



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DEBORA SALLES DA SILVA COUTINHO

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE FÍGADO DE TUBARÃO EM
DIFERENTES DOSES E PERÍODOS DE TEMPO SOBRE CAPACIDADE
PROLIFERATIVA DE LINFÓCITOS E INCORPORAÇÃO DE
ALQUILGLICERÓIS EM TECIDOS LINFÓIDES DE RATOS WISTAR**

CURITIBA

2017

DEBORA SALLES DA SILVA COUTINHO

**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE FÍGADO DE TUBARÃO EM
DIFERENTES DOSES E PERÍODOS DE TEMPO SOBRE CAPACIDADE
PROLIFERATIVA DE LINFÓCITOS E INCORPORAÇÃO DE
ALQUILGLICERÓIS EM TECIDOS LINFÓIDES DE RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada como requisito parcial
à obtenção do grau de Mestre em Ciências
Fisiológicas, pelo Departamento de Ciências
Fisiológicas, Setor de Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Fabíola Iagher

CURITIBA

2017

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Coutinho, Debora Salles da Silva

Efeito da suplementação com óleo de fígado de tubarão em diferentes doses e períodos de tempo sobre capacidade proliferativa de linfócitos e incorporação de alquilgliceróis em tecidos linfóides de ratos wistar. / Debora Salles da Silva Coutinho. – Curitiba, 2017.

55 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Fabíola Iagher

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

1. Sistema imune 2. Linfocitos 3. Proliferação celular 4. Oleo de peixe 5. Eteres I. Título II. Iagher, Fabíola III. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia.

CDD (20. ed.) 574.1

Lembro de estar no topo do meu mundo, entre o céu azul e vermelho do entardecer, imaginando quanto conhecimento eu ainda poderia ter, e onde eu conseguiria chegar. Cheguei longe. Sim. Mas ainda vou continuar.

Dedico este trabalho para “a melhor professora do mundo” – minha orientadora amada, Fabíola Iagher.




Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Departamento de Fisiologia
Programa de Pós-Graduação em Fisiologia



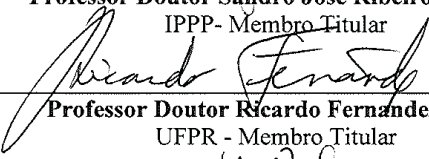
Ata da Defesa de Dissertação de Mestrado de Débora Salles da Silva Coutinho

Aos dezoito dias do mês de dezembro do ano de dois mil e dezessete, foi realizada no auditório do Departamento de Fisiologia no Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, a defesa de dissertação da mestranda **DÉBORA SALLES DA SILVA COUTINHO**, intitulada “**EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM ÓLEO DE FÍGADO DE TUBARÃO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES E PERÍODOS DE TEMPO SOBRE A CAPACIDADE PROLIFERATIVA DE LINFÓCITOS E INCORPORAÇÃO DE ALQUILGLICERÓIS EM TECIDOS LINFÓIDE DE RATOS WISTAR**”. A abertura teve início às 14h00min pela Presidente da Banca Examinadora e Orientadora da candidata, Professora Doutora Fabíola Iagher. A Presidente apresentou ao público presente os membros da banca examinadora e logo passou à palavra a aluna, para que fizesse uma apresentação sucinta de sua dissertação. Após a explanação oral, Professora Doutora Fabíola Iagher passou à palavra ao primeiro examinador, Professor Doutor Sandro José Ribeiro Bonatto do IPPP. Na sequência, passou à palavra ao segundo examinador, Professor Doutor Ricardo Fernandez Perez do Departamento de Fisiologia da UFPR. A aluna respondeu as perguntas dos examinadores e se posicionou frente às críticas. Findas as arguições pelos demais membros da banca, a Presidente, Professora Doutora Fabíola Iagher fez uma rápida apreciação das conclusões mais importantes dos debates realizados e comunicou que a Banca Examinadora iria reunir-se em sessão secreta para discussão e atribuição dos conceitos. Os trabalhos foram interrompidos por cinco minutos. Após haver analisado o referido trabalho e argüido a candidata, os membros da banca examinadora reunidos em sessão secreta deliberaram pela “aprovação”, habilitando-a ao título de Mestre em Fisiologia, condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Art. 59º do Regimento interno deste Programa de Pós-Graduação. Eu, Professora Doutora Fabíola Iagher, Presidente da Banca Examinadora lavrei a presente ata, da qual assino juntamente com os senhores examinadores.


