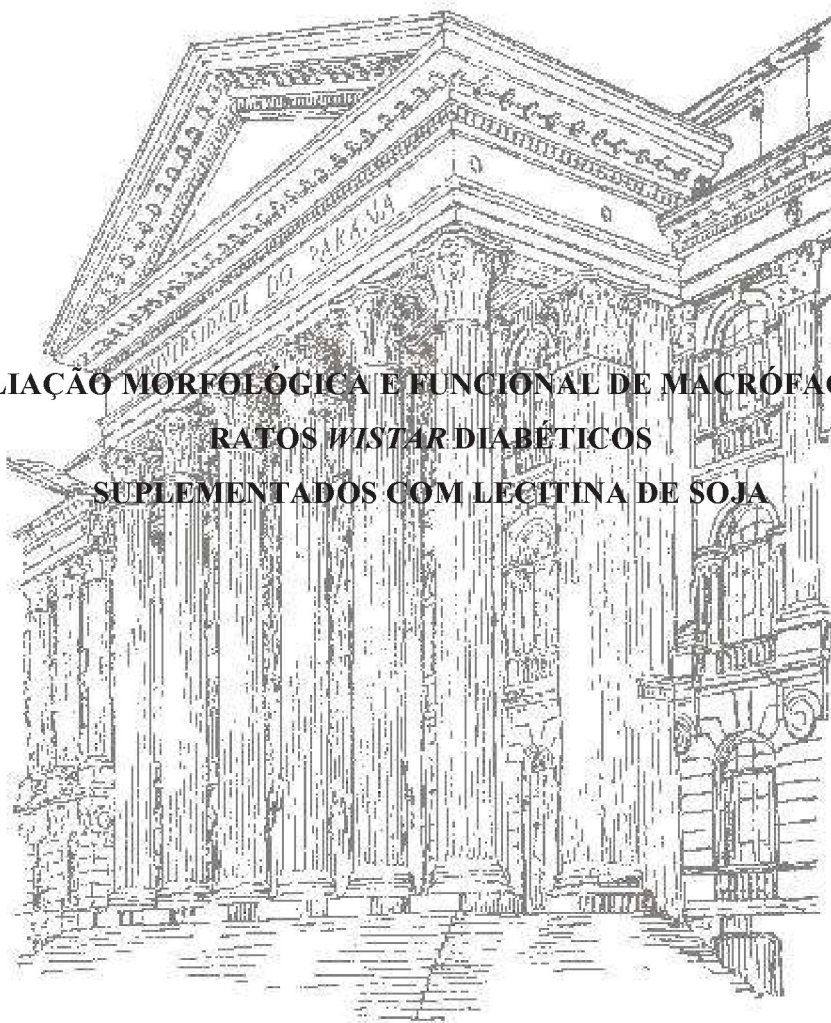


**FERNANDA CRISTINE CECCON GRANDO**

**AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E FUNCIONAL DE MACRÓFAGOS DE  
RATOS Wistar DIABÉTICOS  
SUPLEMENTADOS COM LECTINA DE SOJA**



**CURITIBA**

**2007**

**FERNANDA CRISTINE CECCON GRANDO**

**AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E FUNCIONAL DE MACRÓFAGOS DE  
RATOS *WISTAR* DIABÉTICOS  
SUPLEMENTADOS COM LECITINA DE SOJA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular, Curso de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Área de Concentração Fisiologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Anita Nishiyama

**CURITIBA  
2007**



Ministério da Educação  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
Setor de Ciências Biológicas  
Comitê de Ética em Experimentação Animal  
(CEEAA)



Nº 169

### CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEAA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, inscrito pela PORTARIA Nº 767/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEAA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o conteúdo do Regimento Interno do CEEAA, CERTIFICA que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

**PROCESSO:** 23075.010888/2006-19      **APROVADO:** RO 06/2006 em 06/06/2006

**TÍTULO:** Efeitos da lectina de soja sobre macrófagos obtidos de ratos Wistar diabéticos: aspectos funcionais e morfológicos

**AUTORES:** Anita Nishiyama, Fernanda Cristine Ceccon Grandi, Deiva Terezinha Miranda, Vanessa Gomes Batista, Luísa Alexandre Nuehmann, Gabriela Fraletti Rubbo, Taysa Benivan Bassani e Giseli Umezaki Chasco

**DEPARTAMENTO:** Fisiologia

Curitiba, 07 de junho de 2006.

  
Prof. Ana Maria Fliedner  
Coordenadora do CEEAA

## AGRADECIMENTOS

A todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para o andamento deste projeto, meu sincero muito obrigada.

A

Meus pais,  
que sempre me apóiam e nunca deixam de me dar uma “injeção de ânimo” quando preciso.

Professora Anita,  
Pela orientação e também pelas boas risadas e longas divagações.

Estagiárias Gabi, Giselle, Ana, Carol e Ludmila,  
pela inestimável ajuda

Todos os colegas do laboratório: Carine, Pedro, Sérgio, Luis, Fabíola, Vanessa, Andressa, Marcelo, Ana Lúcia, Gleisson, Carina, Everson, Luciana, Paulo, Sandro, Cris e Diogo,  
que me ajudaram e conviveram comigo nestes anos.

Função Araucária e Cnpq,  
pelo apoio financeiro

Fundação Herbarium,  
Pelo fornecimento de lecitina de soja

Muito obrigada!

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b> .....	v
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	viii
<b>RESUMO</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	x
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 DIABETES MELLITUS.....	4
1.2 MACRÓFAGOS.....	7
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	12
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	13
3.1 ANIMAIS.....	13
3.2 INDUÇÃO DO QUADRO DE DIABETES.....	13
3.3 SUPLEMENTAÇÃO.....	13
3.4 COLETA DAS AMOSTRAS.....	14
3.5 CULTURA DE MACRÓFAGOS.....	14
3.6 MORFOLOGIA.....	14
3.7 CAPACIDADE DE ESPRAIAMENTO.....	15
3.8 CAPACIDADE DE ADESÃO.....	15
3.9 ATIVIDADE FAGOCÍTICA.....	16
3.10 VOLUME LISOSSOMAL.....	16
3.11 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO.....	16
3.12 PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO.....	17
3.13 ATIVIDADE DA CATALASE.....	17
3.14 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE ÁCIDOS GRAXOS PRESENTES NOS LIPÍDEOS TOTAIS DOS MACRÓFAGOS.....	18
3.15 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE ÁCIDOS GRAXOS PRESENTES NA FRAÇÃO DE FOSFOLIPÍDEOS DOS MACRÓFAGOS.....	19
3.16 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE ÁCIDOS GRAXOS PRESENTES NA LECITINA DE SOJA E NA RAÇÃO.....	20
3.17 DOSAGENS BIOQUÍMICAS.....	20
3.18 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	20
<b>4 RESULTADOS</b> .....	21
<b>5 DISCUSSÃO</b> .....	37
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	45
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	46

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1 - Representação estrutural da molécula de fosfatidilcolina. Em preto o glicerol, em vermelho o grupo fosfato, em roxo a colina, em azul o ácido graxo esterificado na posição sn-1, em verde o ácido graxo esterificado na posição sn-2.....01
- FIGURA 2 - Concentração sérica de glicose de animais mantidos em jejum por 12 horas. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, para n =21. C - controle, S - suplementado com lecitina de soja, D - diabético e DS - diabético suplementado com lecitina de soja.....21
- FIGURA 3 - Ganho de peso dos animais, monitorado a cada dois dias em um período de 21 dias. C - controle, S - suplementado com lecitina de soja, D - diabético e DS - diabético suplementado com lecitina de soja. Os resultados foram expressos como percentual  $\pm$  erro padrão da média, considerando-se o peso do primeiro dia de monitoramento como 0%.....22
- FIGURA 4 - Macrófagos peritoneais do grupo controle (A e B) e suplementado (C e D), após 24 horas de cultivo. As eletromicrografias foram obtidas em Microscópio Eletrônico de Varredura.....23
- FIGURA 5 - Macrófagos peritoneais do grupo diabético (A e B) e diabético suplementado (C e D). As eletromicrografias foram obtidas em Microscópio Eletrônico de Varredura.....24
- FIGURA 6 - Capacidade de adesão de macrófagos cultivados por 24 horas a 37°C obtidos de animais do grupo controle (C), suplementado com lecitina de soja (S), diabético (D) e diabético suplementado com lecitina de soja (DS). Os resultados foram expressos como média percentual  $\pm$  erro padrão da média.....25
- FIGURA 7 - Capacidade de Espreadimento de macrófagos cultivados por 24h a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, fixados em Bouin e corados com Giemsa. C - controle, S - suplementado com lecitina de soja, D - diabético e DS - diabético suplementado com lecitina de soja. Os resultados foram expressos como porcentagem de células espreadas  $\pm$  erro padrão da média.....26

- FIGURA 8 - Fotomicrografia de macrófagos cultivados por 24 horas a 37°C, fixados em Bouin e corados com Giemsa. As imagens foram obtidas em microscópio óptico (Zeiss). As setas indicam macrófagos espalhados.....26
- FIGURA 9 - Retenção lisossomal de vermelho neutro por macrófagos obtidos de animais do grupo controle (C), suplementado com lecitina de soja (S), diabético (D) e diabético suplementado com lecitina de soja (DS). Os resultados foram expressos como média percentual  $\pm$  erro padrão da média.....27
- FIGURA 10 - Atividade fagocítica de macrófagos incubados com zimosan não opsonizado. C - controle, S - suplementado com lecitina de soja, D - diabético e DS - diabético suplementado com lecitina de soja. Os resultados foram expressos como média percentual  $\pm$  erro padrão da média.....27
- FIGURA 11 - Produção de óxido nítrico por macrófagos incubados por 24 horas a 37°C na presença ou ausência de lipopolissacarídeo de *E. coli* (LPS). C - controle, S - suplementado com lecitina de soja, D - diabético e DS - diabético suplementado com lecitina de soja. Os resultados foram expressos como absorvância  $\pm$  erro padrão da média.....28
- FIGURA 12 - Produção de ânion superóxido por macrófagos cultivados na presença ou ausência de PMA incubados por 24 horas a 37°C na presença ou ausência de lipopolissacarídeo de *E. coli* (LPS). C - controle, S - suplementado com lecitina de soja, D - diabético e DS - diabético suplementado com lecitina de soja. Os resultados foram expressos como média percentual  $\pm$  erro padrão da média.....29
- FIGURA 13 - Atividade da catalase de macrófagos obtidos de animais do grupo controle (C), suplementado com lecitina de soja (S), diabético (D) e diabético suplementado com lecitina de soja (DS). A atividade enzimática foi expressa como  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  degradado/min.mg proteínas  $\pm$  erro padrão da média...30
- FIGURA 14 - Perfil de ácidos graxos da Lecitina de Soja. O conteúdo de ácidos graxos foi determinado através da análise por HPLC e os resultados foram expressos como média percentual  $\pm$  erro padrão da média, de dois experimentos diferentes. EPA - ácido eicosapentaenóico, DHA - ácido docosahexaenóico.....31

- FIGURA 15 - Perfil de ácidos graxos da Ração utilizada na alimentação dos animais. O conteúdo de ácidos graxos foi determinado através da análise por HPLC e os resultados foram expressos como média percentual  $\pm$  erro padrão da média, de dois experimentos diferentes. EPA – ácido eicosapentaenóico, DHA – ácido docosahexaenóico.....32
- FIGURA 16 - Concentração sérica de triacilglicerol de animais obtidos do grupo controle (C), suplementado com lecitina de soja (S), diabético (D) e diabético suplementado com lecitina de soja (DS). Os resultados foram expressos como concentração em mg/dL  $\pm$  erro padrão da média.....35
- FIGURA 17 - Concentração de colesterol total do soro de animais obtidos do grupo controle (C), suplementado com lecitina de soja (S), diabético (D) e diabético suplementado com lecitina de soja (DS). Os resultados foram expressos como concentração em mg/dL  $\pm$  erro padrão da média.....36
- FIGURA 18 - Concentração sérica de colesterol HDL, de animais obtidos do grupo controle (C), suplementado com lecitina de soja (S), diabético (D) e diabético suplementado com lecitina de soja (DS). Os resultados foram expressos como concentração em mg/dL  $\pm$  erro padrão da média.....36
- FIGURA 19 - Produção intracelular de espécies reativas de oxigênio e o sistema de defesa antioxidante.  $O_2^{\cdot -}$  ânion superóxido,  $H_2O_2$  peróxido de hidrogênio,  $OH^{\cdot}$  radical hidroxil.....41
- TABELA 1 - Perfil de ácidos graxos dos lipídeos totais dos macrófagos, analisado por HPLC. Os resultados foram expressos como g ácido graxo/100 g lipídeos  $\pm$  erro padrão da média, para n=12. C - controle, S - suplementado com lecitina de soja, D – diabético, DS - diabético suplementado com lecitina de soja, nd - não detectado, AL/AA - razão entre conteúdo de ácido linoléico e ácido araquidônico, IIn - índice de insaturação.....33
- TABELA 2 - Perfil de ácidos graxos da fração de fosfolipídeos. Procedeu-se os ensaios de CCD e as amostras foram analisadas por HPLC. Os resultados foram expressos como g ácido graxo/100 g lipídeos  $\pm$  erro padrão da média, para n=12. C - controle, S - suplementado com lecitina de soja, D – diabético, DS - diabético suplementado com lecitina de soja, nd - não detectado, AL/AA - razão entre conteúdo de ácido linoléico e ácido araquidônico, IIn - índice de insaturação.....34

**LISTA DE ABREVIATURAS**

AA	- ácido araquidônico
ACAT	- acil CoA colesterol aciltransferase
AGEs	- produtos avançados de glicosilação
AL	- ácido linoléico
ATP	- adenosina trifosfato
C	- grupo controle
CFU-GM	- unidade formadora de colônia de granulócito e macrófago
D	- grupo diabético
DHA	- ácido docosahexanóico
DNA	- ácido desoxirribonucléico
DS	- grupo diabético suplementado
EDTA	- ácido tetra acético de etilenodiamina
EPA	- ácido eicosapentaenóico
HDL	- lipoproteína de alta densidade
HPLC	- cromatografia líquida de alta eficiência
IIn	- índice de insaturação
IL-1 $\beta$	- interleucina 1 $\beta$
iNOS	- óxido nítrico sintase induzível
LCAT	- lecitina colesterol aciltransferase
LDL	- lipoproteína de baixa densidade
LPS	- lipopolissacarídeo
NADPH	- nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NBT	- nitroblue tetrazolium
NF- $\kappa$ B	- fator de transcrição NF- $\kappa$ B
NHA	- N-hidroxi-L-arginina
PAF	- fator de agregação plaquetária
PBS	- tampão fosfato
PMA	- forbol miristato acetato
S	- grupo suplementado
TAG	- triacilglicerol
TNF $\alpha$	- fator de necrose tumoral $\alpha$

## RESUMO

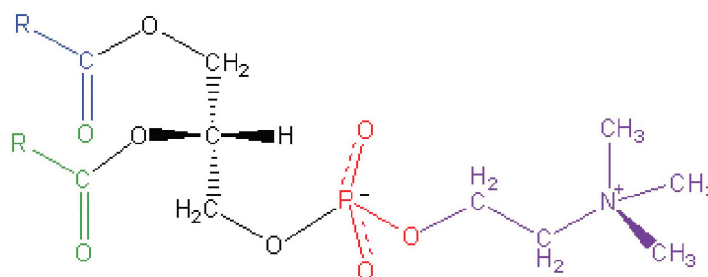
O diabetes mellitus não controlado apresenta como conseqüências a dislipidemia e a maior suscetibilidade a infecções fúngicas e microbianas. A lecitina de soja, um lipídeo rico em fosfatidilcolina, é utilizada por diabéticos para a redução dos lipídeos plasmáticos. Sabendo-se que a funcionalidade dos macrófagos é alterada pelos lipídeos da dieta, sugere-se que a lecitina module a funcionalidade dessas células do sistema imunitário. Para investigar tal hipótese, avaliou-se a morfologia e a funcionalidade de macrófagos peritoneais de ratos Wistar diabéticos, bem como alguns dos possíveis mecanismos envolvidos nessas alterações. Para a indução do quadro de diabetes administrou-se estreptozotocina (60 mg/kg peso corporal) por via endovenosa. Após 48 h iniciou-se a suplementação diária com lecitina de soja (2 g/kg peso corporal), por 21 dias. Os animais que receberam estreptozotocina apresentaram hiperglicemia, hipertriacilglicerolemia, bem como ganho de peso inferior ao observado para o grupo controle. A morfologia dos macrófagos, avaliada por microscopia eletrônica de varredura, foi modificada após tratamento com lecitina, observando-se aumento de tamanho celular e do número de lamelipódios. A lecitina também aumentou a capacidade de adesão e de fagocitose, o volume lisossomal e a produção de óxido nítrico e de ânion superóxido de macrófagos de ratos diabéticos. A atividade da catalase, uma enzima antioxidante, mostrou-se diminuída neste mesmo grupo. Sugere-se que os efeitos moduladores da lecitina ocorram pela alteração da produção de mediadores lipídicos, como o *PAF-like*, já que a suplementação com este lipídeo não modificou a concentração de lipídeos séricos e a incorporação de ácidos graxos pelos macrófagos, tanto dos lipídeos totais quanto da fração de fosfolipídeos. Em conclusão, a suplementação da dieta com lecitina de soja modifica a morfologia e funcionalidade de macrófagos de ratos Wistar diabéticos, indicando um papel importante da fosfatidilcolina.

