; POMPÉIA *et al*, 2000; CALDER, 2003), essas anormalidades no metabolismo poderiam estar relacionadas com a redução da fagocitose pelos macrófagos nos animais diabéticos. O desequilíbrio oxidativo-antioxidativo nos animais diabéticos (DOBRIAN *et al*, 1996; CERIELLO, 2003; CHUNG *et al*, 2003; GOUTY *et al*, 2003; KIL *et al*, 2004; MENON *et al*, 2004) facilita a oxidação das cadeias de ácidos graxos poliinsaturados dos fosfolipídios de membrana dos macrófagos, alterando a funcionalidade dessas células nos animais diabéticos. Considerando a suplementação da dieta dos animais diabéticos com lecitina de soja e a conseqüente incorporação de fosfatidilcolina, também é relevante mencionar que a oxidação da fosfatidilcolina gera moléculas PAF-like, que podem atuar nas células da mesma forma que o PAF, sendo capazes de ativar células que apresentam receptor para PAF (PATEL *et al*, 1992; McINTYRE; ZIMMERMAN; PRESCOTT, 1999), mediando respostas imunitárias. Em macrófagos, o PAF estimula o *burst* oxidativo, a liberação de ácido araquidônico e seus metabólitos (prostaglandina E e tromboxano B2) e o espraiamento (RANDRIAMAMPITA; TRAUTMANN, 1989). Outros estudos já demonstraram

que esse mediador inflamatório (PAF) altera a fagocitose pelos macrófagos de modo dose-dependente (ICHINOSE *et al*, 1994).

A fagocitose faz parte da resposta imunitária inata e um prejuízo nessa função pode contribuir para a prevalência de infecções aumentadas em diabéticos (GEERLINGS; HOEPELMAN, 1999; LLORENTE *et al*, 2000). Neste trabalho, a suplementação com lecitina (1g/kg de peso corporal) modificou a função de macrófagos nos animais diabéticos, aumentando sua capacidade fagocitária, o que certamente representa um benefício para sua resposta imunitária. No entanto, deve ser levado em consideração que macrófagos também participam nas respostas inflamatórias envolvidas nos processos de aterosclerose (OSTERUD; BJORKLID, 2003; OSIECKI, 2004). Possivelmente, um aumento na capacidade fagocitária de macrófagos tenha implicações nesses processos. Além disso, outras funções importantes para a atividade microbicida dos macrófagos poderiam ser modificadas pela fosfatidilcolina, como a produção de espécies reativas de oxigênio e espécies de nitrogênio, a adesão e o espraiamento. Estudos da adição de outros lipídios *in vivo* (YAQOUB; CALDER, 1995; MILES; WALLACE; CALDER, 1999) e *in vitro* também já demonstraram alterações sobre essas funções (CALDER, 1990; POMPÉIA *et al*, 2003), as quais, no caso de doenças crônicas inflamatórias, podem ser deletérias ao organismo (POMPÉIA *et al*, 2000; CATHCART, 2004; OSIECKI, 2004). Posteriormente, essa hipótese deve ser testada.

A interação entre macrófagos e linfócitos é um evento importante para a resposta imunitária (LUCEY; CLERICI; SHEARER, 1996) e a transferência de lipídios entre essas células constitui um mecanismo de modulação das suas funções (PERES *et al*, 1997; HOMEM DE BITTENCOURT JÚNIOR; CURI, 1998). Em estudos prévios foi demonstrado que a fosfatidilcolina é transferida de macrófagos para linfócitos resultando em modulação da função de linfócitos (NISHIYAMA-NARUKE; CURI, 2000). Sobretudo, um efeito direto da fosfatidilcolina sobre a proliferação de linfócitos e produção de citocinas *in vitro* foi demonstrado (NISHIYAMA *et al*, 2001). Considerando a relevância dos linfócitos na resposta imunitária e os estudos *in vitro* mencionados acima, os efeitos da suplementação da

dieta com lecitina de soja no metabolismo e proliferação de linfócitos foram investigados.

A produção de formazan (MTT no estado reduzido), a qual reflete a atividade de enzimas intracelulares (MOSMANN, 1983), aumentou significativamente nos linfócitos estimulados com concanavalina A (Figura 5). A estimulação dos linfócitos com esse mitógeno envolve a ativação de uma cascata complexa de reações bioquímicas, que promovem a entrada das células no ciclo celular, e os linfócitos quiescentes se transformam em linfoblastos metabolicamente ativos (DORN *et al*, 2002). É possível que o aumento da disponibilidade de ácido araquidônico ou de outros produtos resultantes da hidrólise de fosfatidilcolina esteja envolvido no metabolismo aumentado dos linfócitos do grupo de animais suplementados com 2g/kg de lecitina de soja (Figura 5). Os efeitos da suplementação da dieta com lecitina de soja sobre o metabolismo de linfócitos também foram dependentes da dose. Em contrapartida, a suplementação com lecitina de soja nos animais diabéticos não alterou a produção de formazan nos linfócitos estimulados cultivados por 48 horas (Figura 5). Assim, a adição de lecitina na dieta por um curto período de tempo aumentou significativamente o metabolismo de linfócitos estimulados (aproximadamente 1,8 vezes) na ausência do estado diabético. Esses resultados indicam que, sob condições patológicas, a lecitina de soja apresenta um efeito diferente sobre as células do sistema imunitário. Esse fato também pode ser fundamentado pelas diferenças evidentes observadas no perfil metabólico de linfócitos em resposta a ConA quando os grupos controle e diabéticos são comparados (Figura 5). O metabolismo dos linfócitos estimulados dos animais diabéticos aumentou 2,3 vezes em relação ao dos animais controle (Figura 5). OTTON, MENDONÇA e CURI (2002) demonstraram a redução do metabolismo de linfócitos em diabéticos pela determinação da atividade de enzimas envolvidas no metabolismo de glicose e glutamina. Embora os resultados pareçam controversos, o metabolismo, no presente estudo, foi mensurado através do ensaio da redução do MTT, que reflete a atividade das desidrogenases mitocondriais e enzimas relacionadas à ativação celular. O aumento da atividade metabólica dessas

células poderia refletir indiretamente a proliferação celular. No entanto, células estimuladas produzem mais formazan que células em repouso (MOSMANN, 1983), o que é compatível com um estado de ativação celular que não envolve necessariamente aumento de atividade proliferativa. De fato, foi demonstrado que o aumento da atividade mitocondrial é independente da síntese de DNA (WANG; ZHENG, 2002). Com base nesses dados, foi avaliado se o aumento na produção de formazan pelos linfócitos foi acompanhado de modificações no número de células. Não foram observadas alterações no número de células paralelas às do metabolismo (Figura 9). Como o mitógeno induz uma resposta proliferativa, esperava-se que o número de linfócitos estivesse aumentado; mas, particularmente no grupo controle, isso não ocorreu. Apesar disso, pôde-se constatar uma evidente alteração morfológica (tamanho e granulosidade) nas populações de linfócitos (Figura 12) (DORN *et al*, 2002). Assim, o período de 48 horas de cultivo não foi suficiente para a observação dos efeitos da suplementação com lecitina de soja sobre o aumento do número de linfócitos. Isso indica que os eventos metabólicos e a divisão celular ocorrem em diferentes períodos de tempo.