Curitiba, 18 de dezembro de dois mil e dezessete.



Professor Doutor Sandro José Ribeiro Bonatto
IPPP- Membro Titular



Professor Doutor Ricardo Fernandez Perez
UFPR - Membro Titular



Professora Doutora Fabíola Iagher
UFPR - Orientadora e Presidente da Banca Examinadora

AGRADECIMENTOS

Ser agraciada pelo apoio de tantas pessoas, e lembrá-las apenas pelo nome aqui, é muito pouco. Saiba que estarão sempre em meu coração, em minha memória e em meu desejo de retribuição, por tudo que fizeram por este trabalho.

Agradeço primeiramente a Deus, quem me criou, e meus anjos protetores, sempre ao meu lado, guiando nesta jornada de conhecimento e evolução.

Ao meu esposo Ari, a melhor pessoa que já conheci e a quem amo profundamente, minha motivação para ser uma pessoa melhor a cada dia.

À minha preciosa orientadora, a professora mais gentil e sábia que já conheci. Profe, você é meu exemplo em tudo. É uma honra!

Ao estimado professor Luiz Cláudio Fernandes, pela oportunidade de estar em seu laboratório e o voto de confiança em meu trabalho como técnica da UFPR.

A minha professora Márcia, sempre motivando o aprendizado.

Aos meus colegas de trabalho do Departamento de Fisiologia, que me recebem de braços abertos quando passei a fazer parte da equipe de técnicos. Fábio, Hely, Rogério e Roberto vocês são pessoas maravilhosas, é uma satisfação imensa trabalhar com todos vocês.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, pela paciência no ensino, por compreenderem meus horários “apertados” de trabalho e estudo, sempre “perdoando” meus atrasos.

Aos meus amigos do “lab”, Stefani, Bruna, Igor, Jhonny, Andressa, Carolina,

Aos amigos de outros “labs”, Bruna e Priscila da Farmacologia, sempre amáveis no compartilhamento de equipamentos.

Ao Prof. Bruno Silva e ao técnico Thiago, do departamento de química, pelas discussões e análises no GC-MS e principalmente pela disposição em estabelecer esta parceria.

Aos funcionários do biotério, pela atenção com os animais e e por sempre facilitarem o cuidado com meus “ratinhos”.

Ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia, pela oportunidade de realizar este trabalho.