## ABSTRACT

Diabetes induces chronic complications such as dyslipidemia and highly susceptibility to microbial and fungal infections. Soybean lecithin, a phosphatidylcholine rich lipid, has been used by diabetics to reduce lipemia. Many studies have investigated the effects of the lipids in the diet upon macrophage function. Thus, it is reasonable to suggest that lecithin modify immune cell function. To investigate this hypothesis, morphology and peritoneal macrophage function from diabetic Wistar rat was evaluated, as well as some possible mechanisms involved. Diabetes was induced by intravenous injection of 60 mg/kg streptozotocin (STZ). After 48 hours lecithin supplementation (2 g/kg) was carried out for 21 days. STZ induced-diabetic rats presented hyperglycemia, hypertriacylglycerolemia and lower body weight gain. Using scanning electron microscopy, it was shown that lecithin supplemented groups exhibited increased number of lamellipodia and macrophage size. Additionally, lecithin supplementation induced an increase in adhesion, phagocytosis, lysosomal volume and in nitric oxide and superoxide production by macrophages from diabetic rats. However, the catalase activity was diminished in this group. We suggest that immunomodulatory effects of lecithin occur by modified production of lipid mediators such as PAF-like, as soybean lecithin was not able to modify serum lipids levels and fatty acid content of macrophages both total lipids and phosphatidylcholine fraction. In conclusion, soybean lecithin supplementation modify morphology and macrophage function from diabetic Wistar rats, indicating a main role of phosphatidylcholine.

## 1. INTRODUÇÃO

A lecitina de soja é um lipídeo extraído da soja, que possui como principal constituinte a fosfatidilcolina (HARWOOD, 1994). A fosfatidilcolina apresenta em sua estrutura dois ácidos graxos unidos ao glicerol por ligações éster e uma colina ligada por ligação fosfodiéster (Figura 1). Os ácidos graxos presentes são cadeias hidrocarbonadas hidrofóbicas de tamanhos variados. A lecitina de soja é rica principalmente em ácido linoléico (18:2 n-6), o qual é esterificado na posição sn-2 da fosfatidilcolina (MOUSSA et al., 2000). O grupo fosfato e a colina são hidrofílicos, conferindo a esta molécula propriedade anfipática, comum a outras classes de fosfolipídeos.



**Figura 1** - Representação estrutural da molécula de fosfatidilcolina. Em preto o glicerol, em vermelho o grupo fosfato, em roxo a colina, em azul o ácido graxo esterificado na posição sn-1, em verde o ácido graxo esterificado na posição sn-2.

Por estas características, a lecitina de soja é frequentemente utilizada pela indústria alimentícia no preparo de margarinas, bombons de chocolate, bolos, sorvetes, entre outros. A lecitina também está presente em alimentos de origem animal e vegetal como fígado, ovo, amendoim e soja (HARWOOD, 1994). Dessa forma, a lecitina faz parte da dieta de grande parte da população.

Os fosfolipídeos são considerados precursores de moléculas bioativas, capazes de modular as respostas imunitárias. Após a ingestão, a fosfatidilcolina é clivada no jejuno e no duodeno por ação da fosfolipase A<sub>2</sub>, liberando o ácido graxo da posição sn-2 e a lisofosfatidilcolina. O ácido graxo liberado pela fosfatidilcolina, representado principalmente por ácido linoléico, é absorvido nas células e tecidos e passa a constituir lipídeos estruturais de membrana, podendo ainda ser dessaturado e alongado

a ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa, com 20 ou mais átomos de carbono (KINSELLA, 1990). O processo de dessaturação do ácido linoléico representa um passo limitante ao nível da  $\Delta 6$  dessaturase, que leva à formação de ácido araquidônico, o qual pode ser convertido em substâncias cíclicas denominadas eicosanóides (CALDER, 2003). As seguintes vias metabólicas podem participar do processo de conversão do ácido araquidônico aos eicosanóides: ciclooxigenase, lipoxigenase ou epoxigenase. Dependendo da via utilizada, são produzidas as prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos, lipoxinas e outros hidroxiácidos graxos (DOGNE; HANSON; PRATICO, 2005).

Os eicosanóides são substâncias biologicamente ativas que desempenham suas funções no local onde são produzidas. Tem sido demonstrado que a funcionalidade de determinados tipos celulares depende do equilíbrio estabelecido entre a síntese dos vários eicosanóides (HOMEM DE BITTENCOURT; CURI, 1992). Assim, fatores que possam intervir nas vias de metabolização do ácido araquidônico são potentes reguladores da função celular (SANGIOVANNI; CHEW, 2005). Nesse sentido, a fosfatidilcolina poderia modular a funcionalidade de células do sistema imunitário como os macrófagos.

Outro mediador lipídico que influencia a funcionalidade das células do sistema imunitário é o fator de agregação plaquetária (PAF) o qual, em concentrações muito baixas, é capaz de ativar os macrófagos através do receptor para PAF (GOPAL et al., 2002). O PAF é sintetizado através de duas vias distintas: via de remodelagem e síntese de novo. A síntese de novo ocorre em condições fisiológicas, enquanto a via de remodelagem é regulada por sinais extracelulares desempenhando dessa forma, um importante papel na síntese de PAF durante processos inflamatórios e reações de hipersensibilidade. Essa via tem sido relatada quando macrófagos peritoneais são estimulados com ionóforos de cálcio (SHINDOU et al., 2000).

Além disso, as células produzem agonistas de receptor de PAF, através da fragmentação oxidativa da fosfatidilcolina esterificada com ácidos graxos poliinsaturados na posição sn-2 (MARATHE, 2001). O peróxido de ácido graxo formado pelo ataque oxidativo pode ser clivado e assim, gerar um grande número de

produtos biologicamente ativos. Alguns destes se ligam diretamente ao receptor de PAF e podem até apresentar semelhante afinidade ao receptor, como aquela observada para o PAF. Esses produtos gerados, denominados lipídeos *PAF-like* são encontrados *in vivo* sob condições de estresse oxidativo (FREY, 2000). Em patologias como o diabetes mellitus, há um desequilíbrio oxidativo e com isso maior taxa de peroxidação lipídica. Assim, é provável que haja maior produção de lipídeos *PAF-like*, os quais poderiam modular a funcionalidade das células do sistema imunitário.

Outro mecanismo de modulação funcional pelos lipídeos é através da modificação em discretos domínios das membranas citoplasmáticas capazes de interferir nas vias de transdução intracelular. A fosfatidilcolina é um dos principais constituintes das membranas de células eucarióticas. Suas interações com outros fosfolipídios de membrana são dinâmicas e determinam a fluidez desta, podendo influenciar significativamente a atividade de transportadores, receptores de membrana e enzimas (ZAMMIT et al., 1998). Foi demonstrado experimentalmente que a fluidez das membranas, que afeta as funções de receptores e enzimas, é modulada pela quantidade e tipos de ácidos graxos da dieta (KINSELLA, 1990).

Estudos *in vitro* têm demonstrado que a fosfatidilcolina pode ser incorporada por linfócitos em cultura, reduzindo sua capacidade proliferativa e a produção de citocinas (NISHIYAMA et al., 2000; NISHIYAMA-NARUKE; CURI, 2000). Macrófagos incorporam fosfatidilcolina em taxas dez vezes maiores que linfócitos (NISHIYAMA-NARUKE; CURI, 2000). Sabendo-se que o metabolismo da fosfatidilcolina é de extrema importância para os macrófagos, é possível que a sua incorporação por macrófagos resulte em alterações significativas em sua funcionalidade assim como foi observado para linfócitos.

Adicionalmente, estudos têm demonstrado que a lecitina de soja apresenta ação hipolipemiante. A administração de lecitina em animais experimentais induzidos à hipercolesterolemia reduz as concentrações de colesterol total, colesterol LDL e mantém ou aumenta as concentrações de colesterol HDL (POLICHETTI et al., 1996). Em estudos realizados com humanos, também já foi demonstrada uma redução significativa da concentração de colesterol plasmático quando estes apresentavam

hiperlipidemia, porém o mesmo não foi observado em pacientes normolipidêmicos (KUROWSKA et al., 1997; MEDIC et al., 2003).

O mecanismo de ação da lecitina ainda não está bem elucidado. JIMENEZ et al. (1990) sugerem que haja aumento da atividade da lecitina colesterol aciltransferase (LCAT), levando ao aumento da formação de HDL e com isso, remoção de colesterol dos tecidos periféricos. LEBLANC et al. (2003) também observaram alterações na homeostase do colesterol hepático, devido à inibição da atividade da acil CoA colesterol aciltransferase (ACAT) que está associada com a diminuição do conteúdo de colesterol livre e esterificado nos hepatócitos, já que este lipídeo é rapidamente direcionado para eliminação na bile, diretamente ou após conversão em ácidos biliares. MASTELLONE et al. (2000) corroboram com essa hipótese já que verificaram que a concentração de colesterol e de fosfolipídeos é maior na bile de animais tratados com lecitina de soja quando comparados aos animais tratados com óleo de soja (rico em triacilgliceróis), resultando em decréscimo da concentração de colesterol plasmático. Dessa forma, a lecitina contribuiria para a prevenção da formação da placa aterosclerótica e para o desenvolvimento de eventos cardiovasculares isquêmicos.

A suplementação da dieta com lecitina de soja tem sido utilizada também por indivíduos diabéticos. Além da hiperglicemia e suas complicações, a hiperlipidemia que se desenvolve nesses pacientes torna-se a principal causa de morbidade e mortalidade, decorrentes principalmente de doenças cardiovasculares (HAFFNER, 1999; GARBER, 2000). Assim, a suplementação da dieta com lecitina de soja pode ser uma importante intervenção terapêutica para diminuir o risco de desenvolvimento dessas complicações (SCHAEFER, 2002).

## 1.1 DIABETES MELLITUS

Diabetes mellitus do tipo 1 é uma doença auto-imune que representa 5-10% dos casos de diabetes (BRESSON; VON HERRATH, 2004). É mediada por células T, cuja ativação provoca a destruição de células  $\beta$ -pancreáticas produtoras de insulina. Acredita-se que infecções virais estejam envolvidas no desencadeamento do diabetes

mellitus do tipo 1 por três mecanismos distintos: (1) indução do dano celular mediado por vírus ou pela secreção de citocinas inflamatórias que prejudicam as células  $\beta$ ; (2) aumento da funcionalidade de células apresentadoras de antígenos conduzindo ao aumento da apresentação de auto-antígenos; e (3) reconhecimento de antígenos próprios pelos anticorpos anti-proteínas virais (CHRISTEN et al., 2004).

A iniciação e o progresso do diabetes mellitus auto-imune pode ser dividido em três estágios: (1) recrutamento de linfócitos T as ilhotas pancreáticas; (2) ativação desses linfócitos pelas células apresentadoras de antígenos, que apresentam peptídeos derivados das ilhotas pancreáticas; (3) acúmulo desses linfócitos nas ilhotas e destruição das células  $\beta$ . Essa destruição envolve a proteína Fas e ligante de Fas, produção de citocinas e secreção de perforina. (BRESSON; HERRATH, 2004).

Macrófagos representam menos de 1% das células das ilhotas, porém também estão envolvidos no desenvolvimento dessa patologia. Quando os macrófagos são estimulados por fator de necrose tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ), produzem interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) que culmina na ativação do fator de transcrição NF- $\kappa$ B presente nas células  $\beta$ , resultando na estimulação da expressão da NOS. O óxido nítrico produzido por esta enzima reduz a função mitocondrial, levando à menor produção de adenosina trifosfato (ATP) e à redução da secreção de insulina (ZACHARY; BLOOMGARDEN, 2001). Em indivíduos diabéticos, estes processos resultam em um quadro de hipoinsulinemia.

Como consequência da deficiência de insulina, observa-se alterações no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas. A insulina é um hormônio anabólico e está envolvido na absorção de glicose, aminoácidos e ácidos graxos, bem como na síntese de carboidratos, lipídeos e proteínas. Além disso, promove inibição da degradação dessas moléculas. Assim, indivíduos diabéticos não tratados apresentam elevada concentração de glicose plasmática, característica dessa patologia, além de um quadro de dislipidemia e de proteólise de acordo com o estágio de desenvolvimento da doença.

A dislipidemia é caracterizada por aumento de colesterol total, LDL, triacilgliceróis e redução de HDL (NIEMEIJER-KANTERS; BANGA; ERKELENS,

2001). O quadro de dislipidemia se estabelece porque a insulina é necessária para a ativação e inativação de enzimas envolvidas no metabolismo de lipoproteínas. Sem esse hormônio, a lipase sensível a hormônio permanece ativada, liberando ácidos graxos do tecido adiposo para a circulação. O fígado responde aumentando a velocidade de síntese de lipoproteínas ricas em triacilgliceróis. Essas lipoproteínas permanecem por mais tempo na circulação porque a ação da enzima lipase lipoprotéica, que seria ativada pela insulina, fica diminuída (LEWIS; STEINER, 1996; BETTERIDGE, 2001). Assim, em pacientes diabéticos o risco de desenvolvimento de aterosclerose é de duas a quatro vezes maior do que em indivíduos não-diabéticos (BIONDI-ZOCAI et al., 2003).

O diabetes mellitus também resulta em desequilíbrio na razão entre moléculas oxidantes e anti-oxidantes, com um aumento da concentração de radicais livres (BIONDI-ZOCCAI et al., 2003). A hiperglicemia crônica conduz a formação de produtos avançados de glicosilação (AGEs), os quais contribuem para a indução da produção de espécies reativas de oxigênio (HAYEK et al., 2005). Os radicais livres produzidos desencadeiam a peroxidação lipídica das membranas e isso afeta a expressão de moléculas de superfície (PABLO; CIENFUEGOS, 2000). Em patologias onde ocorre um desequilíbrio no balanço oxidativo, como no diabetes, a peroxidação lipídica ocorre em maior grau, podendo influenciar a resposta imunitária.

Indivíduos diabéticos apresentam também aumento da suscetibilidade a infecções fúngicas e bacterianas (NIEMEIJER-KANTERS; BANGA; ERKELENS, 2001), além da ocorrência de infecções mais graves. Isso se deve a uma redução da atividade microbicida de macrófagos e outros leucócitos (LLORENTE et al., 2000).

O diabetes mellitus do tipo 1 pode ser induzido, através da destruição seletiva das células  $\beta$  pancreáticas, com a administração de uma única dose de estreptozotocina. Estudos demonstraram que o diabetes mellitus experimental apresenta reduzida atividade das enzimas  $\Delta 9$ ,  $\Delta 6$  e  $\Delta 5$  dessaturases, levando à diminuição de moléculas contendo ácido araquidônico e aumento de moléculas contendo ácido linoléico (BRENNER; BERNASCONI; GARDA, 2000). Assim, há alteração da composição de ácidos graxos no fígado e em outros tecidos, o que produz

uma importante mudança fisiológica, acarretando em alterações nas propriedades biofísicas das membranas, na cinética de enzimas integrais e em outras funções das membranas (BRENNER; BERNASCONI; GARDA, 2000), o que poderia acarretar na alteração da capacidade microbicida dos macrófagos. Adicionalmente, macrófagos maduros não possuem a  $\Delta 6$  dessaturase, dependendo exclusivamente da atividade dessa enzima presente no fígado para conversão do ácido linoléico em ácido araquidônico. Logo, os fatores que regulam a atividade da enzima hepática influenciam o conteúdo de ácido araquidônico dos macrófagos (KINSELLA; LOKESH, 1990).

## 1.2 MACRÓFAGOS

Os macrófagos derivam da medula óssea, a partir da célula precursora de macrófago e neutrófilo, a CFU-GM (unidade formadora de colônia de granulócito e macrófago), que dará origem ao monoblasto o qual se diferenciará a pró-monócito. Ao se dividirem, os pró-monócitos dão origem aos monócitos, que se dirigem para a corrente sanguínea e aí permanecem por várias horas, na forma de monócitos circulantes (LEE; WANG; MILBRANDT, 1996).

Uma vez na circulação, o monócito migra para diferentes tecidos e cavidades do organismo, diferenciando-se em macrófago, de acordo com o tecido e sua função (TACKE; RANDOLPH, 2006). A migração envolve aderência ao endotélio, transmigração por entre as células endoteliais e, subsequentemente, passagem através de estruturas subendoteliais, processo este dependente de moléculas de adesão. Nestes tecidos e cavidades, o macrófago permanece como célula residente, com pequena atividade funcional. A baixa capacidade de espraiamento, fagocitose e de secreção basal de determinados produtos, tais como, espécies reativas de oxigênio, lisozima e proteinases neutras e ácidas, confere a esta célula fraca capacidade microbicida e fungicida (TAKEMURA; WERB, 1984).