A partir desses resultados foi realizada uma curva de tempo *versus* número de linfócitos estimulados e não-estimulados. O aumento significativo no número de linfócitos (proliferação) foi observado apenas nas 66 horas de cultivo (Figura 10). Concomitantemente, alterações morfológicas qualitativas evidentes foram observadas (Figuras 7 e 8), tais como distribuição e tamanho das células. Nos gráficos de dispersão obtidos no citômetro de fluxo, observou-se, também em 66 horas, o aparecimento de uma população adicional de linfócitos apresentando maior tamanho e granulosidade (Figura 12) em relação ao grupo de linfócitos não-estimulados. Assim, a proliferação de linfócitos foi estimada após 66 horas de cultivo. Apesar do metabolismo de linfócitos aumentado inicialmente (Figura 5), a suplementação da dieta com lecitina de soja reduziu a capacidade proliferativa de linfócitos (Figura 11) nos animais não-diabéticos. Esses dados sugerem que o envolvimento da suplementação com lecitina de soja no metabolismo de linfócitos é independente dos mecanismos de proliferação. A redução da resposta proliferativa

está de acordo com estudos que mostram que a adição de fosfatidilcolina a linfócitos em cultivo resulta na inibição da proliferação celular (NISHIYAMA-NARUKE e CURI, 2000; NISHIYAMA *et al*, 2000). Muitos mecanismos podem estar envolvidos nos efeitos anti-proliferativos da fosfatidilcolina, como por exemplo, alteração da atividade de enzimas que participam da sinalização intracelular e diminuição da capacidade de linfócitos de produzir interleucina-2 (IL-2). Adicionalmente, assim como nos macrófagos, o ácido araquidônico, cujo precursor (ácido linolêico) é o principal ácido graxo presente na lecitina de soja, em altas concentrações reduz a proliferação de linfócitos (KELLY; PARKER, 1979; CALDER, 2002).

Nos animais diabéticos a proliferação de linfócitos estava reduzida em comparação com o grupo controle (Figura 11), embora inicialmente essas células tenham apresentado o metabolismo aumentado (Figura 5). Portanto, os linfócitos do grupo diabético podem ter apresentado maior atividade metabólica que os linfócitos do grupo C (Figura 5) devido ao aumento da atividade de enzimas não relacionadas à proliferação. A glutathione S-transferase tem a habilidade, assim como as desidrogenases mitocondriais, de reduzir o MTT *in vitro*, podendo influenciar os resultados do ensaio (YORK *et al*, 1998). A atividade da glutathione S-transferase já foi detectada em linfócitos cultivados estimulados (JONES *et al*, 1988). Essa enzima catalisa a conjugação da glutathione (DICKINSON; FORMAN, 2002), a qual tem importante papel para a defesa antioxidante (WU *et al*, 2004), a uma variedade de compostos eletrofílicos (STRANGE; JONES; FRYER, 2000) e poderia ter a atividade aumentada nos animais diabéticos, uma vez que o desequilíbrio oxidativo-antioxidativo contribui para a produção de compostos formados pela reação de espécies reativas de oxigênio (ROS) com lipídios poliinsaturados n-6 das membranas celulares (STRANGE; JONES; FRYER, 2000; MEGLI; SABATINI, 2003; ORZECOWSKI, 2003).

Outros estudos já demonstraram a redução da proliferação de linfócitos do linfonodo mesentérico de ratos diabéticos induzidos por aloxana, medida por meio da incorporação de timidina radioativa em DNA (OTTON *et al*, 2002). Além da

funcionalidade prejudicada, o número de linfócitos é menor devido à maior proporção de apoptose no estado diabético, tanto em animais como em humanos (OTTON *et al*, 2004). Corroborando esse dado, o presente estudo demonstrou menor número de linfócitos não-estimulados do grupo diabético quando comparado com o controle (Figura 11). Além da redução da capacidade proliferativa de linfócitos, os animais diabéticos tiveram o peso dos órgãos linfóides, como baço e timo, reduzidos (Tabela 6). A redução do peso dos tecidos linfóides já foi observada em animais diabéticos induzidos por aloxana (WEXLER; LUTMER, 1975; PTAK; CZARNICK; HANCZAKOWSKA, 1975). As altas concentrações de glicose sanguínea nos animais diabéticos (Tabela 3) ou muitos outros fatores, como, por exemplo, a ausência de insulina ou o aumento de corticosteróides (WEXLER e LUTMER, 1975; PTAK; CZARNICK; HANCZAKOWSKA, 1975; BALASUBRAMANIAN; HOFERT; HEDRICK, 1985), influenciam a redução do peso desses órgãos. No entanto, o peso relativo do baço nos animais diabéticos não foi diferente quando comparado com o dos animais controle (Tabela 7), sugerindo que a redução nesse órgão seja um reflexo da diminuição de peso generalizada nos animais diabéticos (Figura 1). Porém, o peso relativo do timo foi estatisticamente menor nos animais diabéticos (Tabela 7), o que sugere diminuição da proliferação das células desse tecido. As diferenças em relação à diminuição relativa de peso entre baço e timo nos animais diabéticos podem ser atribuídas a efeitos específicos sobre determinada população de células encontradas nos tecidos. O timo apresenta predominantemente linfócitos T, sensíveis à ação dos corticosteróides, e o baço além de linfócitos T apresenta grande quantidade de linfócitos B e macrófagos (ABBAS; LICHTMAN; POBER, 1995).

A redução do número de linfócitos no sangue no grupo de animais diabéticos também foi encontrada neste estudo. A linfopenia em animais diabéticos já foi relatada em outros estudos (JUNG; KAMIYAMA; AGUI, 1999; TANAKA *et al*, 2000), sendo explicada por aumento de apoptose de linfócitos T periféricos (JUNG; KAMIYAMA; AGUI, 1999).

A suplementação da dieta com lecitina de soja aumentou a capacidade

proliferativa de linfócitos nos animais diabéticos (Figura 11), demonstrando novamente que os efeitos da suplementação com lecitina de soja são diferentes entre animais não-diabéticos e diabéticos. Nesse caso, em razão do desbalanço oxidativo, também é relevante considerar a participação das moléculas oxidadas de fosfatidilcolina (*PAF-like*). Linfócitos apresentam receptores para PAF, o qual estimula sua proliferação (BEHRENS; GOODWIN, 1990). De fato, as moléculas *PAK-like* têm ação pro-inflamatória podendo ativar os linfócitos e alterar sua funcionalidade. Estudos demonstram que o *PAF-like* está envolvido na ativação de linfócitos (GRÄLER; GOETZL, 2002; FEI *et al*, 2003). Isso poderia explicar também porque nessas células a redução do MTT continuou aumentada após 66 horas de cultivo (Figura 6). O aumento do metabolismo dessas células pode ser decorrente da maior ativação causada por moléculas *PAF-like*. Além disso, nesse caso, em que a proliferação de linfócitos estava aumentada, a redução do MTT aumentada paralelamente pode ter maior influência do aumento do número de células.