RESUMO

O óleo de fígado de tubarão (OFT) é a principal fonte natural de alquilgliceróis (AKG), éteres lipídicos constituídos por uma cadeia hidrocarbônica, saturada ou insaturada, unida por ligação do tipo éter a uma das hidroxilas do glicerol. A suplementação com AKG é capaz de interferir no funcionamento das células do sistema imune de forma significativa, tanto em situações patológicas como na homeostase. Vários estudos têm demonstrado sua ação imunestimulatória, no entanto não há consenso sobre quanto de OFT deve ser ingerido e a duração da suplementação que permita incorporação de AKG para haver resposta biológica. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito da suplementação com OFT (Ecomer®) em diferentes concentrações e períodos de tempo sobre a capacidade proliferativa de linfócitos do timo e de linfonodos mesentéricos, bem como dosar a incorporação celular de AKG nos mesmos tecidos de ratos Wistar. Ainda, foi avaliada a influência das diferentes doses e dos diferentes tempos de suplementação sobre hematócrito e concentração de hemoglobina no sangue, massa corpórea e do fígado, do tecido adiposo mesentérico e do músculo sóleo. Para tanto, os animais foram separados nos seguintes grupos: 1g / kg (animais suplementados com 1g de OFT / kg de peso corpóreo), 2g / kg (2g de OFT/ kg g p.c.), 4g / kg (4g de OFT / kg p.c.), e 5g / kg (5g de OFT/ kg p.c.). Em cada grupo, animais foram suplementados durante 1, 2, 6 ou 7 semanas. Após eutanásia dos animais, os linfócitos isolados de timo e linfonodos mesentéricos foram cultivados na presença de Alamar Blue® por 24, 48 e 72h para avaliação da capacidade proliferativa. Para identificação e quantificação de alquilgliceróis presentes nos tecidos linfóides, estes foram submetidos à extração lipídica, metanólise ácida e acetilação, e as amostras foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). O hematócrito foi determinado utilizando-se capilar de vidro e centrifuga de microhematócrito, e a concentração de hemoglobina foi determinada através do método da cianometahemoglobina. A suplementação com AKG interferiu na proliferação linfocitária de maneira diferente em linfócitos T e B, e em diferentes tecidos linfóides. Não houve elevação proporcional da proliferação com o aumento da dose e do tempo de suplementação. A avaliação inicial dos dados de GC-MS mostrou que a incorporação de AKG em timo parece depender mais da dose do que do tempo de suplementação, e a incorporação em linfonodos mesentéricos sofreu maior influência do tempo de suplementação. A oferta de AKG em todas as doses e tempos de suplementação não induziu ganho de massa corpórea, ganho de massa nos tecidos avaliados ou alterações no hematócrito e na dosagem de hemoglobina.

Palavras-chave: Sistema imunitário. Proliferação linfocitária. Óleo de fígado de tubarão. Alquilgliceróis. GC-MS.

ABSTRACT

Shark liver oil (SLO) is the main natural source of alkylglycerols (AKG), lipid ethers consisting of a saturated or unsaturated hydrocarbon chain, bonded by ether-type binding to one of the hydroxyls of glycerol. AKG supplementation is able to interfere significantly with the functionality of cells of the immune system, both in pathological situations and in homeostasis, and several studies have demonstrated its immunostimulatory action. However, there is no consensus as how much OFT should be ingested and for how long to have a biological response and to allow significant uptake of AKG into cells. Therefore, the objective of this study was to evaluate the effect of OFT (Ecomer®) supplementation in different concentrations and time periods on the proliferative capacity of thymus and mesenteric lymph nodes lymphocytes, as well as the cellular incorporation of alkylglycerols in the same tissues. Also, the influence of the different doses and time periods of supplementation on hematocrit and hemoglobin concentration in the blood, as well as body, liver, mesenteric adipose tissue and soleus muscle mass were evaluated. The animals were separated into the following groups: 1 g/kg (supplemented with 1 g OFT/kg b.w.), 2 g/kg (2 g OFT/kg b.w.), 4 g/kg (4 g OFT/Kg b.w.), and 5 g/kg (5 g OFT/kg b.w.). In each group, animals were supplemented for 1, 2, 6 or 7 weeks. After orthonthasia, lymphocytes isolated from thymus and mesenteric lymph nodes were cultured in the presence of Alamar Blue® for 24, 48 and 72 hours for evaluation of proliferative capacity. For identification and quantification of alkylglycerols present in the lymphoid tissues, these were submitted to lipid extraction, acid methanolysis and acetylation, and the samples were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). Hematocrit was determined using glass capillary and microhematocrit centrifuge, and hemoglobin concentration using the cyanometahemoglobin method. Supplementation with AKG interferes in lymphocyte proliferation differently in T and B lymphocytes and in different lymphoid tissues. There was no proportional increase in proliferation with increasing dose and time of supplementation. Initial assessment of GC-MS data showed that incorporation of AKG into thymus seems to depend more on dose than on supplementation time, and incorporation into mesenteric lymph nodes undergoes a greater influence of supplementation time. The AKG supply at all doses and times of supplementation did not induce gain of body mass, gain of mass in the evaluated tissues, or changes in the hematocrit and the hemoglobin dosage.