Durante o processo inflamatório, ocorre aumento do número de monócitos circulantes e da sua produção na medula óssea, assim como redução do tempo de permanência dos mesmos na circulação, uma vez que há migração destas células para

o foco da lesão (GRABHER et al., 2007). No sítio inflamatório, o macrófago passa por um processo de ativação, tornando-se apto a desempenhar funções complexas como quimiotaxia, fagocitose, processamento e apresentação de antígenos, lise de parasitas intracelulares e capacidade de morte tumoral. Esta ativação envolve dois estágios distintos: um em que os macrófagos inflamatórios apresentam elevada capacidade secretória, de espraiamento e de fagocitose (GORDON, 1995); e outro estágio em que macrófagos ativados apresentam baixa atividade secretória, porém com marcada capacidade de produção de metabólitos reativos de oxigênio e de óxido nítrico, importantes para sua função microbicida e tumoricida (JORENS; MATTHYS; BULT, 1995).

A potente atividade secretória dos macrófagos determina sua multifuncionalidade e sua participação em diversos processos fisiológicos e fisiopatológicos, dentre esses, a destruição de microorganismos, inflamação, resposta imune e controle do desenvolvimento tumoral (TAPPER, 1996).

Macrófagos também são importantes participantes do desenvolvimento da lesão aterosclerótica e do acúmulo de colesterol (WENDY et al., 2002). A aterosclerose é caracterizada pela ocorrência de *foam cells* (macrófagos carregados de lipídeos) e pela ruptura da camada íntima do vaso sanguíneo. Macrófagos expressam receptores de superfície para LDL oxidada e assim, incorporam esse lipídeo mesmo em excesso. (WICK; KNOFLACH; XU, 2004).

Macrófagos participam da resposta inflamatória através da liberação de citocinas, quimiocinas e fatores que promovem o recrutamento de células para o sítio de infecção ou para o tecido lesado. Adicionalmente, macrófagos ativados desencadeiam rapidamente a expressão de genes responsáveis pela síntese de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (óxido nítrico, ânion superóxido, peróxido de hidrogênio, peroxinitrito, entre outros) e de lipídeos bioativos derivados do ácido araquidônico. Todos esses agentes contribuem para a regulação da resposta inflamatória.

Além disso, macrófagos protegem seu hospedeiro pelo engolfamento de corpos estranhos dentro de fagossomos, um processo dinâmico e desencadeado após reconhecimento e aderência do macrófago ao substrato a ser fagocitado. A fagocitose

inicia-se com o espreadimento, caracterizado pela alteração da forma e redistribuição das organelas citoplasmáticas. As alterações na forma da célula aumentam a área de contato da membrana plasmática do fagócito com o substrato. Durante a aderência, ocorre a ativação de receptores de membrana para moléculas de adesão, ocasionando rearranjo do citoesqueleto celular. O fagossomo formado rapidamente se desenvolve em organelas microbicidas (AMER; SWANSON, 2002). Posteriormente, haverá processamento e apresentação de antígenos aos linfócitos T, contribuindo para a ativação da resposta imune adquirida.

Após a internalização da partícula, a actina-F que envolve o fagossomo é despolimerizada e assim essa vesícula se torna acessível ao endossoma precoce (SWANSON; BAER, 1995). Por meio de uma série de eventos de fusão, a membrana vacuolar e seu conteúdo fusionam-se com o endossoma tardio e finalmente com o lisossomo, para formar o fagolisossoma. A taxa de fusão fagossomo-lisossoma varia drasticamente, dependendo da natureza da partícula ingerida.

Posteriormente à formação do fagolisossomo, haverá produção de espécies reativas de oxigênio, em um processo denominado *burst oxidativo*, garantindo assim, a morte do patógeno e consequente proteção do hospedeiro (BABIOR, 1999). Estes produtos tóxicos do oxigênio também funcionam como segundos mensageiros e moduladores do sistema imunitário (HUBERT; MARTHA; PIGANELLI, 2004).

A NADPH oxidase de fagócitos profissionais como neutrófilos, macrófagos e eosinófilos é um complexo que catalisa a produção de ânion superóxido durante a fagocitose, a partir do NADPH (Esquema 1) (VIGNAIS, 2002).



O ânion superóxido produzido é liberado para o meio extracelular ou para o interior do vacúolo fagocítico. Em seguida, é convertido rapidamente em peróxido de hidrogênio, por dismutação. Na presença de sais de ferro, o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio formam radical hidroxil (OH<sup>•</sup>). O peróxido de hidrogênio reage com ânions cloro para gerar ácido hipocloroso. Por causa de suas potentes propriedades antibacterianas, esses derivados de oxigênio, denominados espécies

reativas de oxigênio, participam da morte de microorganismos durante a fagocitose (VIGNAIS, 2002).

Sabe-se que os intermediários reativos de oxigênio apresentam papel na morte de patógenos. Porém, há indícios que a produção de óxido nítrico seja o mecanismo antimicrobiano mais acentuado de macrófagos (MACMICKING; XIE; NATHAN, 1997).

O óxido nítrico é um gás solúvel em água e em lipídeos, considerado uma espécie reativa de nitrogênio. É sintetizado pela ação da enzima óxido nítrico sintase (NOS) que é expressa como três isoformas distintas em mamíferos (MICHEL; XIE; NATHAN, 1995), sendo a óxido nítrico sintase induzível (iNOS) a isoforma presente nos macrófagos, pois sua expressão ocorre sob indução. Numerosos produtos microbianos e citocinas estimulam a expressão da iNOS, por exemplo o lipopolissacarídeo (LPS). A síntese de óxido nítrico envolve duas etapas. Na primeira ocorre a hidroxilação de um dos nitrogênios guanidinos da L-arginina para gerar N-hidroxi-L-arginina (NHA). Esta reação utiliza NADPH e oxigênio e, provavelmente envolve o complexo heme da iNOS. Na segunda etapa, ocorre a conversão da NHA em óxido nítrico e citrulina. (MARLETTA, 1994).

O óxido nítrico produzido possui ação citotóxica e citostática, promovendo a destruição de agentes infecciosos de muitas classes, incluindo vírus, bactérias (KARUPIAH et al., 1993), *Leishmania major* (STENGER et al., 1994), *Cryptococcus neoformans* (GOLDMAN et al., 1996), entre outros. Além disso, estudos demonstram que o óxido nítrico é efetivo contra células tumorais (MACMICKING; XIE; NATHAN, 1997). A citotoxicidade do óxido nítrico resulta da sua ação direta ou da sua reação com outros compostos liberados durante o processo inflamatório. A base bioquímica para a ação direta do óxido nítrico consiste na sua reação com metais presentes nas enzimas, principalmente o ferro. Desta forma, enzimas cruciais para o ciclo de Krebs, para a cadeia transportadora de elétrons, para a síntese de DNA e para o mecanismo de proliferação celular são inativadas. A ação citotóxica indireta do óxido nítrico consiste, principalmente, na sua reação com os intermediários reativos do oxigênio, como a reação entre o óxido nítrico e o ânion superóxido que resulta na formação de peroxinitrito, um poderoso oxidante de proteínas. O peroxinitrito pode,

posteriormente, protonar-se na presença de íon hidrogênio, originando um radical altamente reativo e tóxico, o hidroxil, aumentando efetivamente a ação tóxica do óxido nítrico e do ânion superóxido (BECKMAN; KOPPENOL, 1996). Logo, a regulação da produção dessas moléculas é crítica para a sobrevivência do hospedeiro (RATNAM; MOOKERJEA, 1998).

Os lipídeos que compõem a dieta modificam o metabolismo e o perfil lipídico de tecidos e plasma (CALDER et al., 2002; GUIMARÃES et al., 1995), podendo assim modular a funcionalidade de macrófagos. Estudos demonstram que a suplementação da dieta com lipídeos como óleo de peixe e de girassol (JEFFERY et al., 1998) bem como óleo de soja e gordura de coco (MIYASAKA et al., 1998; MILES; FIONA; CALDER, 2000) influenciam a resposta dessas células. DECKERE et al. (1988) observaram que as lipoproteínas também apresentam efeitos sobre as células do sistema imunitário. Assim, a suplementação da dieta com lecitina de soja, um agente hipolipemiante, poderia modular a funcionalidade dos macrófagos, bem como sua morfologia. Embora a lecitina venha sendo empregada por diabéticos para reduzir a hiperlipidemia, os efeitos desta suplementação sobre os macrófagos de ratos diabéticos ainda não foram investigados.

## 2. OBJETIVOS

Verificar os efeitos da suplementação da dieta com lecitina de soja sobre a funcionalidade e a morfologia de macrófagos peritoneais de ratos Wistar diabéticos, e investigar alguns dos possíveis mecanismos envolvidos nessas alterações. Os seguintes parâmetros foram avaliados:

- Morfologia;
- Capacidade de adesão;
- Capacidade de espraiamento;
- Atividade fagocítica;
- Volume lisossomal;
- Produção de óxido nítrico;
- Produção de ânion superóxido;
- Atividade da catalase;
- Conteúdo de ácidos graxos presentes nos lipídeos totais e na fração de fosfolipídeos dos macrófagos;
- Concentração de glucose e lipídeos séricos.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 ANIMAIS

Para a realização dos experimentos foram utilizados ratos machos ( $200\pm 30$  g), da linhagem Wistar, obtidos do biotério da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram mantidos com livre acesso à água e ração, em ambiente com ciclo claro-escuro de 12/12 horas. Os animais foram divididos em quatro grupos: controle (C), suplementado (S), diabético (D) e diabético suplementado (DS). Os procedimentos experimentais foram realizados com a aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA), protocolo nº. 169 (Anexo).

#### 3.2 INDUÇÃO DO QUADRO DE DIABETES

Os animais foram mantidos em jejum por 12 horas antes do início dos procedimentos. Os grupos diabético e diabético suplementado receberam injeção intravenosa de 60 mg/kg peso corporal de estreptozotocina (Sigma) em tampão citrato (pH 4,8). Os grupos controle e suplementado receberam apenas o veículo. Os animais receberam água e comida *ad libitum* após 1 hora da injeção. Foram considerados diabéticos os animais que apresentaram concentração plasmática de glicose superior ou igual a 220 mg/dL, após punção cardíaca realizada no quinto dia após a injeção.

#### 3.3 SUPLEMENTAÇÃO

A suplementação foi iniciada após dois dias da indução do quadro de diabetes. Os grupos suplementado e diabético suplementado receberam lecitina de soja (Herbarium), na dose de 2 g/kg peso corporal, por 21 dias consecutivos. A lecitina foi administrada por via oral, com auxílio de uma seringa de insulina. O monitoramento do peso corporal foi realizado a cada dois dias.

### 3.4 COLETA DAS AMOSTRAS

Os animais foram decapitados para coleta de sangue. Este foi centrifugado durante 10 minutos a 290 g. O soro foi então separado para realizar a dosagem de glucose, triacilgliceróis, colesterol HDL e colesterol total.

Os macrófagos peritoneais foram coletados por laparotomia mediana. Para tanto, a pele da região abdominal foi retirada e foram injetados 20 mL de tampão fosfato (PBS) na cavidade peritoneal dos animais. Após 30 segundos de massagem abdominal, o fluido foi aspirado com uma pipeta Pasteur de plástico. O fluido foi mantido em tubo plástico em banho de gelo. As células foram centrifugadas por 7 minutos a 290 g e lavadas com 40 mL de PBS três vezes. Ao final deste procedimento, os macrófagos foram ressuspensos em meio de cultura suplementado com 10 % soro fetal bovino e 0,1 % de antibiótico (penicilina e estreptomicina).

### 3.5 CULTURA DE MACRÓFAGOS

$2.10^5$  células por poço foram incubadas em uma placa de 96 poços, por 1 hora a 37°C. Os poços foram lavados duas vezes com 200 µL de PBS para remoção de células não aderidas.

Nos ensaios em que foi realizado cultivo por 24 horas, a coleta foi realizada de maneira asséptica e o procedimento foi realizado em fluxo laminar.

### 3.6 MORFOLOGIA

A morfologia dos macrófagos foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura. Para tanto, as células foram cultivadas em placas de 24 poços contendo lamínulas redondas, por 24 horas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Após esse período, foram lavadas uma vez com PBS e duas vezes com tampão cacodilato 0,1 M e em seguida fixadas com glutaraldeído 3% em tampão cacodilato 0,1 M durante 2 horas. A desidratação foi realizada em etanol 50%, 70%, 80%, 90% e 100% consecutivamente, seguida do ponto crítico em CO<sub>2</sub> (CDP – Balzers) e metalização com ouro (SCD-030- Balzers-

Union SL 9496). As células foram analisadas em Microscópio Eletrônico de Varredura (JEOL), do Centro de Microscopia da Universidade Federal do Paraná.

### 3.7 CAPACIDADE DE ESPRAIAMENTO

Para determinação da capacidade de espraiamento dos macrófagos, estes foram incubados por 24 horas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> em placas de 24 escavações contendo lamínulas redondas. As células foram lavadas com PBS e fixadas com Bouin (75 mL de ácido pícrico saturado, 25 mL de formaldeído 40% e 5 mL de ácido acético glacial) durante 5 minutos. Após, as escavações foram lavadas três vezes com etanol 70% seguida de lavagem com água destilada. Os macrófagos foram corados com giemsa e após uma hora foram tratados na seguinte bateria de soluções: etanol 50%, etanol 70%, etanol 80%, etanol 90%, etanol 100%, etanol 100%, etanol:xilol 2:1, etanol:xilol 1:1, etanol:xilol 1:2 e em xilol puro. Para isso, as lamínulas foram rapidamente imergidas, 10 vezes consecutivas, em cada uma dessas soluções. Em seguida a lâmina permanente foi montada, sobrepondo a lamínula sobre uma lâmina contendo resina Permount. A porcentagem de células espraiadas foi determinada para cada amostra de 100 células, utilizando-se Microscópio Óptico (Carl Zeiss), e os resultados foram expressos em porcentagem de células espraiadas.

### 3.8 CAPACIDADE DE ADESÃO

A técnica foi realizada segundo ROSEN e GORDON (1987). Macrófagos peritoneais foram incubados por 24 horas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>. Após, as escavações foram lavadas com PBS e as células aderentes foram fixadas com metanol 50% durante 10 minutos. Solução de giemsa 0,1% foi adicionado e após 40 minutos os poços foram lavados com PBS e o corante foi solubilizado com metanol 50%. A absorbância foi medida a 550 nm, em leitor de microplacas e os resultados foram expressos em porcentagem, sendo o grupo controle considerado como 100%.

### 3.9 ATIVIDADE FAGOCÍTICA

A capacidade fagocítica dos macrófagos foi estimada pela incorporação de zimosan não opsonizado, corado com vermelho neutro como descrito por PIPE; COLES; FARLEY (1995). Para tanto, as células foram incubadas na presença de zimosan ( $1.10^8$  partículas/mL) por 30 minutos. A fagocitose foi paralisada pela adição de 200  $\mu$ L de fixador Baker (formaldeído 4%, cloreto de sódio 2% e acetato de cálcio 1%), e após 30 minutos as escavações foram lavadas por centrifugação, com PBS. As células foram incubadas por mais 30 minutos com 200  $\mu$ L de solução de extração (ácido acético 10% e etanol 40% em água destilada) e a absorbância foi medida a 550 nm. A atividade fagocítica foi expressa em porcentagem em relação ao grupo controle.

### 3.10 VOLUME LISOSSOMAL

Este ensaio, que avalia as vesículas do compartimento endocítico, através da retenção lisossomal de vermelho neutro, foi realizado segundo PIPE; COLES; FARLEY (1995). Macrófagos peritoneais foram incubados durante 30 minutos na presença de vermelho neutro 0,04%. Após, as escavações foram lavadas por centrifugação e o corante foi solubilizado pela adição de 200  $\mu$ L de solução de extração. As células foram incubadas por 30 minutos e após, as amostras foram lidas em leitor de microplacas a 550 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem, sendo o grupo controle considerado como 100%.

### 3.11 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

Macrófagos peritoneais foram cultivados por 24 horas na presença de 10  $\mu$ g/mL de lipopolissacarídeo de *E. coli* (LPS). A placa foi centrifugada a 4°C, 453 g por 5 minutos e após, o sobrenadante foi recolhido e misturado com reagente de Griess, na proporção de 1:1. (STUEHR; MARLETTA, 1985). A leitura das absorbâncias foi realizada em leitor de microplacas a 550 nm, sendo os resultados expressos em absorbância.

O reagente de Griess consiste da mistura 1:1 das soluções estoque de cloreto de naftiletilenodiamina 0,1% em água e de sulfanilamida 1% em  $H_3PO_4$  5%. Este reagente foi preparado no momento do uso.