Os valores de peso absoluto ou relativo dos órgãos linfóides estudados (baço e timo) não foram modificados pela suplementação com lecitina de soja (Tabelas 6 e 7). É provável que o curto período de suplementação não seja suficiente para alterações dessa magnitude, apesar do aumento da proliferação de linfócitos nos animais diabéticos suplementados. Além disso, os efeitos da suplementação com lecitina sobre a funcionalidade de linfócitos podem ser específicos para cada órgão linfóide, já que estes apresentam diferentes populações de linfócitos. Possivelmente, a incorporação de fosfatidilcolina é diferente entre vários órgãos, como demonstrado para outros lipídios (GUIMARÃES *et al*; 1995), contribuindo para respostas diferentes das células. Outros estudos devem ser realizados para avaliar os efeitos da lecitina na proliferação de linfócitos do baço e do timo.

A composição lipídica desses órgãos também não foi modificada (Tabelas 3 e 4). Em macrófagos peritoneais e linfócitos do linfonodo mesentérico, que apresentaram modificações na sua funcionalidade em resposta à suplementação com lecitina de soja, alterações no conteúdo de fosfolipídios também não foram

encontradas (Tabela 5). É possível que a suplementação da dieta com fosfatidilcolina influencie a composição de ácidos graxos da membrana dos tecidos, porém para detectar essas modificações, seria necessária a utilização de métodos mais sensíveis. Além disso, outros mecanismos podem estar envolvidos nas alterações sobre a funcionalidade de macrófagos e linfócitos, como a formação de moléculas bioativas a partir da fosfatidilcolina e modificações em microdomínios de membrana, alterando cascatas de sinalização intracelular.

O número de linfócitos do sangue dos animais diabéticos suplementados não foi diferente do encontrado nos animais controle (Tabela 9), o que pode significar uma tendência de melhora em relação à linfopenia encontrada nos animais diabéticos. No entanto, esse número também não foi diferente do dos animais diabéticos.

O conteúdo de lipídios do fígado também foi avaliado, uma vez que vários estudos sobre os efeitos da suplementação com lecitina de soja demonstraram redução das concentrações de triacilgliceróis e colesterol nesse órgão (MASTELLONE *et al*, 2000; LE BLANC *et al*, 2003). Os mesmos efeitos não foram observados no presente estudo (Tabela 3), o que pode estar relacionado com diferenças na dose e tempo de suplementação, ou ainda com a utilização de diferentes métodos de avaliação do conteúdo lipídico. Já o conteúdo de fosfolipídios do fígado permaneceu inalterado com a suplementação (Tabela 4), conforme demonstrado previamente (MASTELLONE *et al*, 2000). Com relação ao peso do fígado dos animais estudados, foi observado maior peso relativo do fígado nos animais diabéticos. Embora os mecanismos envolvidos não estejam esclarecidos, a hepatomegalia é freqüente em diabéticos (HERRMAN *et al*, 1999). A suplementação com lecitina de soja não apresentou efeitos sobre esse parâmetro.

O acréscimo na quantidade de gordura total na dieta com a suplementação com lecitina de soja não promoveu ganho excessivo de peso nos animais (Figura 3), o que seria indesejável. Portanto, no caso da utilização dessa suplementação com a finalidade de melhorar parâmetros imunitários ou reduzir as concentrações de lipídios plasmáticos, isso pode representar um efeito positivo.

Esses resultados em conjunto demonstram que a suplementação da dieta com lecitina de soja é capaz de modificar a funcionalidade de macrófagos e linfócitos. Portanto, a suplementação da dieta com lecitina de soja poderia ser importante na modulação das respostas imunitárias em diabéticos. Considerando que alterações nesses tipos celulares afetam o curso de respostas inflamatórias, que incluem os processos ateroscleróticos, são necessários mais estudos a respeito dessa suplementação. O entendimento dos mecanismos pelos quais a lecitina de soja modula essas funções pode fornecer estratégias eficazes de intervenção nutricional em condições patológicas.

6. CONCLUSÃO

A suplementação da dieta com lecitina de soja modifica, de modo dose-dependente, a proliferação de linfócitos e a capacidade fagocitária de macrófagos, indicando um efeito imunomodulador da fosfatidilcolina. Os efeitos sobre a funcionalidade das células imunitárias são independentes dos efeitos redutores de triacilgliceróis e colesterol plasmáticos.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia celular e molecular**. Rio de Janeiro: Revinter, 1995.

ALEYNIK, S. I.; LIEBER, C. S. Polyenylphosphatidylcholine corrects the alcohol-induced hepatic oxidative stress by restoring s-adenosylmethionine. **Alcohol Alcohol**, v. 38, n. 3, p. 208-212, 2003.

ALLARD, J. P. Other disease associations with non-alcoholic fatty liver disease. **Best Pract Res Clin Gastroenterol**, v. 16, p. 783-795, 2002.

ANDERSON, R.; DAVIS, S. An organic phosphorus assay which avoids the use of hazardous perchloric acid. **Clin Chim Acta**, v. 121, p. 111-116, 1982.

ARDAWI, M. S. M.; NEWSHOLME, E. A. Metabolism in lymphocytes and its importance in the immune response. **Essays Biochem**, v. 21, p. 1-44, 1985.

BALASUBRAMANIAN, R.; HOFERT, J. F.; HEDRICK, M. L. Suppressed proliferation of lymphatic tissue in diabetic and adrenalectomized-diabetic rats. **Immunopharmacology**, v. 10, p. 83-88, 1985.

BALSINDE, J.; FERNANDEZ, B.; SOLÍS-HERRUZO, J. A.; DIEZ, E. Pathways for arachidonic acid mobilization in zymosan-stimulated mouse peritoneal macrophages. **Biochem Biophys Acta**, v. 1136, p. 75-82, 1992.

BEHRENS, T. W.; GOODWIN, J. S. Control of human T cell proliferation by platelet-activating factor. **Int J Immunopharmacol**, v. 12, n. 2, p. 175-184, 1990.

BETTERIDGE, D. J. Diabetic dyslipidemia. **Am J Med**, v. 96, n. 6A, p. 25S-31S, 1994.

BETTERIDGE, D. J. The current management of diabetic dyslipidaemia. **Acta Diabetol**, v. 1, p. S15-S19, 2001.

BORGHANS, J. A.; NOEST, A. J.; BOER, R. J. How specific should immunological memory be? **J Immunol**, v. 163, n. 2, p. 569-575, 1999.

BRENNER, R. R. Hormonal modulation of delta 6 and delta 5 desaturases: case of diabetes. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 68, n. 2, p. 151-162, 2003.

BROWN, J. E.; LINDSAY, R. M.; RIEMERSMA, R. A. Linoleic acid metabolism in the spontaneously diabetic rat: delta 6 desaturase activity vs product/precursor ratios. **Lipids**, v. 35, n. 12, p. 1319-1323, 2000.

BROWN, W. V.; Lipoprotein disorders in diabetes mellitus. **Med Clin North Am**, v. 78, n. 1, p. 143-161, 1994.

BUCHMAN, A. L.; DUBIN, M.; JENDEN, D.; MOUKARZEL, A.; ROCH, M. H.; RICE, K.; GORNBEIN, J.; AMENT, M. E.; ECKHERT, C.D. Lecithin increases plasma free choline and decreases hepatic steatosis in long-term total parenteral nutrition patients. **Gastroenterology**, v. 102, n. 4, p. 1363-1370, 1992.