Keywords: Immune system. Lymphocyte proliferation. Shark liver oil. Alkylglycerols. GC-MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Estrutura química das moléculas de alquilglicerol mais comuns.	10
Figura 2-	Estrutura química das moléculas que apresentam alquilglicerol em seus esqueletos carbônicos.....	11
Figura 3-	Desenho experimental.....	21
Figura 4-	Régua utilizada para medição de hematócrito.....	26
Figura 5-	Capacidade proliferativa de linfócitos de linfonodos mesentéricos – ConA.....	29
Figura 6-	Capacidade proliferativa de linfócitos de linfonodos mesentéricos – LPS.....	31
Figura 7-	Capacidade proliferativa de linfócitos do timo – ConA.....	33
Figura 8-	Capacidade proliferativa de linfócitos do timo – LPS.....	34
Figura 9-	Cromatograma (A) gerado em cromatógrafo gasoso, e espectro de massa (B) obtidos a partir de óleo de fígado de tubarão.....	35
Figura 10-	Evolução da massa corporal.....	38
Figura 11-	Massa do fígado (g) dos animais suplementados.....	39
Figura 12-	Massa de tecido adiposo mesentérico (g) dos animais suplementados.....	39
Figura 13-	Massa de tecido muscular – sóleo (g) dos animais suplementados.....	39
Figura 14-	Hematócrito.....	40
Figura 15-	Hemoglobina.....	40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Porcentagem de alquilgliceróis obtidos de linfonodos mesentéricos em GC-MS.....	36
Tabela 2: Porcentagem de alquilgliceróis obtidos de timo em GC-MS.....	37

LISTA DE SIGLAS

AKG	- Alquilgliceróis
Balb/c	- Linhagem de camundongos albinos
BALB/c-nu/nu	- Linhagem de camundongos albinos nude
ConA	- Concanavalina A
GC-MS	- Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
LPS	- Lipolissacardeo de E. coli
NK	- <i>Natural killer</i>
OFT	- Óleo de fígado de tubarão
PBS	- Solução salina tampão fosfato
PKC	- Proteína quinase C
ROS	- Espécies reativas de oxigênio
TAG	- Triacilglicerol

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
1.1	ÓLEO DE FÍGADO DE TUBARÃO.....	10
1.2	SISTEMA IMUNITÁRIO.....	11
1.3	ALQUILGLICERÓIS E SISTEMA IMUNE.....	14
2	OBJETIVOS	19
3	MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1	ANIMAIS.....	20
3.2	SUPLEMENTOS E REAGENTES.....	20
3.3	PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	21
3.4	ISOLAMENTO DE LINFÓCITOS DO TIMO E LINFONODOS MESENTÉRICOS.....	22
3.5	PROLIFERAÇÃO LINFOCITÁRIA.....	22
3.6	ANÁLISE DE ALQUILGLICERÓIS POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (GC-MS).....	23
3.6.1	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA CROMATOGRAFIA - EXTRAÇÃO LIPÍDICA.....	24
3.6.2	METANÓLISE ÁCIDA.....	25
3.6.3	ACETILAÇÃO.....	25
3.6.4	OBTENÇÃO DOS CROMATOGRAMAS.....	26
3.7	HEMATÓCRITO.....	26
3.8	CONCENTRAÇÃO DO PIGMENTO HEMOGLOBÍNICO NO SANGUE TOTAL.....	27
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	27
4	RESULTADOS	28
4.1	CAPACIDADE PROLIFERATIVA DE LINFÓCITOS DOS LINFONODOS MESENERICOS.....	28
4.2	CAPACIDADE PROLIFERATIVA DE LINFÓCITOS DO TIMO.....	32
4.3	AVALIAÇÃO DA INCORPORAÇÃO DE ALQUILGLICERÓIS EM LINFONODOS MESENTÉRICOS E TIMO.....	35
4.4	MASSA DOS ANIMAIS.....	38
4.5	MASSA DE ÓRGÃOS.....	39
4.6	HEMATÓCRITO E HEMOGLOBINA.....	40