### 3.12 PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO

A produção de ânion superóxido foi estimada através da redução do NBT (*nitroblue tetrazolium*), um composto amarelo lipossolúvel que se torna insolúvel e de cor azul no seu estado reduzido (MADHAVI; DAS, 1994). Macrófagos foram incubados, na ausência de luz, por 1 hora na presença de NBT 0,2% e PMA 400 nM, a 37°C. Após, a placa foi centrifugada e o sobrenadante desprezado. Procedeu-se a lavagem dos poços, por centrifugação, com PBS. As células foram fixadas com metanol 50% durante 10 minutos e foram adicionados 120  $\mu$ L de KOH 2 M e 140  $\mu$ L de dimetilsulfóxido. Após 30 minutos realizou-se a leitura a 550 nm e os resultados foram expressos em porcentagem, sendo o grupo controle não estimulado considerado como 100%.

### 3.13 ATIVIDADE DA CATALASE

A atividade da enzima catalase foi medida segundo o método descrito por AEBI (1984). Primeiramente lisou-se as células por ultra-sonicação (6 ciclos e 4 s) e centrifugou-se a 4°C, 10621 g por 20 minutos para obtenção da fração  $S_9$ . Após, misturou-se o sobrenadante obtido com o meio reacional (peróxido de hidrogênio 20 mM, tampão tris 0,05 M e EDTA 0,25 mM; pH 7,4), o qual foi mantido a 37°C. A absorbância foi lida a 240 nm, a cada 2 segundos, durante 1 minuto. Os resultados foram expressos em  $mmol H_2O_2 \cdot min^{-1} \cdot mg \text{ proteínas}^{-1}$ .

#### 3.13.1 Dosagem de Proteínas

A dosagem da concentração de proteínas foi realizada segundo BRADFORD (1976). Para tanto, 10  $\mu$ L do sobrenadante, obtido após ultra-sonicação e

centrifugação dos macrófagos, foi misturado com 250  $\mu\text{L}$  do reagente de Bradford. A mistura foi incubada por 5 minutos na ausência de luz e a absorbância foi medida em 595 nm. A concentração foi calculada através da curva padrão feita com diferentes concentrações de soro albumina bovina (50 a 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ).

### 3.14 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE ÁCIDOS GRAXOS PRESENTES NOS LIPÍDEOS TOTAIS DOS MACRÓFAGOS

#### 3.14.1 Extração Lipídica

A extração lipídica foi realizada segundo o método de FOLCH et al. (1957) modificado. Às amostras foram adicionados 400  $\mu\text{L}$  de PBS, 500  $\mu\text{L}$  de metanol e 1 mL de clorofórmio. Após agitação e centrifugação por 2 minutos a 4°C e 453 g, a fase inferior foi transferida para outro tubo. Esse procedimento foi repetido pela adição de 500  $\mu\text{L}$  de metanol e 500  $\mu\text{L}$  de clorofórmio nas amostras. Aos extratos lipídicos foi adicionado 1 mL de solução de Folch (clorofórmio/ metanol/ água, 3:48:47) seguida de agitação e centrifugação nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e a fase orgânica foi evaporada em fluxo de nitrogênio gasoso a 37°C.

#### 3.14.2 Saponificação

Após a extração lipídica, foi realizada a saponificação pelo método de HAMILTON; HAMILTON (1992), modificado por NISHIYAMA-NAKURE et al. (1998). Os extratos lipídicos foram ressuspensos em 100  $\mu\text{L}$  de metanol e a eles foram adicionados 2 mL de NaOH 0,5 M em metanol 90%. As amostras foram homogeneizadas e incubadas sob agitação (60 rpm) por 2h a 37°C, para hidrólise alcalina. Em seguida foram resfriadas e misturadas com 1,5 mL de ácido clorídrico 1M para acidificação. Os ácidos graxos foram então extraídos três vezes com 1 mL de hexano. As amostras foram secas em fluxo de nitrogênio gasoso a 37°C.

### 3.14.3 Derivatização

A derivatização foi realizada de acordo com o método descrito por ABUSHUFA et al. (1994). As amostras foram ressuspensas em 100  $\mu$ L de acetonitrila (Merck) e agitadas durante 30 segundos. Foram adicionados 100  $\mu$ L do reagente A (bromometil-metóxi-cumarina 1 mg/mL em acetonitrila) e 100  $\mu$ L do reagente B (18-Crown-6 e carbonato de potássio em acetonitrila e água), seguida de agitação e incubação por 15 minutos a 60°C. A mistura foi filtrada e armazenada a 8°C até o momento da análise da composição dos ácidos graxos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

### 3.14.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Foram utilizadas uma pré-coluna, uma coluna C-8 de fase reversa (250 mm comprimento x 4,6 mm diâmetro interno x 5  $\mu$ m diâmetro das partículas) e um detector de fluorescência. O comprimento de onda de excitação foi de 325 nm e de emissão de 398 nm. O volume injetado foi de 50  $\mu$ L em fluxo de 1,2 mL/min. A fase móvel era composta por acetonitrila e água, cujo gradiente inicial era de 77% e 23% e final de 90% e 10% respectivamente. O tempo de corrida foi de 40 minutos.

Foram utilizados os seguintes padrões de ácido graxos: ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoléico (C16:1 n-7), ácido esteárico (C18:0), ácido oléico (C18:1 n-9), ácido linoléico (C18:2 n-6), ácido linolênico (C18:3 n-3), ácido araquidônico (20:4 n-6), ácido eicosapentaenóico (C20:5 n-3) e ácido docosaheptaenóico (C22:6 n-3).

## 3.15 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE ÁCIDOS GRAXOS PRESENTES NA FRAÇÃO DE FOSFOLÍPÍDEOS DOS MACRÓFAGOS

A extração lipídica foi realizada conforme descrito no item 3.14.1. Em seguida as amostras foram ressuspensas em solução de BHT 0,05% em clorofórmio/metanol (2:1), para separação da fração de fosfolípidos por cromatografia em camada delgada. Para tanto, ativou-se a placa de sílica gel a 120°C por 30 minutos. Após

resfriamento as amostras foram aplicadas. A corrida de 12 cm foi realizada utilizando-se fase móvel composta por hexano, éter dietílico, ácido acético (70:30:1). A fração de fosfolípidos foi transferida para tubo de ensaio (OHTA et al., 1990). Após, foi realizada a saponificação, derivatização e análise por HPLC conforme descrito no item 3.14.

### 3.16 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE ÁCIDOS GRAXOS PRESENTES NA LECITINA DE SOJA E NA RAÇÃO

A determinação do conteúdo de ácidos graxos da ração utilizada na alimentação dos animais e da lecitina de soja foi realizada segundo descrito no item 3.14.

### 3.17 DOSAGENS BIOQUÍMICAS

As concentrações séricas de glucose, triacilglicerol, colesterol total e colesterol HDL foram determinadas através da utilização de kits enzimáticos obtidos comercialmente (Laborclin®). O princípio baseia-se na produção de um composto colorido, cuja intensidade de cor é proporcional à concentração do analito.

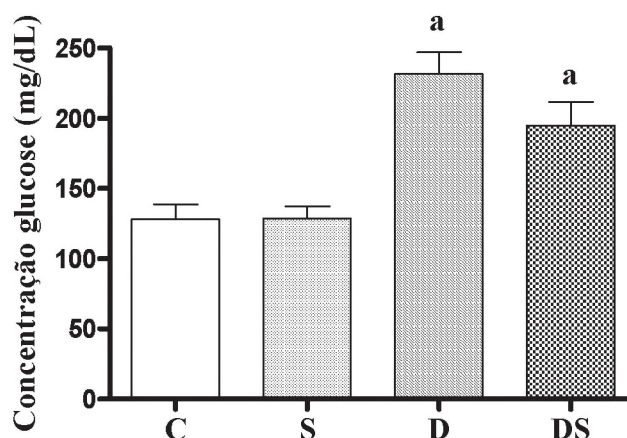
### 3.18 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média de no mínimo três preparações. As comparações estatísticas entre os grupos foram realizadas empregando-se o teste ANOVA de duas vias e o teste *t* de Student. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para  $P < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

### 4.1 CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE GLUCOSE

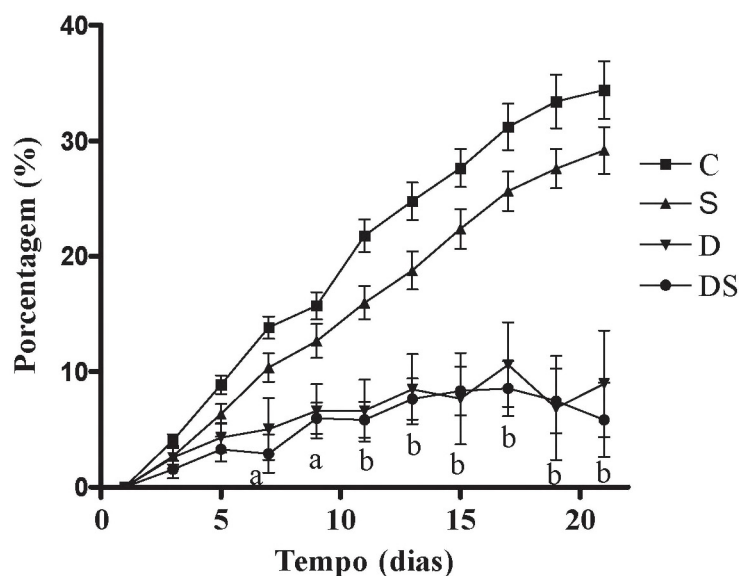
Como observado na Figura 2, o grupo controle apresentou glicemia média de  $128 \pm 10$  mg/dL enquanto o grupo diabético apresentou  $231 \pm 15$  mg/dL. O grupo diabético suplementado apresentou glicemia média de  $194 \pm 17$  mg/dL, inferior à encontrada no grupo diabético. Porém esses valores não foram considerados estatisticamente diferentes.



**Figura 2** - Concentração sérica de glucose de animais mantidos em jejum por 12 horas. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, para  $n = 21$ . C - controle, S - suplementado com lecitina de soja, D - diabético e DS - diabético suplementado com lecitina de soja. A letra *a* indica  $P < 0,005$  comparado com C.

### 4.2 PESO DOS ANIMAIS

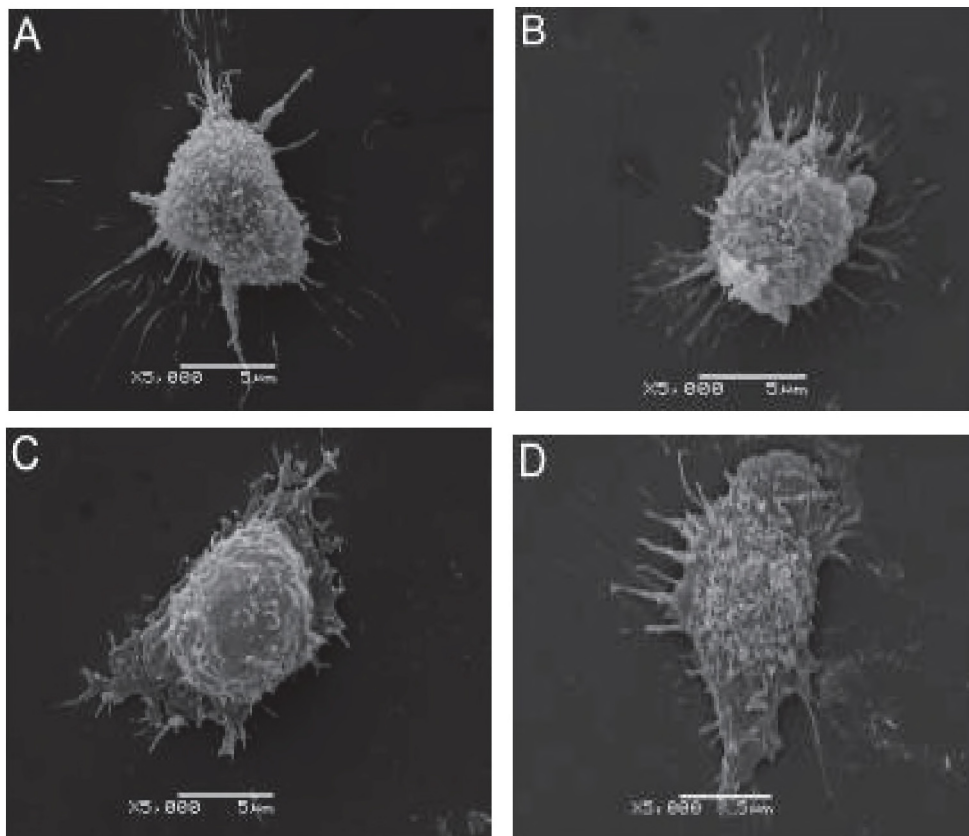
O ganho de peso corporal durante os 21 dias de monitoramento foi de  $34,4 \pm 2,5\%$  para os animais não tratados com estreptozotocina enquanto que os animais tratados com essa droga apresentaram ganho de peso inferior, equivalente a  $8,9 \pm 4,6\%$  (Figura 3). O grupo suplementado com lecitina de soja apresentou ganho equivalente ao grupo controle ( $29,2 \pm 2,0\%$ ) e o grupo diabético suplementado apresentou ganho de peso de  $5,8 \pm 3,2\%$ , não apresentando diferenças estatisticamente significativas ao se comparar com o grupo diabético.



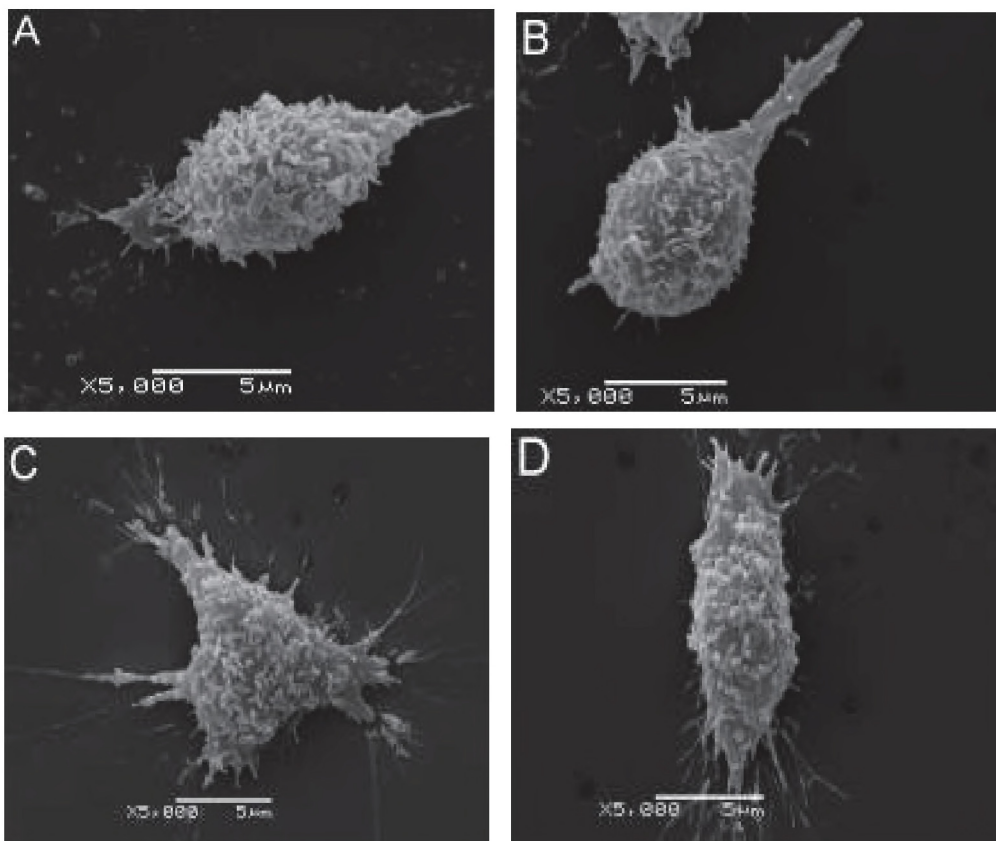
**Figura 3** - Ganho de peso dos animais, monitorado a cada dois dias em um período de 21 dias. C - controle, S - suplementado com lecitina de soja, D - diabético e DS - diabético suplementado com lecitina de soja. Os resultados foram expressos como percentual  $\pm$  erro padrão da média, considerando-se o peso do primeiro dia de monitoramento como 0% (n=22). A letra *a* indica  $P < 0,05$  comparado com C, *b* indica  $P < 0,001$  comparado com C.