BUCHMAN, A. L.; SOHEL, M.; BROWN, M.; JENDEN, D. J.; AHN, C.; BRWLEY, T. L. Verbal and visual memory improve after choline supplementation in long-term total parenteral nutrition: a pilot study. **J Parenter Enteral Nutr**, v. 25, n. 1, p. 30-35, 2001.

CALDER, P. C. Long-chain n-3 fatty acids and inflammation: potential application in surgical and trauma patients. **Braz J Med Biol Res**, v. 36, n. 4, p. 433-446, 2003.

CALDER, P. C.; BOND, J. A.; HARVEY, D. J.; GORDON, S.; NEWSHOLME, E. A. Uptake and incorporation of saturated and unsaturated fatty acids into macrophage lipids and their effect upon macrophage adhesion and phagocytosis. **Biochem J**, v. 269, p. 807-814, 1990.

CALDER, P. C.; BEVAN, S. J., NEWSHOLME, E. A. The inhibition of T-lymphocyte proliferation by fatty acids is via an eicosanoid-independent mechanism. **Immunology**, v. 75, p. 108-115, 1992.

CALDER, P. C. Dietary fatty acids and lymphocyte functions. **Proc Nutr Soc**, v. 247, p. 487-502, 1998a.

CALDER, P. C. Fat chance of immunomodulation. **Immunol Today**, v. 19, n. 6, p. 244-247, 1998b.

CALDER, P. C. Fatty acids and lymphocyte functions. **Br J Nutr**, v. 87, n. 1, p. S31-S48, 2002.

CALDER, P. C. N-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity: pouring oil on trouble waters or another fishy tale? **Nutr Res**, v. 21, p. 309-341, 2001a.

CALDER, P. C. The ratio of n-6 to n-3 fatty acids in the diet: impact on T lymphocytes function. **Eur J Lipid Sci Technol**, v. 103, p. 390-398, 2001b.

CATHCART, M. K. Regulation of superoxide anion production by NADPH oxidase in monocytes/macrophages: contributions to atherosclerosis. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, v. 24, n. 1, p. 23-28, 2004.

CERIELLO, A. New Insights on Oxidative Stress and Diabetic Complications May Lead to a “Causal” Antioxidant Therapy. **Diabetes Care**, v. 26, p. 1589–1596, 2003.

CHO, H. P.; NAKAMURA, M.; CLARKE, S. D. Cloning, expression and fatty acid regulation of the human Δ -5 desaturase. **J Biol Chem**, v. 274, n. 52, p. 37335-37339, 1999.

CHUNG, S. S. M.; HO, E. C. M.; LAM, K. S. L.; CHUNG, S. K. Contribution of Polyol Pathway to Diabetes-Induced Oxidative Stress. **J Am Soc Nephrol**, v. 14, p. S233–S236, 2003.

COURRÈGES, M. C.; BENENCIA, F.; UCEDA, A.; MONSERRAT, A. J. Effect of dietary choline deficiency on immunocompetence in wistar rats. **Nutr Res**, v. 23, p. 519-526, 2003.

CUI, Z.; HOUWELING, M. Phosphatidylcholine and cell death. **Biochem Biophys Acta**, v. 1585, p. 87-96, 2002.

DICKINSON, D. A.; FORMAN, H. J. Cellular glutathione and thiols metabolism. **Biochem Pharmacol**, v. 64, p. 1019-1026, 2002.

DE DECKERE, E. A M.; VERPLANKE, C. J.; BLENK, C. G.; NICKEN, W. G. L. Effects of type and amount of dietary fat on rabbit and rat lymphocyte proliferation in vitro. **J Nutr**, v. 118, p. 11-18, 1988.

DE PABLO, M. A. Immune cell functions, lipids and host natural resistance. **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 29, p. 323-328, 2000.

DOBRIAN, A.; LAZAR, V.; TIRZIU, D.; SIMIONESCU, M. Increased macrophage uptake of irreversibly glycated albumin modified-low density lipoprotein of normal and diabetic subjects is mediated by non-saturable mechanisms. **Biochem Biophys Acta**, v. 1317, p. 5-14, 1996.

DORN, A. D.; WATERS, W. R.; BYERSM, V. M.; PESCH, B. A.; WANNEMUEHLER, M. J. Characterization of mitogen-stimulated porcine lymphocytes using a stable fluorescent dye (PKH2) and multicolor flow cytometry. **Vet Immunol Immunopathol**, v. 87, p. 1-10, 2002.

EXTON, J. H. Phosphatidylcholine breakdown and signal transduction. **Biochem Biophys Acta**, v. 1212, p. 26-42, 1994.

FEI, G. Z.; HUANG, Y. H.; SWEDENBORG, J.; FROSTENGARD, J. Oxidised LDL modulates immune activation by an IL-12 dependent mechanism. **Atherosclerosis**, v. 169, p. 77-85, 2003.

FOLCH, J. M. L.; STANLEY, G. H. S. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. **J Biol Chem**, v. 226, p. 497-509, 1957.

FRIEDEWALD, W. T.; LEVY, R. I.; FREDRICKSON, D. S. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without the use of preparatory ultracentrifugation. **Clin Chem**, v. 18, p. 499-502, 1972.

GARBER, A. J.; KARLSSON, F. O. Treatment of dyslipidemia in diabetes. **Endocrinol Metab Clin North Am**, v. 30, n. 4, p. 999-1010, 2001.

GARBER, A. J. Implications of cardiovascular risk in patients with type 2 diabetes who have abnormal lipid profiles: is lower enough? **Diabetes Obes Metab**, v. 2, p. 263-70, 2000.

GEERLINGS, S. E.; HOEPELMAN, A. I. M. Immune dysfunction in patients with diabetes mellitus (DM). **FEMS Immunol Med Microbiol**, v. 26, p. 259-265, 1999.

GIROTTI, M.; EVANS, J. H.; BURKE, D.; LESLIE, C. C. Cytosolic phospholipase A2 translocates to forming phagosomes during phagocytosis of zymosan in macrophages. **J Biol Chem**, v. 279, n. 18, p. 19113-19121, 2004.

GOUTY, S.; REGALIA, J.; CAI, F.; HELKE, C. J. α -lipoic acid treatment prevents the diabetes induced attenuation of the afferent limb of the baroreceptor reflex in rats. **Autonom Neurosci**, v. 108, p. 32-44, 2003.

GRÄLER, M. H.; GOETZL, E. J. Lysophospholipids and their G-protein coupled receptors in inflammation and immunity. **Biochem Biophys Acta**, v. 1582, p. 168-174, 2002.

GRANGER, D. N.; KUBES, P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. **J Leukoc Biol**, v. 55, p. 662-675, 1994.

GUIMARÃES, A. R. P.; KUGA, E.; TORRES, R. P.; COLQUHOUN, A.; CURI, R.; MANCINI FILHO, J. Composition of fatty acids in the liver and lymphoid organs of rats fed fatty acid-rich diets. **Biochem Mol Biol Int**, v. 36, n. 2, p. 451-461, 1995.

HAFFNER, S. M. Diabetes dyslipidemia and coronary artery disease. **Am J Cardiol**, v. 83, n. 9B, p. 17F-21F, 1999.

HARWOOD, J. L. Lipid metabolism. In: **The lipid handbook**. Eds. Gungstone, F.D.; Harwood, J.L.; Padley, F.B. 2nd edition. Chapman & Hall. London, 1994.