5	DISCUSSÃO.....	41
6	CONCLUSÃO.....	49
	REFERÊNCIAS.....	50

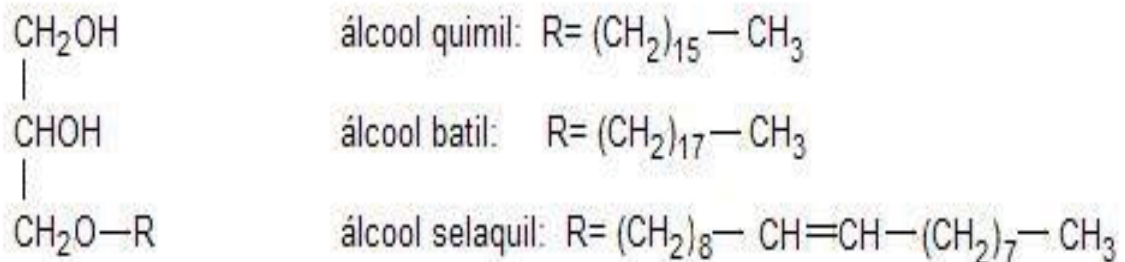
1 INTRODUÇÃO

1.1 ÓLEO DE FÍGADO DE TUBARÃO

Os lipídeos ou gorduras são compostos não solúveis em água. Nos seres vivos estas substâncias são responsáveis por uma série de processos metabólicos, sendo os triacilgliceróis a principal fonte de reserva de energia, e os fosfolipídios e esteróis importantes constituintes das membranas celulares.

O óleo de fígado de tubarão possui cerca de 30% a 50% do seu conteúdo lipídico composto por moléculas de alquilgliceróis (AKG), gorduras constituídas por uma cadeia hidrocarbônica, saturada ou insaturada, unida por ligação do tipo éter a uma das hidroxilas do glicerol (Figura 1) (BROHULT et al, 1977; HALLGREN et al, 1978; NAVARRO-GARCIA et al, 2000). Uma das principais fontes de AKG é o fígado do tubarão *Somnious microcephalus (greenland shark)*, seguido pelas espécies *Chimaera monstrosa (small shark)* e *Squalus acanthias (dog fish)* (PUGLIESE et al, 1998).

FIGURA 1: ESTRUTURA QUÍMICA DAS MOLÉCULAS DE ALQUILGLICEROL MAIS COMUNS



Os AKG mais comuns são denominados de álcoois quimil (hexadecilglicerol, 16:0), batil (octadecilglicerol, 18:0) e selaquil (octadecenilglicerol, 18:1) (IANNITI & PALMIERI, 2010), sendo esta nomenclatura relacionada às origens das famílias de espécies marinhas Chimaeroidei, Batoidei e Selachoidei, respectivamente. O número de átomos de carbono na cadeia alifática varia de 16 a 18, e o número de átomos de hidrogênio, de 33 a 35. O primeiro alquilglicerol a ser isolado e identificado foi o octadecilglicerol, em 1915, a partir de uma fração não-saponificável de *Asterias rubens*, e os álcoois quimil, batil e selaquil foram descritos

eosinófilos e mastócitos, e corresponde à primeira linha de defesa contra agentes infecciosos. Este sistema é capaz de impedir a entrada de agentes infecciosos no corpo, eliminá-los rapidamente se entrarem, além de impedir o desenvolvimento do câncer de forma direta ou indireta (VISSER et al., 2006), sendo, portanto, fundamental para a vigilância imunológica. O sistema imunitário inato está presente antes da exposição a antígenos, e possui enorme capacidade de produzir inúmeros mediadores químicos tais como quimiocinas, citocinas, e espécies reativas de oxigênio (EROs), dentre outros. Quando ativadas, as células deste sistema são fundamentais na modulação da sobrevivência celular (proliferação e morte), bem como no modelamento da matriz extracelular. A imunidade inata, ao contrário da adaptativa, não possui memória, e por isso não é influenciada por exposição anterior a um antígeno (CALDER 2007b).