#### 4.3 MORFOLOGIA

As imagens obtidas em microscopia eletrônica de varredura mostram que a suplementação da dieta com lecitina de soja provoca mudanças estruturais nos macrófagos (Figuras 4 e 5). Observou-se aumento evidente do número e tamanho de lamelipódios do grupo suplementado em comparação com o grupo controle. Houve também alteração do tamanho e formato das células, as quais passaram do formato esférico para a forma espreada, caracterizada pelo aumento do diâmetro do corpo celular. Estas características observadas após tratamento com lecitina são típicas de macrófagos ativados. Não houve alteração do número de filopódios. Macrófagos do grupo diabético apresentaram-se no formato esférico, com pequeno número de filopódios e lamelipódios, característico de células não ativadas. Já os macrófagos de animais diabéticos tratados com lecitina de soja apresentaram-se na forma espreada, além de possuírem filopódios e lamelipódios mais longos e em maior número.



**Figura 4** - Macrófagos peritoneais do grupo controle (A e B) e do grupo suplementado (C e D), após 24 horas de cultivo, em experimento ex vivo. As imagens foram obtidas em Microscópio Eletrônico de Varredura. Observa-se aumento do número e tamanho de lamelipódios e alteração do tamanho e da forma celular no grupo suplementado ao compará-lo com o grupo controle.

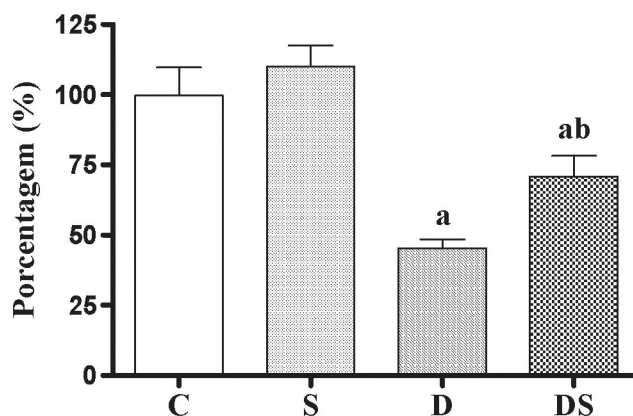


**Figura 5** - Macrófagos peritoneais do grupo diabético (A e B) e do grupo diabético suplementado (C e D), após 24 horas de cultivo em experimento ex vivo. As imagens foram obtidas em Microscópio Eletrônico de Varredura. Observa-se aumento do número e tamanho de lamelipódios e alteração do tamanho e da forma celular no grupo diabético suplementado ao compará-lo com o grupo diabético.

#### 4.4 CAPACIDADE DE ADESÃO

Macrófagos de ratos diabéticos apresentaram redução de 54,4% na capacidade de adesão em relação ao grupo controle, enquanto que o grupo diabético suplementado apresentou redução menos acentuada (29,1%), indicando que a lecitina de soja foi capaz de modular a adesão de macrófagos sob esta condição patológica. O grupo diabético suplementado aumentou em 56,2% sua capacidade de adesão comparado ao grupo diabético ( $70.9 \pm 7.4\%$  e  $45.4 \pm 3,2\%$ , respectivamente).

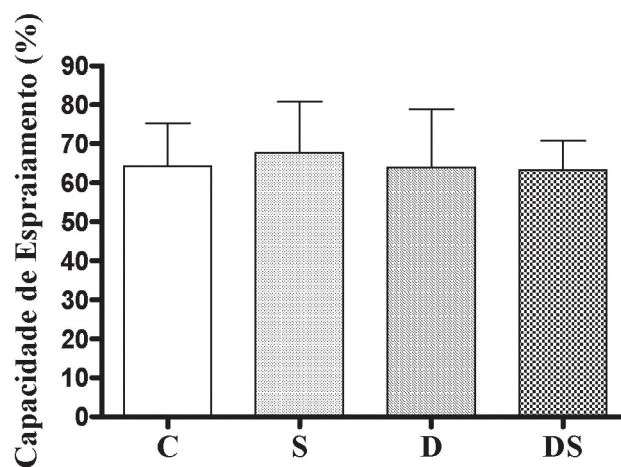
A suplementação da dieta de ratos Wistar saudáveis com lecitina de soja não alterou a capacidade de adesão dos macrófagos peritoneais (Figura 6).



**Figura 6** - Capacidade de adesão de macrófagos cultivados por 24 horas a 37°C obtidos de animais do grupo controle (C), suplementado com lecitina de soja (S), diabético (D) e diabético suplementado com lecitina de soja (DS). Os resultados foram expressos como média percentual  $\pm$  erro padrão da média, para  $n=27$ . A letra *a* indica  $P<0,05$  comparado com C, *b*  $P<0,05$  comparado com D.

#### 4.5 CAPACIDADE DE ESPRAIAMENTO

Conforme mostrado na Figura 7, a suplementação da dieta de ratos Wistar com lecitina de soja não alterou a capacidade de espreiamento dos macrófagos. O grupo diabético também não promoveu alterações nesse parâmetro analisado, comparando com o grupo controle. A Figura 8 mostra macrófagos espreiados e não espreiados, após cultivo por 24 horas.



**Figura 7** - Capacidade de Espreadimento de macrófagos cultivados por 24h a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, fixados em Bouin e corados com Giemsa. C - controle, S - suplementado com lecitina de soja, D - diabético e DS - diabético suplementado com lecitina de soja. Os resultados foram expressos como porcentagem de células espreadas ± erro padrão da média, para n=12.

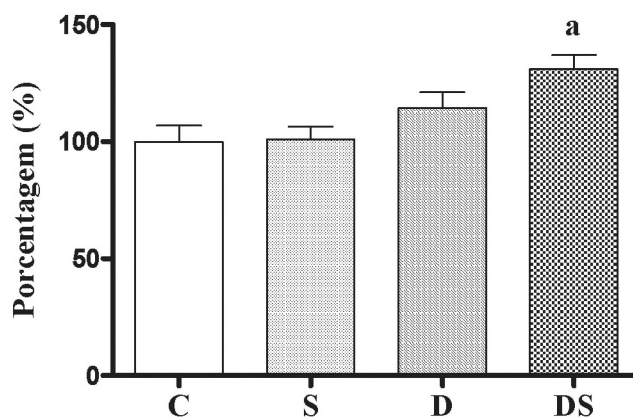


**Figura 8** - Fotomicrografia de macrófagos cultivados por 24 horas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, fixados em Bouin e corados com Giemsa. As imagens foram obtidas em microscópio óptico (Zeiss). As setas indicam macrófagos espreados. Aumento 400 vezes.

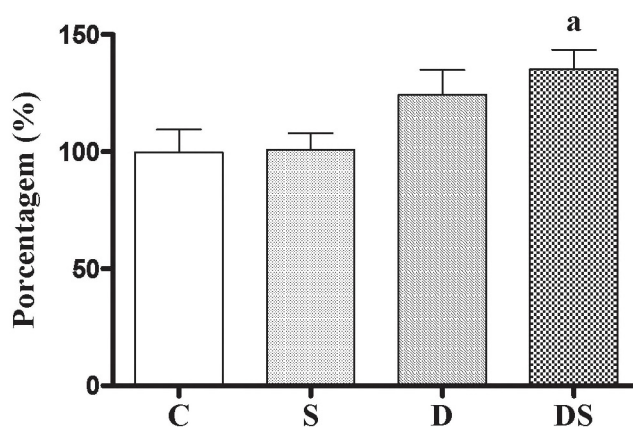
#### 4.6 ATIVIDADE FAGOCÍTICA E VOLUME LISOSSOMAL

A lecitina de soja não foi capaz de alterar o volume lisossomal tampouco a atividade fagocítica de macrófagos obtidos de animais saudáveis (Figura 9 e 10

respectivamente). Contudo, aumentou em 31,1% o volume lisossomal e em 35,5% a capacidade fagocítica do grupo diabético suplementado comparando-se com o controle. O grupo diabético não apresentou valores estatisticamente diferentes do grupo controle, em ambos os ensaios.



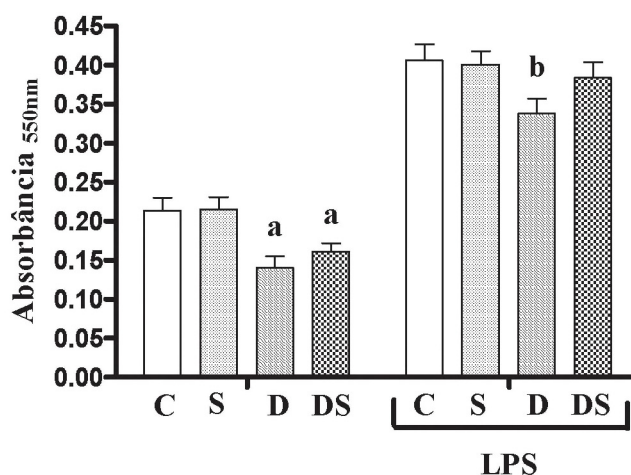
**Figura 9** – Volume lisossomal de macrófagos obtidos de animais do grupo controle (C), suplementado com lecitina de soja (S), diabético (D) e diabético suplementado com lecitina de soja (DS). Os resultados foram expressos como média percentual  $\pm$  erro padrão da média, para  $n=34$ . A letra *a* indica  $P<0,01$  comparado com C.



**Figura 10** - Atividade fagocítica de macrófagos incubados com zimosan não opsonizado. C - controle, S - suplementado com lecitina de soja, D - diabético e DS - diabético suplementado com lecitina de soja. Os resultados foram expressos como média percentual  $\pm$  erro padrão da média, para  $n=27$ . A letra *a* indica  $P<0,01$  comparado com C.

#### 4.7 PRODUÇÃO DE ÓXIDO NÍTRICO

Macrófagos de ratos diabéticos apresentaram redução na produção de óxido nítrico, quando cultivados na presença (16,8%) ou ausência (34,6%) de LPS (Figura 11). O grupo diabético suplementado não apresentou diferença estatisticamente significativa da produção de óxido nítrico por macrófagos estimulados em relação ao grupo controle. Já na ausência de estímulo, esse grupo mostrou produção inferior ao grupo controle. No grupo suplementado a produção basal de óxido nítrico e a produção deste sob estímulo com LPS não foram alteradas.



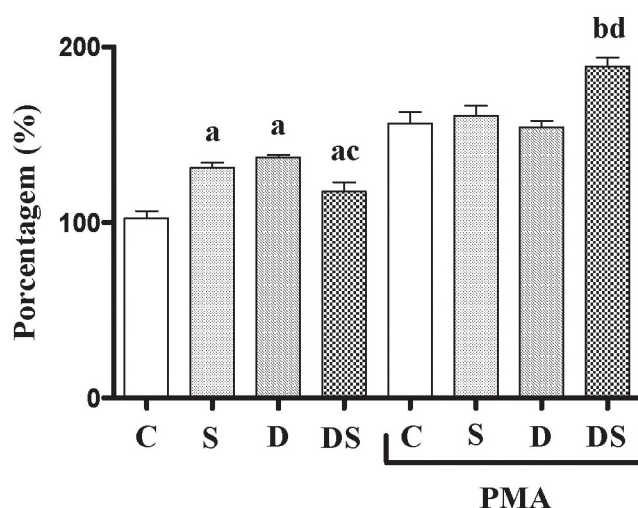
**Figura 11** - Produção de óxido nítrico por macrófagos incubados por 24 horas a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> na presença ou ausência de lipopolissacarídeo (LPS). C - controle, S - suplementado com lecitina de soja, D - diabético e DS - diabético suplementado com lecitina de soja. Os resultados foram expressos como absorbância  $\pm$  erro padrão da média, para n=40. A letra *a* indica  $P < 0,05$  comparado com o grupo controle não estimulado, *b* indica  $P < 0,05$  comparado com o grupo controle estimulado por LPS.

#### 4.8 PRODUÇÃO DE ÂNION SUPERÓXIDO

Os resultados expressos na Figura 12 mostram que a suplementação com lecitina de soja é capaz de modular a produção de ânion superóxido por macrófagos. A síntese basal desse radical livre aumentou 28,9% nos animais saudáveis suplementados com lecitina de soja em relação ao grupo controle. Na condição patológica do diabetes também se observou aumento da produção basal desse radical

livre. Quando animais diabéticos foram tratados com lecitina de soja observou-se diminuição de 14,2% da produção de ânion superóxido quando comparado com o grupo diabético.

Sob estímulo por PMA, macrófagos do grupo controle aumentaram em 54,2% a produção de ânion superóxido e macrófagos do grupo diabético aumentaram em 52,1%. O grupo diabético suplementado mostrou aumento mais acentuado (89,1%), conduzindo a diferenças significativas entre o grupo diabético e o grupo diabético suplementado com lecitina ( $154,5 \pm 3,6\%$  vs  $189,1 \pm 5,0\%$  respectivamente).

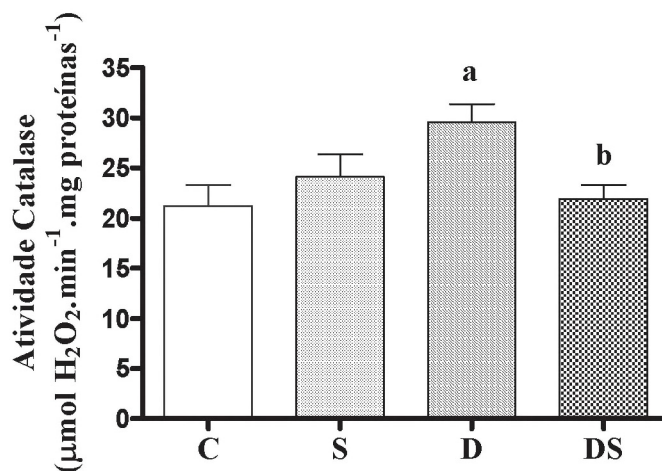


**Figura 12** - Produção de ânion superóxido por macrófagos cultivados na presença ou ausência de PMA. C - controle, S - suplementado com lecitina de soja, D - diabético e DS - diabético suplementado com lecitina de soja. Os resultados foram expressos como média percentual  $\pm$  erro padrão da média, para  $n=12$ . A letra *a* indica  $P<0,05$  comparado com o grupo controle não estimulado, *b* indica  $P<0,001$  comparado com o grupo controle estimulado por PMA, *c* indica  $P<0,05$  comparado com o grupo diabético não estimulado, *d* indica  $P<0,001$  comparado com o grupo diabético estimulado por PMA.

#### 4.9 ATIVIDADE DA CATALASE

Para avaliar o sistema antioxidante dos macrófagos, dosou-se a atividade da catalase. Observou-se que a atividade dessa enzima está elevada em animais diabéticos ( $21,2 \pm 2,1$  e  $29,5 \pm 1,8 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg proteínas}^{-1}$ , para os grupos controle e diabético respectivamente) (Figura 13). Observou-se redução de 25,9% no

grupo diabético suplementado, comparando-se com o grupo diabético. O grupo suplementado não mostrou diferenças estatísticas em relação ao grupo controle.



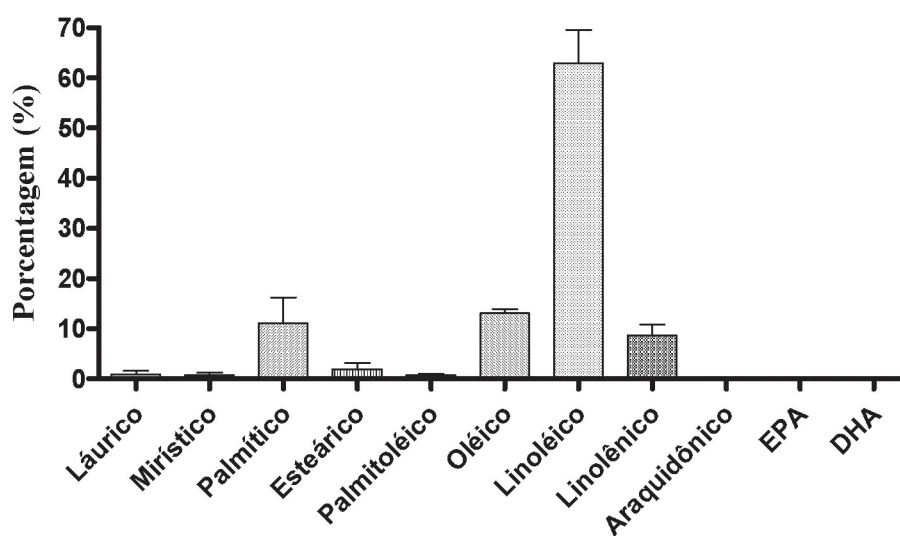
**Figura 13** - Atividade da catalase de macrófagos obtidos de animais do grupo controle (C), suplementado com lecitina de soja (S), diabético (D) e diabético suplementado com lecitina de soja (DS). A atividade enzimática foi expressa como µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> degradado/min.mg proteínas ± erro padrão da média, para n=36. A letra *a* indica  $P < 0,05$  comparado com o grupo controle, *b* indica  $P < 0,05$  comparado com o grupo diabético.