HAYASHI, H.; TANAKA, Y.; HIBINO, H.; UMEDA, Y.; KAWAMITSU, H.; FUJIMOTO, H.; AMAKAWA, T. Beneficial effect of salmon roe

phosphatidylcholine in chronic liver disease. **Curr Med Res Opin**, v. 15, n. 3, p. 177-84, 1999.

HERRMAN, C. E.; SUNDEERS, R. A.; KLAUNIG, J. E.; SCHUWARZ, L. R.; WATKINS, J. B. Decreased apoptosis as a mechanism for hepatomegaly in streptozotocin-induced diabetic rats. **Toxicol Sci**, v. 50, p. 146-151, 1999.

HIRANO, T.; MAMO, J. C.; TAKEUCHI, H.; NAGANO, S.; TAKAHASHI, T. Correlation of insulin deficiency and hypertriglyceridemia in diabetic rats. **Diabetes Res Clin Pract**, v. 12, n. 3, p. 173-180, 1991.

HOLMAN, R. T.; JOHNSON, S. B.; GERRARD, J. M.; MAUER, S. M., KUPCHOSANDBERG, S.; BROWN, D. M. Arachidonic acid deficiency in streptozotocin-induced diabetes. **Proc Natl Acad Sci**, v. 80, p. 2375-2379, 1983.

HOLMES-McNARY, M. Q.; LOY, R.; MAR, M. H.; ALBRIGHT, C. D.; ZEIZEL, S. H. Apoptosis is induced by choline deficiency in fetal brain and in PC12 cells. **Dev Brain Res**, v. 101, p. 9-16, 1997.

HOMEM DE BITTENCOURT JUNIOR, P. I.; CURI, R. Transfer of cholesterol from macrophages to lymphocytes in culture. **Biochem Mol Biol Int**, v. 44, n. 2, p. 347-362, 1998.

ICHINOSE, M.; HARA, N.; SAWADA, M.; MAENO, T. A flow cytometric assay reveals an enhancement of phagocytosis by platelet activating factor in murine peritoneal macrophages. **Cell Immunol**, v. 156, p. 508-518, 1994.

IHARA, M.; UMEKAWA, H.; TAKAHASHI, T.; FRUICHI, Y. Comparative effects of short- and long-term feeding of safflower oil and perilla oil on lipid metabolism in rats. **Comp Biochem Phys B**, v. 121, p. 223-231, 1998.

INUI, K.; FUKUTA, Y.; IKEDA, A.; KAMEDA, H.; KOKUBA, Y.; SATO, M. The effect of α -linolenic acid-rich emulsion on fatty acid metabolism and leukotriene generation of the colon in a rat model with inflammatory bowel disease. **Ann Nutr Metab**, v. 40, p. 175-182, 1996.

ISHIDA, T.; KOBAYASHI, K.; SUGANO, M.; IMAIZUMI, K.; WATANABE, S.; MINOSHIMA, R. Cholesterol levels and eicosanoid production in rats fed phosphatidylinositol or soybean lecithin. **J Nutr Sci Vitaminol**, v. 34, n. 2, p. 237-244, 1988.

IWATA, T.; HOSHI, S.; TAKEHISA, F.; TSUTSUMI, K.; FURUKAWA, Y.; KIMURA, S. J. The effect of dietary safflower phospholipid on plasma and liver lipids in rats fed a hypercholesterolemic diet. **J Nutr Sci Vitaminol**, v. 38, p. 471-479, 1992.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; CAPRA, J. D. **Imunologia: o sistema imunitário na saúde e na doença**. 4.ed. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000.

JEFFERY, N. M.; SANDERSON, P.; NEWSHOLME, E. A.; CALDER, P. C. Effects of varying the type of saturated fatty acid in the rat diet upon serum lipid levels and spleen lymphocyte functions. **Biochem Biophys Acta**, v. 1345, p. 223-236, 1997.

JEFFERY, N. M.; YAQOUB, P.; WIGGINS, D.; GIBBONS, G. F.; NEWSHOLME, E. A.; CALDER, P. C. Characterization of lipoprotein composition in rats fed different dietary lipids and of the effects of lipoprotein upon lymphocyte proliferation. **J Nutr Biochem**, v. 7, p. 282-292, 1996.

JIMENEZ, M. A.; SCARINO, M. L.; VIGNOLINI, F.; MENGHERI, E. Evidence that polyunsaturated lecithin induces a reduction in plasma cholesterol level and favourable changes in lipoprotein composition in hypercholesterolemic rats. **J Nutr**, v. 120, p. 659-667, 1990.

JONES, S. M.; BROOKS, B. A.; LANGLEY, S. C.; IDLE, J. R.; HIRON, P. C. Glutathione transferase activities of cultured human lymphocytes. **Carcinogenesis**, v. 9, n. 3, p. 395-398, 1988.

JUNG, C. G.; KAMIYAMA, T.; AGUI, T. Elevated apoptosis of peripheral T lymphocytes in diabetic BB rats. **Immunology**, v. 98, n. 4, p. 590-594, 1999.

KAKU, S.; OHKURA, K.; YUNOKI, S.; NONAKA, M.; TACHIBANA, H.; SUGANO, M.; YAMADA, K. Dietary gamma-linolenic acid dose-dependently modifies fatty acid composition and immune parameters in rats. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 65, n. 4, p. 205-210, 2001.

KELLY, J. P.; PARKER, C.W. Effects of arachidonic acid and other unsaturated fatty acids on mitogenesis in human lymphocytes. **J Immunol**, v. 122, p. 1556-1562, 1979.

KEW, S.; WELLS, S.; THIES, F.; MCNEILL, G. P.; QUINLAN, P. T.; CLARK, G. T.; DOMBROWSKY, H.; POSTLE, A. D.; CALDER, P. C. The effect of eicosapentaenoic acid on rat lymphocyte proliferation depends upon its position in dietary triacylglycerols. **J Nutr**, v. 133, n. 12, p. 4230-4238, 2003.

KIL, I. S.; LEE, J. H.; SHIN, A. H.; PARK, J. W. Glycation-induced inactivation of NADP⁺-dependent isocitrate dehydrogenase: implications for diabetes and aging. **Free Radic Biol Med**, 2004.

KINSELLA, J. E.; LOKESH, B.; BROUGHTON, S.; WHELAN, J. Dietary polyunsaturated fatty acids and eicosanoids: potential effects on the modulation of inflammatory and immune cells: an overview. **Nutrition**, v. 6, p. 24-44, 1990.

KUMAMOTO, T.; IDE, T. Comparative effects of α - and γ -linolenic acids on rat liver fatty acid oxidation. **Lipids**, v. 33, p. 647-654, 1998.

KUROWSKA, E. M.; JORDAN, J.; SPENCE, J. D.; WETMORE, S.; PICHE, L. A.; RAZIKOWSKI, M.; DANDONA, P.; CARKOLL, K. K. Effects of substituting dietary soybean protein and oil for milk protein and fat in subjects. **Clin Invest Med**, v. 20, n. 3, p. 162-170, 1997.

LEBLANC, M.; GAVINO V.; PEREA, A.; YOUSEF, I.M.; LEVY, E.; TUCHWEBER, B. The role of dietary choline in the beneficial effects of lecithin on the secretion of biliary lipids in rats. **Biochim Biophys Acta** v. 1393, p. 223-234, 1998.