O sistema imune adaptativo caracteriza-se por responder ao antígeno de modo específico, apresentando memória, sendo composto por células (linfócitos T e B) e por fatores humorais, as imunoglobulinas. É específico uma vez que cada linfócito apresenta receptor de membrana específico para um único antígeno. Seguindo a ativação linfocitária, e a remoção do agente patológico, são originadas células de memória as quais serão responsáveis pela resposta imunitária mais forte e efetiva após reexposição ao mesmo patógeno (CALDER, 2007a). Os linfócitos são classificados em linfócitos T (células maturadas no timo, que agem contra patógenos intracelulares e extracelulares, constituindo a imunidade mediada por células) e linfócitos B (células derivadas da medula óssea que produzem imunoglobulinas, combatem patógenos extracelulares e constituem a imunidade humoral). Linfócitos T apresentam receptores de membrana específicos para antígenos que, ao contrário dos linfócitos B, precisam ser apresentados a eles por outras células, as células apresentadoras de antígeno (CALDER, 2007).

Linfócitos B partem da medula óssea para a circulação, e vão para os órgãos linfóides secundários (ABBAS, 2007), sendo responsáveis pela imunidade humoral caracterizada pela produção e liberação de anticorpos capazes de neutralizar ou destruir antígenos que reconhecem especificamente. Para apresentar esta resposta, os linfócitos B devem ser ativados pelos antígenos para culminar no processo de proliferação e diferenciação. Os linfócitos B também funcionam como células apresentadoras de antígeno após interiorização e processamento da imunoglobulina ligada ao receptor de membrana. Proteínas do complemento

podem também fornecer sinais secundários para ativação por meio do receptor de membrana, e supõe-se ser este o mecanismo onde atuam os AKG (HEYMANS et al, 1987; ROBINSON et al, 1991; PUGLIESE et al, 1998). Sabendo que os AKG exercem atividade sobre a proteína quinase C (HEYMANS et al, 1987), que é a responsável pela proliferação e diferenciação celular, vemos a importância da sua influência neste processo fisiológico. De acordo com Heymans et al (1987), estruturas análogas ao diacilglicerol, com ligação do tipo éter na posição 1 do glicerol são pouco eficientes para a ativação da proteína quinase C, enquanto as mesmas estruturas, com ligação do tipo éter na posição 2 do glicerol e ligação éster na posição 1, apresentam a ativação da proteína quinase C. A ativação dos linfócitos T é essencial na resposta imunológica ao apresentar vários fatores de transcrição que produzem inúmeras interleucinas e citocinas. Os linfócitos T reconhecem os antígenos e em cooperação com os linfócitos B, estimulam a expansão clonal dos linfócitos B, bem como a diferenciação em linfócitos B de memória. Os linfócitos pré-T, no timo, sofrem o processo de seleção e maturação, migrando em direção a medula de onde saem para a circulação, sendo que a maturação destes envolve a expressão de um receptor de células T funcional e dos co-receptores CD4 e/ou CD8 (ABBAS, 2007).

O timo é um órgão linfóide primário, encapsulado, que atua como sítio de maturação de linfócitos T. É possível distinguir uma região cortical no órgão, onde há grande concentração e proliferação de células T. Algumas células T produzidas no córtex migram para a região denominada medula, onde entram nos vasos sanguíneos e somam-se aos linfócitos presentes no sangue periférico e em outros órgãos linfoides. O timo provê ambiente adequado para que diversos fatores induzam e sustentem o comprometimento da linhagem, a diferenciação e a sobrevivência das células T. No timo ocorre a maturação e a seleção de linfócitos T antígeno-específicos, e deste órgão ocorre a liberação seletiva dos linfócitos T para a periferia. O processo de maturação consiste no desenvolvimento de grande variedade de receptores específicos para diferentes antígenos, enquanto o processo de seleção consiste na eliminação de células T que desenvolveram receptores contra antígenos próprios (MIGNINI et al, 2014). Há no timo população de linfócitos B especiais, que provavelmente atuam, juntamente com o microambiente do timo, no processo de maturação dos linfócitos T (PERERA & HUANG, 2016).