#### 4.10 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE ÁCIDOS GRAXOS PRESENTES NA LECITINA DE SOJA

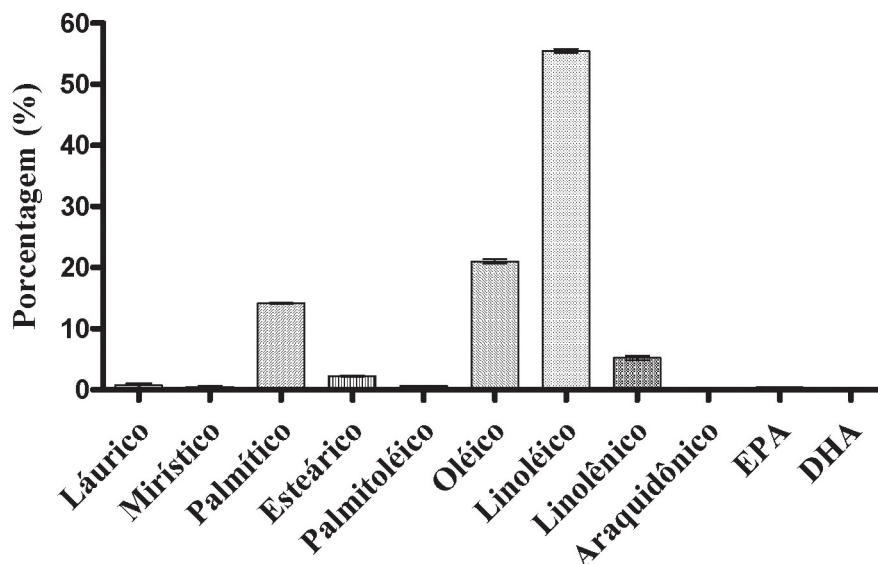
A análise da lecitina de soja por HPLC (Figura 14) demonstrou que esse lipídeo é rico em ácido linoléico (C18:2 n-6), o qual representa  $62,94 \pm 6,64\%$  do total de ácidos graxos, apresentando também  $13,01 \pm 0,88\%$  de ácido oléico (C18:1 n-9),  $11,04 \pm 5,16\%$  de ácido palmítico (C16:0) e  $8,71 \pm 2,12\%$  de ácido linolênico (C18:3 n-3). Os ácidos mirístico (C14:0), esteárico (C18:0), palmitoléico (C16:1 n-7) e EPA (C20:5 n-3) apresentam-se em concentrações inferiores a 2%. Os ácidos graxos insaturados correspondem a  $85,43 \pm 7,49\%$  dos ácidos graxos totais da lecitina de soja, enquanto os saturados correspondem a  $14,57 \pm 7,49\%$ .

#### 4.11 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE ÁCIDOS GRAXOS PRESENTES NA RAÇÃO

A composição de ácidos graxos da ração utilizada na alimentação dos animais apresentou perfil de ácidos graxos equivalente ao da lecitina de soja (Figura 15). A fração lipídica da ração é constituída por  $55,49 \pm 0,34\%$  de ácido linoléico (C18:2 n-6),  $21,03 \pm 0,35\%$  de ácido oléico (C18:1 n-9),  $14,14 \pm 0,09\%$  de ácido palmítico (C16:0) e  $5,24 \pm 0,35\%$  de ácido linolênico (C18:3 n-3). Os ácidos mirístico (C14:0), esteárico (C18:0), palmitoléico (C16:1 n-7) e EPA (C20:5 n-3) foram encontrados em pequenas concentrações. Os ácidos graxos insaturados somaram  $82,41 \pm 0,25\%$  enquanto os saturados somaram  $17,59 \pm 0,25\%$ .



**Figura 14** - Perfil de ácidos graxos da lecitina de soja. O conteúdo de ácidos graxos foi determinado através da análise por HPLC e os resultados foram expressos como média percentual  $\pm$  erro padrão da média, de dois experimentos diferentes. EPA – ácido eicosapentaenóico, DHA – ácido docosaheptaenóico.



**Figura 15** - Perfil de ácidos graxos da ração utilizada na alimentação dos animais. O conteúdo de ácidos graxos foi determinado através da análise por HPLC e os resultados foram expressos como média percentual  $\pm$  erro padrão da média, de dois experimentos diferentes. EPA – ácido eicosapentaenóico, DHA – ácido docosahexaenóico.

#### 4.12 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE ÁCIDOS GRAXOS PRESENTES NOS LIPÍDEOS TOTAIS DOS MACRÓFAGOS

Os principais ácidos graxos encontrados nos macrófagos do grupo controle foram o linoléico (C18:2 n-6) e o esteárico (C18:0), os quais correspondem a  $30,18 \pm 1,26\%$  e  $17,02 \pm 0,98\%$  do total de ácidos graxos, respectivamente. Macrófagos obtidos de animais suplementados com lecitina de soja apresentaram o mesmo perfil de ácidos graxos quando comparados ao grupo controle (Tabela 1). Os macrófagos do grupo diabético apresentaram redução do conteúdo de apenas um ácido graxo saturado, o ácido palmítico (C16:0). O índice de insaturação e a razão entre o conteúdo de ácido linoléico e ácido araquidônico não foram diferentes entre os quatro grupos experimentais.

**Tabela 1** - Perfil de ácidos graxos dos lipídeos totais dos macrófagos, analisado por HPLC. Os resultados foram expressos como g ácido graxo/100 g lipídeos  $\pm$  erro padrão da média, para n=12. C - controle, S - suplementado com lecitina de soja, D - diabético, DS - diabético suplementado com lecitina de soja, nd - não detectado, AL/AA - razão entre conteúdo de ácido linoléico e ácido araquidônico, IIn - índice de insaturação =  $\Sigma(\%$  ácido graxo insaturado x n<sup>o</sup>. de duplas ligações)/100. A letra *a* indica  $P < 0,05$  comparado com o grupo C.

Ácidos graxos	C	S	D	DS
Mirístico (C14:0)	4,34 $\pm$ 2,17	6,30 $\pm$ 2,57	7,87 $\pm$ 3,21	3,73 $\pm$ 1,87
Palmitico (C16:0)	16,33 $\pm$ 0,81	16,66 $\pm$ 1,49	9,45 $\pm$ 3,86 <sup>a</sup>	14,08 $\pm$ 0,92
Palmitoléico (C16:1 n-7)	16,13 $\pm$ 1,18	15,18 $\pm$ 1,77	13,95 $\pm$ 3,14	16,38 $\pm$ 0,98
Esteárico (C18:0)	17,02 $\pm$ 0,98	14,46 $\pm$ 1,08	23,06 $\pm$ 6,31	20,36 $\pm$ 1,24
Oléico (C18:1 n-9)	nd	1,13 $\pm$ 0,46	0,78 $\pm$ 0,32	0,10 $\pm$ 0,05
Linoléico (C18:2 n-6)	30,18 $\pm$ 1,26	28,96 $\pm$ 0,48	31,00 $\pm$ 0,7	32,72 $\pm$ 0,96
Linolênico (C18:3 n-3)	0,04 $\pm$ 0,02	0,05 $\pm$ 0,02	0,04 $\pm$ 0,02	nd
Araquidônico (C20:4 n-6)	15,35 $\pm$ 0,58	15,74 $\pm$ 1,12	12,95 $\pm$ 0,78	12,31 $\pm$ 0,14
DHA (C22:6 n-3)	nd	0,29 $\pm$ 0,12	nd	0,03 $\pm$ 0,01
EPA (C20:5 n-3)	0,61 $\pm$ 0,30	1,24 $\pm$ 0,03	0,90 $\pm$ 0,37	0,30 $\pm$ 0,15
I Insat	1,41 $\pm$ 0,08	1,45 $\pm$ 0,18	1,33 $\pm$ 0,13	1,33 $\pm$ 0,03
AL/AA	1,97 $\pm$ 0,15	1,89 $\pm$ 0,15	2,43 $\pm$ 0,13	2,67 $\pm$ 0,21

#### 4.13 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE ÁCIDOS GRAXOS PRESENTES NA FRAÇÃO DE FOSFOLIPÍDEOS DOS MACRÓFAGOS

A Tabela 2 expressa o perfil de ácidos graxos da fração de fosfolipídeos da membrana de macrófagos dos grupos controle, diabético, suplementado e diabético suplementado. A lecitina não foi capaz de alterar esse parâmetro, tanto em animais saudáveis quanto em animais diabéticos. Também não foram observadas alterações no índice de insaturação e na razão ácido linoléico/ácido araquidônico entre os grupos analisados.

**Tabela 2** - Perfil de ácidos graxos da fração de fosfolipídeos. Procedeu-se os ensaios de CCD e as amostras foram analisadas por HPLC. Os resultados foram expressos como g ácido graxo/100 g lipídeos  $\pm$  erro padrão da média, para n=12. C - controle, S - suplementado com lecitina de soja, D - diabético, DS - diabético suplementado com lecitina de soja, nd - não detectado, AL/AA - razão entre conteúdo de ácido linoléico e ácido araquidônico, IIn - índice de insaturação =  $\Sigma(\% \text{ ácido graxo insaturado} \times \text{n}^\circ \text{ de duplas ligações})/100$ .

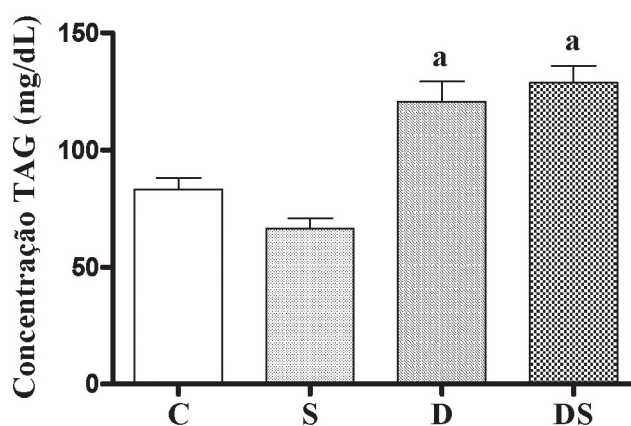
Ácidos graxos	C	S	D	DS
Mirístico (C14:0)	3,50 $\pm$ 1,75	3,88 $\pm$ 1,94	3,74 $\pm$ 1,87	3,18 $\pm$ 1,59
Palmitico (C16:0)	14,12 $\pm$ 1,02	14,01 $\pm$ 0,95	12,33 $\pm$ 0,97	13,14 $\pm$ 0,83
Palmitoléico (C16:1 n-7)	20,60 $\pm$ 0,77	17,95 $\pm$ 1,23	18,89 $\pm$ 1,79	21,09 $\pm$ 1,22
Estearico (C18:0)	16,67 $\pm$ 0,84	18,03 $\pm$ 0,25	19,00 $\pm$ 0,17	15,19 $\pm$ 1,60
Oléico (C18:1 n-9)	0,07 $\pm$ 0,04	0,63 $\pm$ 0,31	0,43 $\pm$ 0,22	0,90 $\pm$ 0,20
Linoléico (C18:2 n-6)	28,12 $\pm$ 1,54	28,83 $\pm$ 1,58	26,98 $\pm$ 1,10	27,00 $\pm$ 0,99
Linolênico (C18:3 n-3)	nd	0,03 $\pm$ 0,02	0,04 $\pm$ 0,02	0,03 $\pm$ 0,02
Araquidônico (C20:4 n-6)	14,83 $\pm$ 0,30	15,58 $\pm$ 0,77	16,19 $\pm$ 0,21	17,49 $\pm$ 0,83
DHA (C22:6 n-3)	nd	Nd	nd	Nd
EPA (C20:5 n-3)	2,08 $\pm$ 0,78	1,05 $\pm$ 0,48	2,40 $\pm$ 0,15	2,49 $\pm$ 0,14
I Insat	1,38 $\pm$ 0,05	1,44 $\pm$ 0,13	1,50 $\pm$ 0,10	1,58 $\pm$ 0,10
AL/AA	1,90 $\pm$ 0,22	1,90 $\pm$ 0,33	1,66 $\pm$ 0,10	1,57 $\pm$ 0,20

#### 4.14 CONCENTRAÇÃO DE LIPÍDEOS SÉRICOS

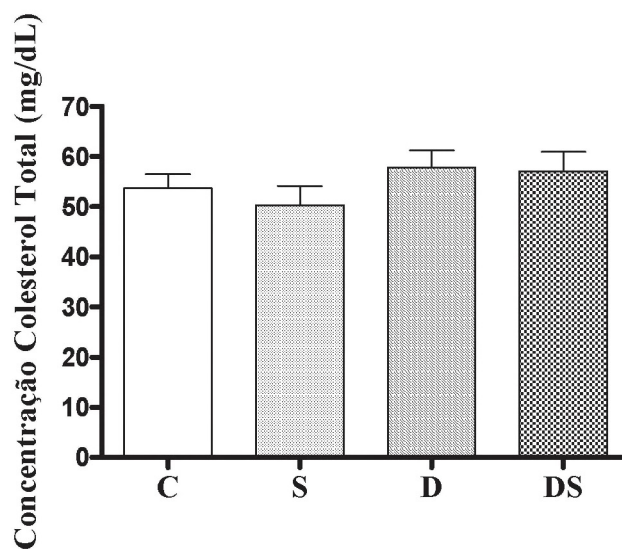
Os dados apresentados na Figura 16 indicam que os animais diabéticos apresentaram hipertriacilglicerolemia, já que a dosagem de triacilgliceróis no soro dos animais indicou uma concentração média de 120 $\pm$ 8 mg/dL para o grupo diabético e de apenas 83 $\pm$ 5 mg/dL para o grupo controle. A suplementação da dieta com lecitina de soja não alterou a concentração de triacilgliceróis dos animais saudáveis tampouco dos diabéticos.

O tratamento de ratos Wistar com 60 mg estreptozotocina/kg peso corporal não foi capaz de promover o aumento da concentração sérica de colesterol total (Figura 17). A concentração média para o grupo controle foi de 54 $\pm$ 3 mg/dL, para o grupo diabético 58 $\pm$ 3 mg/dL, para o grupo suplementado 50 $\pm$ 4 mg/dL e para o grupo diabético suplementado 57 $\pm$ 4 mg/dL. Não houveram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos.

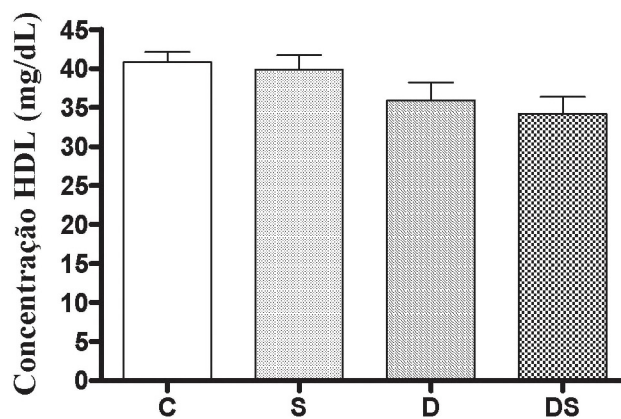
A concentração de HDL também não foi diferente entre os grupos analisados (Figura 18). Animais saudáveis apresentaram concentração igual a  $41 \pm 1$  mg/dL enquanto que animais diabéticos apresentaram concentração de  $36 \pm 2$  mg/dL. A lecitina não foi capaz de alterar a concentração de HDL em animais tratados e não tratados com estreptozotocina.



**Figura 16** - Concentração sérica de triacilglicerol de animais obtidos do grupo controle (C), suplementado com lecitina de soja (S), diabético (D) e diabético suplementado com lecitina de soja (DS). Os resultados foram expressos como concentração em mg/dL  $\pm$  erro padrão da média, para  $n=11$ . A letra *a* indica  $P < 0,001$  comparado com o grupo controle.



**Figura 17** - Concentração de colesterol total do soro de animais obtidos do grupo controle (C), suplementado com lecitina de soja (S), diabético (D) e diabético suplementado com lecitina de soja (DS). Os resultados foram expressos como concentração em mg/dL  $\pm$  erro padrão da média, para n=11.



**Figura 18** - Concentração sérica de colesterol HDL, de animais obtidos do grupo controle (C), suplementado com lecitina de soja (S), diabético (D) e diabético suplementado com lecitina de soja (DS). Os resultados foram expressos como concentração em mg/dL  $\pm$  erro padrão da média, para n=15.

## 5. DISCUSSÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde, cerca de 3,2 milhões de mortes por ano são atribuídas às complicações do diabetes mellitus e o Brasil está entre os dez países com maior número de casos (OMS, 2004). Além da hiperglicemia e suas complicações, a hiperlipidemia que se desenvolve nesses pacientes torna-se a principal causa de morbidade e mortalidade, principalmente em decorrência do desenvolvimento de doenças cardiovasculares (HAFFNER, 1999; GARBER, 2000). A lecitina de soja é utilizada terapeuticamente para controlar a dislipidemia e, dessa forma, pode ser uma importante intervenção terapêutica para diminuir o risco de doenças cardiovasculares em pacientes diabéticos (SCHAEFER, 2002).