LEBLANC, M.; BRUNET, S.; BOUCHARD, G.; LAMIREAU, T.; YOUSEF, I. M.; GAVINO, V.; LÉVY, E.; TUCHWEBER, B. Effects of dietary soybean lecithin on plasma lipid transport and hepatic cholesterol metabolism in rats. **J Nutr Biochem**, v. 14, p. 40-48, 2003.

LENZEN, S.; PANTEN, U. Alloxan: history and mechanism of action. **Diabetologia**, v. 31, n. 6, p. 338 -342, 1988.

LEVIN, H. S.; PETERS, B. H.; KALISKY, Z.; HIGH, W. M.; VON LAUFEN, A.; EISENBERG, H. M.; MORRISON, D. P.; GARY, H. E. Effects of oral physostigmine and lecithin on memory and attention in closed head-injured patients. **Cent Nerv Syst Trauma**, v. 3, n. 4, p. 333-342, 1986.

LEWIS, G. F.; STEINER, G. Hypertriglyceridemia and its metabolic consequences as a risk factor for atherosclerotic cardiovascular disease in diabetes mellitus. **Diabetes Metab Rev**, v. 12, p. 37-56, 1996.

LEFKOWITH, J. B.; ROGERS, M.; LENNARTZG, M. R.; BROWN, E. J. Essential Fatty Acid Deficiency Impairs Macrophage Spreading and Adherence: role of arachidonate in cell adhesion. **J Biol Chem**, v. 266, n. 2, p. 1071-1076, 1991.

LIU, B. F.; MIYATA, S.; KOJIMA, H.; URIUHARA, A.; KUSUNOKI, H.; SUZUKI, K.; KASUGA, M. Low Phagocytic Activity of Resident Peritoneal Macrophages in Diabetic Mice: Relevance to the Formation of Advanced Glycation End Products. **Diabetes**, v. 48, p. 2074-2082, 1999.

LLORENT, L.; FUENTE, H.; PATIN, Y. R.; BARRERA, C. A.; DIAZ-BORJON, A.; LÓPEZ-PONCE, A.; LERMAN-GARBER, I.; JAKEZ-OCAMPO, J. Innate immune response mechanisms in non-insulin dependent diabetes mellitus patients assessed by flow cytometry. **Immunol Lett**, v. 74, p. 239-244, 2000.

LOFFREDA, S.; YANG, S. Q.; LIN, H. Z.; KARP, C. L.; BRENGMAN, M. L.; WANG, D. J.; KLEIN, A. S.; BULKLEY, G. B.; BAO, C.; NOBLE, P. W.; LANE, M. D.; DIEHL, A. M. Leptin regulates proinflammatory immune responses. **FASEB J**, v. 12, p. 1, p. 57-65, 1998.

LUCEY, D. R.; CLERICI, M.; SHEARER, G. M. Type 1 and Type 2 Cytokine Dysregulation in Human Infectious, Neoplastic, and Inflammatory Diseases. **Clin Microbiol Rev**, v. 9, n. 4, p. 532-562, 1996.

MANCONI, M.; APARÍCIO, J.; VILA, A.O.; PENDÁS, J.; FIGUERUELO, J.; MOLINA, F. Viscoelastic properties of concentrated dispersions in water of soy lecithins. **Colloid and surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects**, v. 222, p. 141-145, 2003.

MARTINS, I. J.; LENZO, N. P.; REDGRAVE, T. G. Phosphatidylcholine metabolism after transfer from lipid emulsions injected intravenously in rats: implications for high-density lipoprotein metabolism. **Biochim Biophys Acta**, v. 1005, p. 217-224, 1989.

MASTELLONE, I.; POLICHETTI, E.; GRES, S.; MAISONNEUVE, C.; DOMINGO, N.; MARIN, V./ LORE, A.; FARNARIER, C.; PORTUGAL, H.; KAPLANSKI, G.; CHANUSSOT, F. Dietary soybean phosphatidylcholines lower lipidemia: Mechanisms at the levels of intestine, endothelial cell, and hepato-biliary axis. **J Nutr Biochem**. v. 11, p. 461-466, 2000.

McINTYRE, T. M.; ZIMMERMAN, G. A.; PRESCOTT, S. M. Biologically active oxidized phospholipids. **J Biol Chem**, v. 274, p. 25189-25192, 1999.

MEDIC, D. R.; RISTIC, V.; TEPSIC, V.; RANIC, M.; RISTIC, G.; VRBASKI, S.; ESTELECKI, I. Effect of soybean Leci-vita product on serum cholesterol and triglycerides levels. **Nutr Res**, v. 23, p. 269-279, 2003.

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

MEGLI, F. M.; SABATINI, K. EPR studies of phospholipid bilayers after lipoperoxidation. 1. Inner molecular order and fluidity gradient. **Chem Phys Lipids**, v. 125, n. 2, p. 161-172, 2003.

MENON, V.; RAM, M.; DORN, J.; ARMSTRONG, D.; MUTI, P.; FREUDENHEIM, J. L.; BROWNE, R.; SCHUNEMANN, H.; TREVISAN, M. Oxidative stress and glucose levels in a population-based sample. **Diabet Med**, v. 21, n. 12, p. 1346-1352, 2004.

MERO, N.; SYVÄNNE, M.; TASKINEN, M. R. Postprandial lipid metabolism in diabetes **Atherosclerosis**, v. 141, n. 1, p. 53-55, 1998.

MILES, E. A.; WALLACE, F. A.; CALDER, P. C. Dietary fish oil reduces intercellular adhesion molecule 1 and scavenger receptor expression on murine macrophages. **Atherosclerosis**, v. 152, p. 43-50, 1999.

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

MU, H.; HOY, C. E. The digestion of dietary triacylglycerols. **Prog Lipid Res**, p. 1-29, 2003.

NAKAMURA, A.; SUZUKI, Y.; UMEGAKI, H.; IKARI, H.; TAJIMA, T.; ENDO, H.; IGUCHI, A. Dietary restriction of choline reduces hippocampal acetylcholine release in rats: in vivo microdialysis study. **Brain Res Bull**, v. 56, p. 593-597, 2001.

NATHAN, D. M.; MEIGS, J.; SINGER, D. E. The epidemiology of cardiovascular disease in type 2 diabetes mellitus: how sweet it is...or is it? **Lancet**, v. 350, p. S14-9, 1997.

NAVDER, K. P., BARAONA, E.; LIEBER, C. S. Polyenylphosphatidylcholine attenuates alcohol-induced fatty liver and hyperlipemia in rats. **J Nutr**, v. 127, p. 1800-1806, 1997.

NICOLOSI, R. J.; WILSON, T. A.; LAWTON, C.; HANDELMAN, G. J. Dietary effects on cardiovascular disease risk factors: beyond saturated fatty acids and cholesterol. **J Am Coll Nutr**, v. 20, n. 5, p. 421S-427S, 2001.

NISHIMUKAI, M.; HARA, H.; AOYAMAE, Y. The addition of soybean phosphatidylcholine to triglyceride increases suppressive effects on food intake and gastric emptying in rats, **J Nutr**, v. 133, p. 1255-1258, 2003.