Linfonodos são órgãos linfoides secundários encapsulados em forma de feijão que são subdivididos em 3 regiões principais: córtex, paracórtex e medula. Basicamente, linfócitos que não foram ativados pela presença de antígenos (linfócitos *naive*) entram nos linfonodos via vasos sanguíneos, mais especificamente em regiões dos vasos denominadas HEVs (*high endothelial venules*), ou via vasos linfáticos aferentes, e adentram o córtex dos linfonodos. Linfócitos T migram para a área de células T no paracórtex, enquanto que linfócitos B entram nos folículos de células B no córtex dos linfonodos. Se os linfócitos não reconhecem antígenos específicos no linfonodo “visitado”, eles deixam-no através de vasos linfáticos eferentes e retornam para a circulação sanguínea pelo ducto torácico (GIRARD et al, 2012).

Este ativo sistema imunitário é enormemente influenciado pelo consumo de gorduras da dieta, e vários processos fisiológicos são influenciados ou dependentes da gordura presente na alimentação. Os lipídeos ingeridos podem ser inseridos na bicamada lipídica das membranas celulares e servir como substrato para formação de mediadores químicos capazes de interferir na função das células (CALDER, 2007).

1.3 ALQUILGLICERÓIS E SISTEMA IMUNE

Estudos em mamíferos, incluindo humanos, sobre a absorção de alquilgliceróis obtidos na dieta iniciaram em meados de 1950. BERGSTROM & BLOMSTRAND (1956) demonstraram que os alquilgliceróis sn-1 e sn-3 eram completamente absorvidos pelas células intestinais, sem hidrólise da ligação éter. Após absorção, os alquilgliceróis sn-1 são incorporados nos lipídeos de diferentes tecidos, enquanto que os sn-3 são metabolizados para formar ácidos graxos correspondentes (DAS et al, 1992).

A suplementação com AKG tem sido avaliada como segura mesmo em doses bastante elevadas (ANADÓN *et al*, 2010), sendo capaz de interferir na funcionalidade das células do sistema imune inato e adaptativo de forma significativa, corroborando a premissa de vários trabalhos, descritos a seguir.

Na Europa, os AKG têm sido usados desde a década de 30, quando extratos lipídicos de medula óssea foram utilizados para tratar granulocitopenia MARBERG & WILES, (1938). Os benefícios da ingestão de AKG também foram verificados em

casos de leucemia infantil em 1952, quando os pacientes ingeriam gordura não saponificável obtida da medula óssea de gado como auxiliar do tratamento contra o câncer. A partir destes dados, estudos com pacientes portadoras de câncer de colo de útero submetidas a tratamento radioterápico e suplementadas com AKG (600mg/dia) durante três meses começaram a ser realizados. Observou-se que a maioria das pacientes apresentou significativa redução da leucopenia e da trombocitopenia, efeitos normalmente provocados pela radioterapia (BROHULT,1962; BROHULT et al, 1970; BROHULT et al,1977; BROHULT et al, 1978; BROHULT et al, 1979; BROHULT et al, 1986; KROTKIEWSKI et al, 2003).

A ação dos AKG sobre a imunidade tem sido avaliada em diferentes modelos experimentais, e foi recentemente revisada por IANNITI & PALMIERI (2010) e DENIAU *et al* (2010).

No estudo desenvolvido por OH & JADHAV (1994), a suplementação dietética com AKG sintéticos em ratas lactantes, nas doses de 0,5 mg, 2,5 mg e 12,5 mg por kg de ração, aumentou significativamente a concentração de éteres lipídicos no leite de forma dose-dependente. A concentração aumentada de AKG no leite induziu ao aumento de granulócitos no sangue periférico e de imunoglobulinas (IgG e IgM) no plasma dos filhotes amamentados, o que sugere que os AKG exercem função importante no desenvolvimento da resposta imunitária.

A suplementação crônica de fêmeas de suíno com óleo de fígado de tubarão (120 mg/kg de peso corpóreo) levou à produção de níveis mais elevados de eritrócitos, bem como à maior concentração de hemoglobina no sangue periférico (MITRE et al, 2005).