O diabetes mellitus do tipo 1 é caracterizado pela produção deficiente de insulina, que acarreta em alterações no metabolismo de carboidratos, conduzindo à hiperglicemia. No presente trabalho, o diabetes em ratos Wistar, foi induzido pela estreptozotocina e os animais do grupo diabético e diabético suplementado apresentaram hiperglicemia significativa, indicando o estabelecimento do quadro de diabetes. Além da alteração no metabolismo de carboidratos, a deficiência de insulina também afeta o metabolismo de proteínas e de lipídeos, levando a um estado de catabolismo. De fato, animais diabéticos apresentaram ganho de peso inferior ao observado para os animais saudáveis (Figura 2).

O desenvolvimento de complicações infecciosas nesses pacientes também contribui significativamente para sua morbidade e mortalidade. A maior suscetibilidade ao desenvolvimento de infecções é resultante de alterações na resposta imunitária e inflamatória (CHONG-JEH LO, 2005). Macrófagos fazem parte do principal grupo de células fagocitárias responsáveis pela resposta imunitária inata e apresentam um papel central no desencadeamento da resposta inflamatória do hospedeiro.

A suplementação da dieta com lecitina de soja promoveu alterações estruturais nos macrófagos, compatíveis com as observadas em macrófagos estimulados, os quais apresentam maior diâmetro celular, maior tamanho e número de lamelipódios e filopódios, além de maior número de “ruffles” de membrana (FARBERMAN et al.,

2005). O tratamento com lecitina de soja tanto em animais saudáveis quanto em diabéticos promoveu aumento do tamanho celular, além de aumento do tamanho e número de lamelipódios (figura 4 e 5), estruturas formadas por filamentos de actina, onde a célula faz contato com substratos de membrana. As alterações estruturais provocadas pela lecitina de soja puderam ser detectadas apenas com a utilização de equipamentos com maior resolução, como o microscópio eletrônico, uma vez que não foram observadas alterações na capacidade de espreadimento analisada por microscopia óptica. (Figura 7).

As mudanças estruturais observadas no presente estudo indicam que a suplementação com lecitina de soja, na dose e tempo empregados, apresenta efeitos sobre os macrófagos peritoneais. Com base nessas alterações morfológicas, acredita-se que a lecitina também modifique parâmetros funcionais, alterando dessa forma a resposta contra infecções. Para verificar tal hipótese, avaliou-se a funcionalidade dessas células, determinando-se a produção de radicais livres, o volume lisossomal e a capacidade fagocitária e de adesão.

Macrófagos de animais diabéticos apresentaram alterações na capacidade de adesão das células (Figura 6), observando-se diminuição da adesão deste grupo ao se comparar com o grupo controle. Em trabalho anterior (BRENNER; BERNASCONI; GARDA, 2000), foi relatado que o tratamento de animais com estreptozotocina leva à redução da atividade das enzimas  $\Delta 9$ ,  $\Delta 6$  e  $\Delta 5$  dessaturases, resultando na diminuição de espécies contendo ácido araquidônico e aumento de espécies contendo ácido linoléico. A menor disponibilidade de ácido araquidônico pode resultar na diminuição da produção de mediadores inflamatórios como leucotrienos e lipoxinas, os quais são capazes de estimular a adesão de macrófagos (MADDOX et al., 1997; CALORINI et al., 2000). No presente estudo, não foram observadas alterações na razão entre o conteúdo de ácido linoléico e ácido araquidônico no grupo diabético, porém a produção desses mediadores lipídicos pode estar alterada, por exemplo, por alteração da expressão e/ou atividade da lipoxigenase. É possível também que haja menor produção de citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 $\beta$  já que estudos prévios

demonstraram que macrófagos de ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina apresentam liberação reduzida desta citocina (DOXEY et al., 1998).

A suplementação de ratos diabéticos provocou aumento da capacidade de adesão dos macrófagos quando comparados com o grupo diabético. Contudo, a suplementação da dieta de ratos saudáveis com lecitina de soja não alterou esta variável. A migração dos monócitos para o local de infecção é dependente de moléculas de adesão expressas em sua superfície (BERTON; LOWELL, 1999). A migração celular é um processo de várias etapas que envolve a formação de lamelipódios, adesão ao substrato e contração celular. Esses eventos devem ser coordenados, já que a perturbação de apenas um deles apresenta conseqüências na habilidade da célula em migrar (KAVERINA; KRYLYSHKINA; SMALL, 2002). O aumento da capacidade de adesão observado no grupo diabético suplementado associado ao aumento do número de lamelipódios poderia facilitar a migração de macrófagos para o sítio de infecção, contribuindo para a resposta do hospedeiro. Neste aspecto, a suplementação com lecitina de soja poderia trazer benefícios para indivíduos diabéticos, uma vez que estes apresentam maior suscetibilidade a infecções fúngicas e bacterianas (NIEMEIJER-KANTERS; BANGA; ERKELENS, 2001).

Após migração do macrófago para o sítio de infecção, ocorre o reconhecimento do substrato e então se inicia um processo denominado fagocitose. A ligação aos receptores de membrana desencadeia a polimerização de filamentos de actina com conseqüente formação do fagossoma. Sua formação é seguida por eventos de fusão que levam à formação do fagolisossoma, (AMER; SWANSON, 2002) onde ocorre a digestão da partícula englobada. A suplementação com lecitina de soja foi capaz de modular a capacidade fagocítica (Figura 10) e o volume lisossomal (Figura 9) dos macrófagos de ratos diabéticos, enquanto não foram observadas alterações no grupo diabético. É possível que o aumento da capacidade fagocitária associada ao aumento do compartimento endocítico, observado no grupo diabético suplementado, contribua para a atividade antimicrobiana dos macrófagos.

Macrófagos de animais diabéticos apresentaram reduzida produção de óxido nítrico, tanto na presença quanto na ausência de estímulo por LPS (figura 11). Essas alterações mostram-se dependentes da dose de estreptozotocina utilizada, via de

administração, bem como espécie animal empregada, já que trabalhos realizados por ANDRADE et al (1993) demonstraram aumento da produção desse radical livre em animais diabéticos. Estes autores utilizaram-se de doses múltiplas de 40 mg/kg peso corporal de estreptozotocina, via intraperitoneal, além disso, os ensaios foram realizados após 12 dias da administração de estreptozotocina. No presente estudo, a administração foi de 60 mg/kg peso corporal, em dose única, por via endovenosa e a dosagem foi realizada no 23º dia após a indução do quadro de diabetes. Além disso, a espécie animal era diferente da utilizada por ANDRADE et al. (1993).

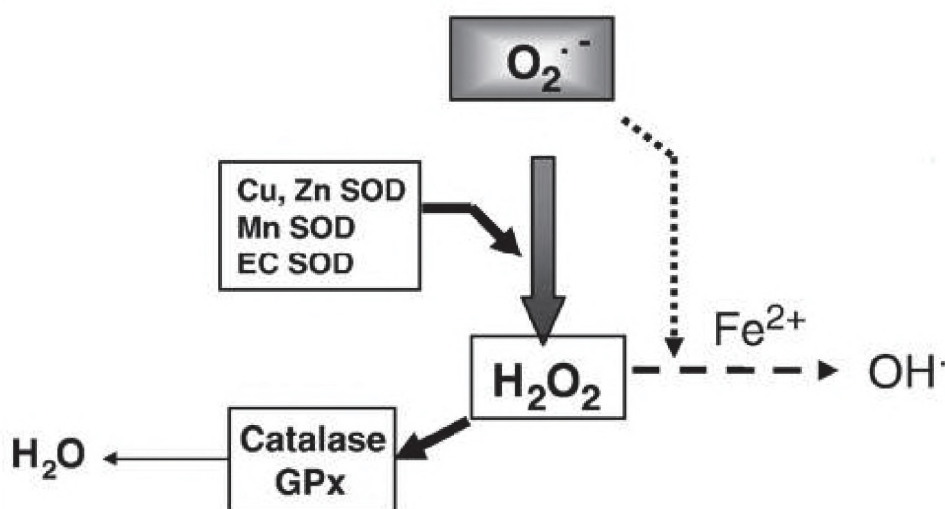
A suplementação com lecitina foi capaz de compensar as alterações desencadeadas pelo diabetes, já que não foram observadas diferenças significativas na produção de óxido nítrico por macrófagos estimulados, entre o grupo diabético suplementado e o controle. Assim, este efeito da lecitina de soja é benéfico a estes indivíduos, já que este intermediário reativo de nitrogênio é considerado um componente-chave da resposta antimicrobiana (HUBERT, et al., 2004).

A lecitina de soja também aumentou a produção de ânion superóxido por macrófagos estimulados do grupo diabético suplementado em relação ao grupo diabético, enquanto reduziu este parâmetro em macrófagos não estimulados obtidos dos mesmos grupos (Figura 12). Adicionalmente, o tratamento de animais saudáveis com lecitina apresentou aumento da produção deste radical livre por macrófagos não estimulados. Esses dados em conjunto demonstram que a lecitina é capaz de modular a produção de espécies reativas de oxigênio e conseqüentemente a capacidade microbicida dessas células.

Macrófagos não estimulados do grupo diabético mostraram aumento da produção de ânion superóxido, enquanto sob estímulo por PMA este efeito não foi observado. Novamente os dados encontrados mostram-se de dependentes de dose de estreptozotocina utilizada, via de administração, bem como espécie animal empregada, já que ANDRADE et al. (1993) mostraram que macrófagos peritoneais obtidos de ratos diabéticos apresentaram produção mais acentuada deste radical livre.

Em resposta ao acréscimo da produção de ânion superóxido em ratos diabéticos, houve amplificação do sistema antioxidante da célula, observada pelo aumento da atividade da catalase (Figura 13). Esses resultados indicam que as células

tendem a estabelecer o equilíbrio entre a produção de moléculas pró e antioxidantes, já que este equilíbrio é crítico para a funcionalidade das células do sistema imunitário (KNIGHT, 2000). Ao realizar o tratamento de animais diabéticos com lecitina de soja, houve diminuição da atividade da catalase. Concomitantemente observou-se aumento da produção de ânion superóxido. Apesar da catalase não atuar diretamente sobre o ânion superóxido, essa enzima degrada o peróxido de hidrogênio, formado a partir do ânion superóxido (Figura 19). Assim, alterações em uma das etapas podem modificar toda a via metabólica.



**Figura 19** - Produção intracelular de espécies reativas de oxigênio e o sistema de defesa antioxidante.  $O_2^{\cdot-}$  ânion superóxido,  $H_2O_2$  peróxido de hidrogênio,  $OH^{\cdot}$  radical hidroxil. Adaptado de RAHMAN; BISWAS; KODE (2006).

Os dados apresentados demonstram que a suplementação da dieta com lecitina é capaz de modular a funcionalidade dos macrófagos, bem como sua morfologia. Houve aumento da capacidade de adesão, da atividade fagocítica, do volume lisossomal e da produção de radicais livres. Esses efeitos foram observados principalmente nos animais diabéticos, enquanto que poucas alterações foram detectadas nos animais saudáveis. Estudos demonstram que os lipídeos da dieta afetam a concentração plasmática de lipídeos e dessa forma, são capazes de modular a

composição lipídica e conseqüentemente a funcionalidade das células do sistema imunitário (DECKERE et al., 1988). Muitas das respostas funcionais são provavelmente causadas por alterações estruturais na membrana lipídica, as quais afetam a fluidez da membrana ou domínios lipídicos específicos. Adicionalmente, pesquisas relatam o importante papel do colesterol na manutenção da heterogeneidade da membrana plasmática e na modulação de uma variedade de processos celulares incluindo sinalização, adesão e permeabilidade (KARNELL et al., 2005). Assim, para investigar a contribuição dos lipídeos séricos sobre a modificação da funcionalidade de macrófagos, avaliou-se a concentração destes no soro dos animais. Observou-se que animais diabéticos não apresentaram alterações da concentração de colesterol total e de HDL, entretanto apresentaram hipertriacilglicerolemia. Quando a dieta de animais diabéticos foi suplementada com lecitina de soja, não houve redução da concentração de TAG (Figura 16). Estudos realizados com humanos e com animais experimentais demonstraram que a lecitina de soja é capaz de reduzir a concentração de TAG e de colesterol plasmáticos. MEDIC et al. (2003) realizaram uma pesquisa com pacientes que apresentavam diferentes tipos de hiperlipidemia e demonstraram que a lecitina de soja foi eficaz em todos os pacientes. MASTELLONE et al. (2000) realizaram a suplementação da dieta de coelhos e de ratos com lecitina de soja e com TAG de soja. Enquanto a primeira dieta reduziu a concentração de colesterol plasmático, a segunda induziu a um quadro de hiperlipidemia. Assim, os efeitos hipolipemiantes da lecitina de soja mostra-se dependente do modelo e espécie animal utilizados, bem como dose e tempo de suplementação empregados. Assim, as alterações observadas nos macrófagos não são devidas às modificações no perfil lipídico do soro dos animais.

As dosagens de colesterol e TAG realizadas neste estudo avaliam a quantidade desses lipídeos no soro dos animais, porém não avaliam o conteúdo de ácidos graxos esterificados a esses lipídeos. Sabe-se que esses lipídeos serão clivados e os ácidos graxos serão distribuídos aos diferentes tecidos. Assim, a suplementação com lecitina de soja poderia alterar o perfil de ácidos graxos do soro e, conseqüentemente, da membrana dos macrófagos. Para avaliar essa possibilidade, realizou-se a análise do conteúdo de ácidos graxos dos macrófagos, por HPLC. Observou-se que a

suplementação com lecitina não foi capaz de alterar a proporção de ácidos graxos dos lipídeos totais e da fração de fosfolipídeos, tanto em animais saudáveis quanto em diabéticos, provavelmente devido à dieta desses animais. A ração utilizada é rica em ácido linoléico (C18:2 n-6), e em todos os grupos analisados este ácido graxo foi encontrado em maior proporção. Adicionalmente, as análises indicaram que não houve diferença significativa no conteúdo de ácido linoléico e de outros ácidos graxos entre a ração e a lecitina de soja. . O maior suprimento de ácido linoléico resultante da suplementação da dieta, não resultou em maior incorporação deste ácido graxo nos macrófagos. Infere-se assim que os sistemas biológicos apresentam mecanismos regulatórios da composição lipídica, limitando a magnitude de possíveis variações celulares.

Apesar de não se observar alteração na composição de ácidos graxos dos macrófagos, verificou-se que a lecitina de soja apresentou efeitos imunomodulatórios, em macrófagos de animais diabéticos. Diversos estudos descrevem que além da composição de ácidos graxos, o conteúdo de fosfolipídeos também modifica a funcionalidade celular, de diferentes formas. Essas modificações alteram a fluidez de membrana e afetam diversas funções celulares, incluindo propriedade de enzimas ancoradas à membrana, fagocitose, endocitose e crescimento celular. (SPECTOR; YOREK, 1985). Apesar de não terem sido observadas alterações na composição de ácidos graxos nas células estudadas, poderia haver alteração da composição nas classes de fosfolipídeos, já que a lecitina é composta principalmente por fosfatidilcolina.

É indubitável que haja participação de mediadores inflamatórios, os quais afetam a funcionalidade das células do sistema imunitário (ISHII; SHIMIZU, 2000). Um potente mediador lipídico que pode estar envolvido nessas alterações são os lipídeos *PAF-like*, os quais mimetizam a ação do PAF e que conhecidamente apresentam efeitos sobre monócitos e macrófagos (GOPAL et al., 2002). É altamente provável que em animais diabéticos suplementados haja maior produção de *PAF-like* devido ao estresse oxidativo característico do diabetes associado à possível maior disponibilidade de fosfatidilcolina. Isso explicaria os resultados encontrados, já que macrófagos são ativados por esse mediador lipídico.

SHIO et al. (2004) mostraram que o tratamento de macrófagos com PAF estimula a síntese de óxido nítrico, enquanto o tratamento simultâneo com uma antagonista dos receptores de PAF anula esse efeito. Estudos também relatam os efeitos do PAF sobre a produção de ânion superóxido. KATO et al. (2002) demonstraram que ocorre liberação mais acentuada deste radical livre quando macrófagos são tratados com PAF. Esse mediador lipídico também já demonstrou induzir a aderência de leucócitos (KHREISS et al., 2004) e a atividade fagocítica de macrófagos, de maneira dose-dependente (ICHINOSE; SAWADA; MAENO, 1994). Sabendo que lipídeos *PAF-like* ativam os receptores de PAF, mimetizando seus efeitos e que estes receptores estão presentes na membrana dos macrófagos, especulase que este seja o mecanismo pelo qual a lecitina modula a funcionalidade dos macrófagos.

## **6. CONCLUSÃO**

A lecitina de soja modificou a morfologia, bem como a produção de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, a capacidade de adesão e de fagocitose e o volume lisossomal de macrófagos peritoneais obtidos de animais diabéticos. Essas alterações não foram decorrentes da modificação do perfil lipídico do soro tampouco da fluidez da membrana celular, já que não houve incorporação de ácidos graxos provenientes da lecitina de soja. Assim, a suplementação das dietas com lecitina de soja pode ser considerada um alvo importante de intervenção terapêutica para atenuar a ocorrência de infecções em pacientes com diabetes mellitus.