NISHIYAMA, A.; CAVAGLIERI C.R.; CURI, R.; CALDER, P.C. Arachidonic acid-containing phosphatidylcholine inhibits lymphocyte proliferation and decreases interleukin-2 and interferon-gamma production from concanavalin A-stimulated rat lymphocytes. **Biochim Biophys Acta**, v. 1487, p. 50-60, 2000.

NISHIYAMA-NARUKE, A.; CURI, R. Phosphatidylcholine participates in the interaction between macrophages and lymphocytes. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 278, n. 3, p. C554-560, 2000.

O'BRIEN, B. C.; CORRIGAM, S. M. Influence of dietary and egg lecithins on lipid responses in cholesterol-fed guinea pigs. **Lipids**, v. 23, n. 7, p. 647-650, 1988.

OLUBADEWO, J. O.; SPITZER, J. A. Immune response modulation in acutely ethanol-intoxicated, acutely diabetic male and female rats. **Alcohol**, v. 31, p. 137-147, 2003.

ORZECZOWSKI, A. Justification for antioxidant preconditioning (or how to protect insulin-mediated actions under oxidative stress). **J Biosci**, v. 28, p. 39-49, 2003.

OSIECKI, H. The role of chronic inflammation in cardiovascular disease and its regulation by nutrients. **Altern Med Rev**, v. 9, n. 1, p. 32-53, 2004.

OSTERUD, B.; BJORKLID, E. Role of monocytes in atherogenesis. **Physiol Rev**, v. 83, n. 4, p. 1069-1112, 2003.

OTTON, R.; CARVALHO, C. R. O.; MENDONÇA, J. R., CURI, R. Low proliferation capacity of lymphocytes from alloxan-diabetic rats: involvement of high glucose and tyrosine phosphorylation of Shc and IRS-1. **Life Sci**, v. 71, p. 2759-2771, 2002.

OTTON, R.; MENDONÇA, J. R.; CURI, R. Diabetes causes marked changes in lymphocyte metabolism. **J Endocrinol**, v. 174, p. 55-61, 2002.

OTTON R.; SORIANO, F. G.; VERLENGIA, R.; CURI, R. Diabetes induces apoptosis in lymphocytes. **J Endocrinol**, v. 182, n. 1, p. 145-156, 2004.

PATEL, K. D., ZIMMERMAN, G. A., PRESCOTT, S. M., MCINTYRE, T. M. Novel leukocyte agonists are released by endothelial cells exposed to peroxide. **J Biol Chem**, v. 267, n. 21, p. 15168-15175, 1992.

PARIS, A. S.; SERRANO, M. A. S.; GAMBOA, R. A. Lipid metabolism and new diabetic recommendations. **An Med Interna**, v. 13, n. 3, p. 136-145, 1996.

PERES, C. M.; HOMEM DE BITTENCOURT JUNIOR, P. I.; COSTA, M.; CURI, R.; WILLIAMS, J. F. Evidence for the transfer in culture of [14C]-labelled fatty acids from macrophages to lymphocytes. **Biochem Mol Biol Int**, v. 43, n. 5, p. 1137-1144, 1997.

PETERSON, L. D.; THIES, F.; CALDER, P. C. Dose-dependent effects of dietary gamma-linolenic acid on rat spleen lymphocyte functions. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**, v. 61, n. 1, p. 19-24, 1999.

PHAN, C. T.; TSO, P. Intestinal lipid absorption and transport. **Front Biosci**, v. 6, p. 299-319, 2001.

PIPE, R.K.; COLES, J.A.; FARLEY, S.R. Assays for measuring immune response in the mussel *Mytilus edulis*. **Tech Fish Immunol**, v. 4, p. 93-100, 1995.

POLICHETTI, E.; DIACONESCU, N.; DE LA PORTE, P. L.; MALLI, L.; PORTUGAL, H.; PAULI, A. M.; LAFONT, H.; TUCHWEBER, B.; YOUSEF, I.; CHANUSSOT, F. Cholesterol-lowering effect of soyabean lecithin in normolipidaemic rats by stimulation of biliary lipid secretion. **Br J Nutr**, v. 75, n. 3, p. 471-478, 1996.

POLICHETTI, E.; JANISSON, A.; PORTE, P.L.; PORTUGAL, H.; LÉONARDI, J.; LUNA, A.; LA DROITTE, P.; CHANUSSOT, F. Dietary polyenylphosphatidylcholine decreases cholesterolemia in hypercholesterolemic rabbits. Role of the hepato-biliary axis. **Life Sci**, v. 67, p. 2563-2576, 2000.

POMPÉIA, C.; CURY-BOAVENTURA, M. F.; CURI, C. Arachidonic acid triggers an oxidative burst in leukocytes. **Braz J Med Biol Res**, v. 36, p. 1949-1960, 2003.

POMPÉIA, C.; LOPES, L. R.; MIYASAKA, C. K.; PROCOPIO, J.; SANNOMIYA, P.; CURI, R. Effect of fatty acids on leukocyte function. **Braz J Med Biol Res**, v. 33, n. 11, p. 1255-1268, 2000.

PTAK, W.; CZARNICK, Z.; HANCZAKOWSKA, M. Contact sensitivity in alloxan-diabetic mice. **Clin Exp Immunol**, v. 19, p. 319-323, 1975.

PTAK, W.; KLIMEK, M.; BRYNIARSKI, K.; PTAK, M.; MAJCHER, P. Macrophage function in alloxan diabetic mice: expression of adhesion molecules, generation of monokines and oxygen and NO radicals. **Clin Exp Immunol**, v. 114, p. 13-18, 1998.

RADOMSKA, A.; DOBRUCKI, R. The use of some ingredients for microemulsion preparation containing retinol and its esters. **Int J Pharm**, v. 196, p. 131-134, 2000.

RANDRIAMAMPITA, C.; TRAUTMANN, A. Biphasic increase in intracellular calcium induced by platelet-activating factor in macrophages. **FEBS Lett**, v. 249, p. 199-206, 1989.

RASHID, S.; WATANABE, T.; SAKAUE, T.; LEWIS, G.F. Mechanisms of HDL lowering in insulin resistant, hypertriglyceridemia states: the combined effect of

HDL triglyceride enrichment and elevated hepatic lipase activity. **Clin Biochem**, v. 36, p. 421-429, 2003.

RIOUX, F.; PEREA, A.; YOUSEF, I. M.; LEVY, E.; MALLI, L.; CARRILLO, M. C.; TUCHWEBER, B. Short-term feeding of a diet enriched in phospholipids increases bile formation and the bile acid transport maximum in rats. **Biochim Biophys Acta**, v. 1214, n. 2, p. 193-202, 1994.

ROSSENEU, B. D.; VANDAMME, D.; VERCAEMST, R.; SOETEWAY, F.; PEETERS, H.; BLATON, V. Influence of oral polyunsaturated and saturated phospholipid treatment on the lipid composition and fatty acid profile of chimpanzee lipoproteins. **Atherosclerosis**, v. 32, p. 141-153, 1979.

SACKS, D. B.; BRUNS, D. E.; GOLDSTEIN, D. E.; MACLAREN, N. K.; MCDONALD, J. M.; PARROT, M. Guidelines and recommendations for laboratory analysis in the diagnosis and management of diabetes mellitus. **Clin Chem**, v. 48, p. 436-472, 2002.