**REFERÊNCIAS**

ABUSHUFA, R.; REED, P.; WEINKOVE, C. Fatty acids in erythrocytes measured by isocratic HPLC. **Clinical Chemistry**, v. 40, p. 1707-12, 1994.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**. v. 105, p. 121-6, 1984.

AMER, A. O.; SWANSON, M. S. A phagosome of one's own: a microbial guide to life. **Macrophage Current Opinion in Microbiology**, v. 5, p. 56-61, 2002.

ANDRADE, J. et al. Activation of peritoneal macrophages during the prediabetic phase in low-dose streptozotocin-treated mice. **FEBS**, v. 327, n.1, p.31-34, 1993.

BABIOR B. M. NADPH oxidase: an update. **Blood**, v. 93, p. 1464-76, 1999.

BECKMAN, J. S.; KOPPENOL, W. H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and the ugly. **American Journal of Physiology**, v. 271, p. 1424-37, 1996.

BERTON, G.; LOWELL, C. A. Integrin Signalling in Neutrophils and Macrophages. **Cellular Signalling**. V. 11, n. 9, p. 621-635, 1999.

BETTERIDGE, D. J. The current management of diabetic dyslipidaemia. **Acta Diabetologica**, v. 38, n. 5, p. 15-19, 2001.

BIONDI-ZOCCAI, G. G. L. et al. Atherotrombosis, Inflammation and diabetes. **Journal of the American College of Cardiology**, v. 41, p. 1071-7, 2003.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-54, 1976

BRENNER, R. R.; BERNASCONI, R. R.; GARDA, H. A. Effects of experimental Diabetes on the fatty acid composition, molecular species of phosphatidyl-choline and physical properties of hepatic microsomal membranes. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 63, n. 3, p. 167-76, 2000.

BRESSON, D.; VON HERRATH, M. Mechanisms underlying type 1 diabetes. **Drug Discovery Today: Disease Mechanisms**, v. 1, n. 3, 2004.

CALDER, P. C. et al. Fatty acids and lymphocyte functions. **British Journal of Nutrition**, v. 1, p. 31-48, 2002.

CALDER, P. C. Long-chain n-3 fatty acids and inflammation: potential application in surgical and trauma patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, p. 433-446, 2003.

CALORINI, L. et al. The change in leukotrienes and lipoxins in activated mouse peritoneal Macrophages. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1484, p. 87-92, 2000.

CHONG-JEH LO, M.D. Upregulation of Cyclooxygenase-II Gene and PGE2 Production of Peritoneal Macrophages in Diabetic Rats. **Journal of Surgical Research**. v. 125, p. 121–127, 2005.

CHRISTEN, U. et al. Induction, acceleration or prevention of autoimmunity by molecular mimicry. **Molecular Immunology**, v. 40, p. 1113-20, 2004.

DECKERE, E. de et al. Effects of type and amount of dietary fat on rabbit and rat lymphocyte proliferation in vitro. **Journal of Nutrition**, v. 118, p. 11-18, 1988.

DOGNE, J. M.; HANSON J.; PRATICO, D. Thromboxane, prostacyclin and isoprostanes: therapeutic targets in atherogenesis. **TRENDS in Pharmacological Sciences**, v. 26, n. 12, 2005.

DOXEY, D. L. et al. Diabetes-induced impairment of macrophage cytokine release in a rat model: potential role of serum lipids. **Life Sciences**, v. 63, n. 13, p. 1127-36, 1998.

FARBERMAN, M. M. et al. Morphologic changes in alveolar macrophages in response to UVEC-activated pulmonary Type II epithelial cells. **Tissue and Cell**. v. 37, p. 213–222, 2005.

FOLCH, J.; LEES, M.; STANLEY, G. H. S. A simple method for isolation and purification of total lipid from animal tissue. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, p. 497-509, 1957.

FREY, B. et al. Increase in fragmented phosphatidylcholine in blood plasma by oxidative stress. **Journal of Lipid Research**, v. 41, p. 1145–1153, 2000.

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

GOLDMAN, D. et al. Expression of inducible nitric oxide synthase in rat pulmonary *Cryptococcus neoformans* granulomas. **American Journal of Pathology**, v. 148, p. 1275-82, 1996.

GOPAL K. et al. Activation of vascular cells by PAF-like lipids in oxidized LDL. **Vascular Pharmacology**, v. 38, p. 193-200, 2002.

GORDON, S. The macrophage. **Bioessays**, v. 17, p. 977-86, 1995.

GRABHER, C. et al. Birth and life of tissue macrophages and their migration in embryogenesis and inflammation in medaka. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 81, p. 263-271, 2007.

GUIMARÃES, A. R. P. et al. Composition of fatty acids in the liver and lymphoid organs of rats fed fatty acid-rich diets. **Biochemistry and Molecular Biology International**, v. 36, n. 2, p. 451-61, 1995.

HAFFNER, S. M. Diabetes dyslipidemia and coronary artery disease. **The American Journal of Cardiology**, v. 83, n. 9B, p. 17F-21F, 1999.

HAMILTON, S.; HAMILTON, R. J.; SEWELL, P. A. Extraction of lipids derivate formation in: HAMILTON, R. J. & HAMILTON, S. Lipid analysis – a practical approach. Chapter 2. IRL Press at Oxford University Press, p. 54, 1992.

HARWOOD, J. L. Lipid metabolism. **The lipid handbook**, Eds. Gungstone, F. D.; Harwood, J. L.; Padley, F. B. 2. ed., London, 1994.

HAYEK, T. et al. Macrophage-foam cell formation in streptozotocin-induced diabetic mice: Stimulatory effect of glucose. **Atherosclerosis**, v. 183, n. 1, p. 25-33, 2005.

HOMEM DE BITTENCOURT, P. I.; CURI, R. Interconversion of prostaglandins: a possible signal to control immune system function in cancer. **Cancer Therapy and Control**, v. 2, p. 217-22, 1992.

HUBERT, M. T.; MARTHA, J. M.; PIGANELLI, J. D. Mechanistic analysis of the immunomodulatory effects of a catalytic antioxidant on antigen-presenting cells: implication for their use in targeting oxidation–reduction reactions in innate immunity. **Free Radical Biology Medicine**, v. 36, n. 2, p. 233-247, 2004.

ICHINOSE, M.; SAWADA, M.; MAENO, T. Inhibitory effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) on phagocytosis in mouse peritoneal macrophages. **Regulatory Peptides**, v. 54, n. 2, p. 457-66, 1994.

ISHII, S.; SHIMIZU, T. Platelet-activating factor (PAF) receptor and genetically engineered PAF receptor mutant mice. **Progress in Lipid Research**, v. 39, p. 41–82, 2000.

JEFFERY N. M. et al. Characteristics of lipid and lymphocytes collected from the lymph of rats fed a low fat diet or high fat diets rich in n-6 or n-3 polyunsaturated fatty acids. **Nutrition Research**, v. 18, n. 2, p. 299-308, 1998.

JIMENEZ, M. A. et al. Evidence that polyunsaturated lecithin induces a reduction in plasma cholesterol level and favourable changes in lipoprotein composition in hypercholesterolemic rats. **Journal of Nutrition**, v. 120, p. 659–67, 1990.

JORENS, P. G.; MATTHYS, K. E.; BULT, H. Modulation of nitric oxide synthase activity in macrophages. **Mediators of Inflammation**, v. 4, p. 75-89, 1995.

KARNELL, F. G. et al. Membrane Cholesterol Content Accounts for Developmental Differences in Surface B Cell Receptor Compartmentalization and Signaling. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 27, p. 25621–25628, 2005.

KARUPIAH, G. et al. Inhibition of viral replication by interferon- $\gamma$ -induced nitric oxide synthase. **Science**, v. 261, p. 1445-48, 1993.

KATO, M. et al. Increased superoxide radicals generation from alveolar macrophages in immature guinea-pigs. **Cell Biology International**, v. 26, n. 9, p. 829–832, 2002.

KAVERINA, I.; KRYLYSHKINA, O.; SMALL, J. V. Regulation of substrate adhesion dynamics during cell motility. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 34, p. 746-761, 2002.

KHREISS, T. et al. Activation of extracellular signal-regulated kinase couples platelet-activating factor-induced adhesion and delayed apoptosis of human neutrophils. **Cellular Signalling**, v. 16, p. 801-810, 2004.

KINSELLA, J. E.; LOKESH, B. Dietary lipids, eicosanoids, and the immune system. **Critical Care Medicine**, v. 18, p. 94-113, 1990.

KINSELLA, J. E. Lipids, membrane receptors, and enzymes: effects of dietary fatty acids. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 14, p. 200-217, 1990.

KNIGHT, J. A. Free radicals, antioxidants and the immune system. **Annals of Clinical Laboratory Science**, v. 30, n. 2, p. 145-58, 2000.

KUROWSKA, E. M. et al. Effects of substituting dietary soybean protein and oil for milk protein and fat in subjects. **Clinical and Investigative Medicine**, v. 20, n.3, p. 162-70, 1997.

LEBLANC, M. J. et al. Effects of soybean lecithin on plasma lipid transport and hepatic cholesterol metabolism in rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 14, p. 40-48, 2003.

LEE, S. L.; WANG Y.; MILBRANDT, J. Unimpaired Macrophage Differentiation and Activation in Mice Lacking the Zinc Finger Transcription Factor NGFI-A (EGR1). **Molecular and Cellular Biology**, p. 4566–4572, 1996.

LEWIS, G. F.; STEINER, G. Hypertriglyceridemia and its metabolic consequences as a risk factor for atherosclerotic cardiovascular disease in non-insulin-dependent diabetes mellitus. **Diabetes Metabolism Reviews**, v.12, n. 1, p. 37-56, 1996.

LLORENTE, L. et al. Innate immune response mechanisms in non-insulin dependent diabetes mellitus patients assessed by flow cytometry. **Immunology Letters**, v. 74, p. 239- 244, 2000.

MACMICKING, J.; XIE, Q.; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function. **Annual Review of Immunology**, v. 15, p. 323-50, 1997.

MADDOX, J. F. et al. Lipoxin A4 stable analogs are potent mimetics that stimulate human monocytes and THP-1 cells via a G-protein-linked lipoxin A4 receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v.272, p. 6972–6978, 1997.

MADHAVI, N.; DAS, V. N. Effects of n-3 and n-6 fatty acids on the survival of vincristine sensitive and resistant human cervical carcinoma cells, in vitro. **Cancer Letters**, v. 84, p. 31-41, 1994.

MARATHE, G. K. Identification of platelet-activating factor as the inflammatory lipid mediator in CCl<sub>4</sub> -metabolizing rat liver. **Journal of Lipid Research**, v. 42, p. 587–596, 2001.

MARLETTA, M. A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. **Cell**, v. 78, p. 927-30, 1994.

MASTELLONE, I. et al. Dietary soybean phosphatidylcholines lower lipidemia: Mechanisms at the levels of intestine, endothelial cell, and hepato-biliary axis. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 11, p. 461– 466, 2000.

MEDIC, D. R. et al. Effects of soybean Leci-vita product on serum cholesterol and triglycerides levels. **Nutrition Research**, v. 23, p. 269-79, 2003.

MICHEL, T.; XIE, Q. W.; NATHAN, C. Molecular biological analysis of nitric oxide synthase. **Methods in Nitric Oxide Research**, p. 161-75, 1995.

MILES, E. A.; FIONA, A. W.; CALDER, P. C. Dietary fish oil reduces intercellular adhesion molecule 1 and scavenger receptor expression on murine macrophages. **Atherosclerosis**, v. 152, p. 43–50, 2000.

MIYASAKA, C. K. et al. Fish Oil Given by Gavage Increases Lymphocyte Proliferation and Production of Hydrogen Peroxide by Rat Macrophages. **General Pharmacology**, v. 31, n. 1, p. 37–41, 1998.

MOUSSA, M.; et al. In vivo effects of oliveoil-based lipid emulsion on lymphocyte activation in rats. **Clinical Nutrition**, v. 19, n. 1, p. 49-54, 2000.

NIEMEIJER-KANTERS, S. D. J. M.; BANGA, J. D.; ERKELENS, D. W. Lipid-lowering therapy in diabetes mellitus. **Netherlands Journal of Medicine**, v. 58, p. 214–222, 2001.

NISHIYAMA, A. et al. Arachidonic acid-containing phosphatidylcholine inhibits lymphocyte proliferation and decreases interleukin-2 and interferon-gamma production from concanavalin A-stimulated rat lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1487, p. 50-60, 2000.

NISHIYAMA-NARUKE, et al. HPLC determination of underivatized fatty acid saponified at low temperature analyses of fatty acids in oils and tissues. **Analytical Letters**, v. 31, p. 2565-76, 1998.

NISHIYAMA-NARUKE, A.; CURI, R. Phosphatidylcholine participates in the interaction between macrophages and lymphocytes. **American Journal of Physiology. Cell Physiology**, v. 278, n. 3, p. 554-60, 2000.

OHTA, A. et al. Rapid analysis of fatty acids in plasma lipids. **Lipids**, v. 25, n. 11, p. 742-7, 1990.

OMS. **Organização Mundial da Saúde**, 2004. Disponível em <<http://www.who.int/en/>>. Acesso em setembro, 2005.

PABLO M. A. de; CIENFUEGOS, G. A. Modulatory effects of dietary lipids on immune system functions. **Immunology and Cell Biology**, v. 78, p. 31-39, 2000.

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

POLICHETTI, E. et al. Cholesterol-lowering effect of soybean lecithin in normolipidaemic rats by stimulation of biliary lipid secretion. **British Journal of Nutrition**, v. 75 n. 3, p. 471-78, 1996.

RAHMAN I.; BISWAS, S. K.; KODE, A. Oxidant and antioxidant balance in the airways and airway diseases. **European Journal of Pharmacology**, v. 533, p. 222-239, 2006.

RATNAM, S.; MOOKERJEA, S. The regulation of superoxide generation and nitric oxide synthesis by C-reactive. **Immunology**, v. 94, n. 4, p. 560-68, 1998.

ROSEN, H.; GORDON, S. Monoclonal antibody to the murine type 3 complement receptor inhibits adhesion of myelomonocytic cells in vitro and inflammatory cell recruitment in vivo. **Journal of Experimental Medicine**, v. 166, p. 1685-1701, 1987.

SANGIOVANNI, J. P.; CHEW, E. Y. The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 24, p. 87-138, 2005.

SCHAEFER, E. J. Lipoproteins, nutrition, and heart disease. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 75, p. 191-212, 2002.

SHINDOU, H. et al. Roles of Cytosolic Phospholipase A2 and Platelet- Activating Factor Receptor in the Ca-Induced Biosynthesis of PAF. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 271, p. 812–817, 2000.

SHIO, M. T. et al. PAF is involved in the Mycoplasma arthritidis superantigen-triggering pathway for iNOS and COX-2 expression in murine peritoneal cells. **Experimental Cell Research**, v. 298, p. 296– 304, 2004.

SPECTOR, A. A.; YOREK, M. A. Membrane lipid composition and cellular function. **Journal of Lipid Research**. v. 26, p. 1015-1035, 1985.

STENGER, S. et al. Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to Leishmania major. **Journal of Experimental Medicine**, v. 180, p. 783-93, 1994.

STUEHR, P. J.; MARLETTA, M. A. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide. **Proceedings of the National Academy of Science of USA**, v. 82, p. 7738-742, 1985.

SWANSON J. A, BAER S. C. Phagocytosis by zippers and triggers. **Trends in Cell Biology**, v. 5, p. 89–93, 1995.

TACKE, F.; RANDOLPH, G. J. Migratory fate and differentiation of blood monocyte subsets. **Immunobiology**, v. 211, p. 609–618, 2006.

TAKEMURA, R.; WERB, Z. Secretory products of macrophages and their physiological functions. **American Journal of Physiology**, v. 246, p. 1-9, 1984.

TAPPER, H. The secretion of preformed granules by macrophage and neutrophil. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 59, p. 613-20, 1996.

VIGNAIS, P. V. The superoxide-generating NADPH oxidase: structural aspects and activation mechanism, **Cellular and Molecular Life Sciences**. v. 59, p. 1428-59, 2002.

WENDY J. et al. Oxidized lipoproteins and macrophages. **Vascular Pharmacology**, v. 38, p. 239-48, 2002.

WICK, G.; KNOFLACH, M.; XU. Q. Autoimmune and inflammatory mechanisms in atherosclerosis. **Annual Review of Immunology**, v. 22, p. 361-403, 2004.

ZACHARY, T.; BLOOMGARDEN, M. D. Immunologic Issues in Type 1 Diabetes. **Diabetes Care**, v. 24, n. 12, 2001.

ZAMMIT V. A., et al. Lipid molecular order in liver mitochondrial outer membranes, and sensitivity of carnitine palmitoyltransferase I to malonyl-CoA. **Lipids**, v. 33, p. 371-76, 1998.