SCHAEFER, E.J. Lipoproteins, nutrition, and heart disease. **Am J Clin Nutr**, v. 75, p. 191-212, 2002.

SCHERPHOF, G. L. Phospholipid metabolism in animal cells. In: **Phospholipids handbook**. Ed. Cevc, G. Marcel Dekker Inc. New York, EUA, 1993.

SHEN, H.; HOWLES, P.; TSO, P. From interaction of lipid vehicles with intestinal epithelial cell membranes to the formation and secretion of chylomicrons. **Adv Drug Delivery Rev**, v. 50, p. S103-S125, 2001.

SILVA, P. H.; HASHIMOTO, Y. **Interpretação laboratorial do leucograma**. São Paulo: Robe editorial, 2003.

SIRTORI, C. R.; ZUCCHI-DENTONI, C.; SIRTORI, M.; GATTI, E.; DESCOVICH, G. S.; GADDI, A.; CATIN, L.; DaCOL, D. G.; SENIN, U.; MANNARINO, E. Cholesterol lowering and HDL raising properties of lecithinad soy proteins in type II hyperlipidemia patients. **Ann Nutr Metab**, v. 29, n. 6, p. 348-357, 1985.

STEINER, G. Treating lipid abnormalities in patients with type 2 diabetes mellitus. **Am J Cardiol**, v. 88, p. 37N-40N, 2001.

STEWART, M. W.; LAKER, M. F.; ALBERTI, K. G. The contribution of lipids to coronary heart disease in diabetes mellitus. **J Intern Med Suppl**, v. 736, p. 41-46, 1994.

STRANGE, R. C.; JONES, P. W.; FRYER, A. A. Glutathione S-transferase: genetics and role in toxicology. **Toxicol Lett**, v. 112-113, p. 357-363, 2000.

TABAS, I. Phospholipid metabolism in cholesterol-loaded macrophages. **Curr Opin Lipidol**, v. 8, n. 5, p. 263-267, 1997.

TANAKA, S.; ISODA, F.; KIUCHI, Y.; IKEDA, H.; MOBBS, C. V.; YAMAKAWA, T. T lymphopenia in genetically obese-diabetic Wistar fatty rats: effects of body weight reduction on T cells. **Metabolism**, v. 49, n. 10, p. 1261-1266, 2000.

TIJBURG, L. B.; VANCE, D. E. Head group specificity in the regulation of phosphatidylcholine catabolism in rat hepatocytes. **Biochem Biophys Acta**, v. 1085, p. 178-183, 1991.

TOMPKINS, R. K.; PARKIN, L. G. Effects of long term ingestion of soya phospholipids on serum lipids in human. **Am J Surg**, v. 140, n. 3, p. 360-364, 1980.

TRICON, S.; BURDGE, G. C.; KEW, S.; BANERJEE, T.; RUSSELL, J. J.; GRIMBLE, R. F.; WILLIAMS, C. M.; CALDER, P. C.; YAQOOB, P. Effects of cis-9,trans-11 and trans-10,cis-12 conjugated linoleic acid on immune cell function in healthy humans. **Am J Clin Nutr**, v. 80, n. 6, p. 1626-1633, 2004.

TRINDER, R. Determination of glucose in blood using glucose with alternative oxygen acceptor. **Ann Clin Biochem**, v. 6, p. 27-27, 1969.

TSIMARATOS, M.; COSTE, T. C.; SPHIPKOLYE, A. D.; VAGUE, P.; PIERONI, G.; RACCAH, D. γ -linolenic acid restores renal medullary thick ascending limb Na^+K^+ -ATPase activity in diabetic rats. **J Nutr**, v. 131, p. 3160-3165, 2001.

VAN MEER, G. Lipid traffic in animal cells. **Annu Rev Cell Biol**, v. 5, p. 247-275, 1989.

VERGES, B. L. Dyslipidemia in diabetes mellitus: review of the main lipoprotein abnormalities and their consequences on the development of atherogenesis. **Diabetes Metab**, v. 3, p. 32-40, 1999.

VOET, D.; VOET, J.; PRATT, C. W. Lipídios. In: **Fundamentos de bioquímica**. Porto Alegre: Artes Médicas Sul, 2000.

WANG, Y. Y.; ZHENG, X. X. A flow cytometry-based assay for quantitative analysis of cellular proliferation and cytotoxicity in vitro. **J Immunol Methods**, v. 268, p. 179-188, 2002.

WARNICK, G. R.; NAUCK, M.; RIFAI, N. Evolution of methods for measurement of HDL-cholesterol: from ultracentrifugation to homogeneous assays. **Clin Chem**, v. 47, p. 1579-1596, 2001.

WEEKERS, F.; GIULIETTI, A.; MICHALAKI, M.; COOPMANS, W.; HERCK, E. V.; MATHIEU, C.; BERGHE, G. V. D. Metabolic, Endocrine, and Immune Effects of Stress Hyperglycemia in a Rabbit Model of Prolonged Critical Illness. **Endocrinology**, v. 144, p. 5329–5338, 2003.

WEXLER, B. C.; LUTMER, R. F. Adrenal glandular lipids and circulating corticosterone in severely diabetic rats. **Brit J Exp Pathol**, v. 56, p. 299-301, 1975.

WILLIAMS, K. J.; WERTH, V. P.; WOLF, J. A. Intravenously administered lecithin liposomes: a synthetic antiatherogenic lipid particle. **Perspect Biol Med**, v. 27, p. 417-431, 1984.

WILLIAMS, R. J., LANSFORD, E. M. **The encyclopedia of biochemistry**. Reinhold Publishing corporation, 1967.

WILSON, T. A., MESERVEY, C. M., NICOLOSI, R. J. Soy lecithin reduces plasma lipoprotein cholesterol and early atherogenesis in hypercholesterolemic monkeys and hamsters: beyond linoleate. **Atherosclerosis**, v. 140, p. 147-153, 1998.

WU, G.; FANG, Y. Z.; YANG, S.; LUPTON, J. R.; TURNER, N. D. Glutathione metabolism and its implications for health. **J Nutr**, v. 134, n. 3, p. 489-492, 2004.

YAQOUB, P.; CALDER, P. Effects of dietary lipid manipulation upon inflammatory mediator production by murine macrophages. **Cell Immunol**, v. 163, n. 1, p. 120-128, 1995.

YORK, J. L.; MADDOXX, L.C.; ZIMNIAK, P.; McHUGH, T. E.; GRANT, D. F. Reduction of MTT by glutathione S-transferase. **Biotechniques**, v. 25, n. 4, p. 622-4- 626-8, 1998.

ZEIZEL, S. H. “Vitamine-like” molecules. Choline. **Modern Nutrition in Health and Disease**, p. 440-452, 1988.

ZEIZEL, S. H.; BLUSZTAJN, J. K. Choline and human nutrition. **Annu Ver Nutr**, v. 14, p. 269-296, 1994.

ZYKOVA, S. N.; JENSSEN, T. G.; BERDAL, M.; OLSEN, R.; MYKLEBUST, R.; SELJELID, R. Altered cytokine and nitric oxide secretion in vitro by macrophages from diabetic type II-like db/db mice. **Diabetes**, v. 49, n. 9, p.1451-1458, 2000.