LEWKOWICZ et al. (2005) observaram aumento da resposta de neutrófilos na presença de bactérias, e aumento de citocinas do tipo Th1 no sangue de humanos suplementados com óleo de fígado de tubarão por quatro semanas (dose de 3,6 g de AKG /dia).

PALMIERI et al. (2014) investigaram o efeito do óleo de fígado de tubarão sobre a imunidade de idosos submetidos a diferentes tipos de cirurgias. Foi administrada a dose de 500 mg de AKG, duas vezes ao dia durante quatro semanas antes das cirurgias, e sangue foi coletado duas semanas antes das cirurgias e duas semanas depois. Foram observados aumento do número de células brancas totais

do sangue, da concentração de IgG e do número de linfócitos, melhorando significativamente o pós-operatório dos indivíduos estudados.

HAJIMORADI et al. (2009) investigaram o efeito de injeções intraperitoneais de óleo de fígado de tubarão (10 mg/Kg/dia, durante 20 dias) sobre a infiltração de linfócitos T no tecido tumoral (*spontaneous mouse mammary tumor*, SMMT) de camundongos BALB/c. Foi observado que houve aumento significativo de linfócitos T CD8+ nos tumores de animais suplementados com óleo de fígado de tubarão em relação aos animais não suplementados, bem como redução do volume do tumor. Ainda, a suplementação foi capaz de promover alteração do perfil de citocinas produzidas por células mononucleares esplênicas, especialmente pela elevação da produção de IFN- γ .

KANTAH et al. (2012) verificaram que a administração oral de 2 mg/dia de AKG em camundongos por 3 semanas elevou o número de linfócitos localizados no intestino delgado em cerca de 40% em relação aos animais não suplementados. Além disso foi verificado que a citotoxicidade de linfócitos contra células P815 (mastocitoma, clássico alvo para linfócitos T citotóxicos) foi também aumentada.

Vários estudos *in vitro* apontam para a capacidade dos AKG de estimular o sistema imune. HOMMA & YAMAMOTO (1990) realizaram estudos *in vitro* com células peritoneais aderentes (macrófagos) e não-aderentes (linfócitos T e B), obtidas de camundongos, incubadas com dodeciliglicerol, um alquilglicerol sintético de 12 carbonos, e observaram ativação da resposta imunitária por AKG (50 ng/ml). NGWENYA & FOSTER (1991) observaram os mesmos resultados em estudos *in vitro* com células peritoneais de camundongos deficientes em linfócitos T (BALB/c-nu/nu) e de camundongos saudáveis. Os resultados mostraram a necessidade de linfócitos T para a ativação de macrófagos mediada por AKG, e também a estimulação da produção de anticorpos induzida por estes compostos.

MARIGNY et al (2002) utilizou a concentração de 10 μ M de 1-O-alkylglycerols em seus estudos *in vitro* com células endoteliais e obteve aumento da inibição da permeabilidade endotelial, e considerando que mediadores pró-inflamatórios aumentam a permeabilidade, este resultado foi positivo na redução da ativação da PKC.

Estudos de QIAN et al (2014) também demonstraram que os AKG isolados (batil e quimil, 100 nM) foram capazes de modular as respostas imunes de camundongos *in vitro*, aumentando a proliferação e a maturação de linfócitos B

esplênicos, e promovendo a proliferação e diferenciação de linfócitos T para o subtipo Th1.

Os efeitos de éteres lipídicos sobre células do sistema imunitário e também sobre células tumorais pressupõem a incorporação de AKG nas células. Há na literatura alguns trabalhos que mostram identificação e quantificação de AKG em tecidos. WEBER (1985) administrou alquilglicerol radiomarcado (rac-1-O-[1'-¹⁴C] dodecilglicerol) a camundongos e observou altas proporções de lipídeos éteres incorporados em vários tecidos, predominantemente o fosfolípideo alquilacilglicerofosfocolina. De forma semelhante, DAS & HAJRA (1988) identificaram alta incorporação do grupo heptadecil unido por ligação éter em fosfolípideos de vários tecidos de ratos alimentados com 20 mg de alquilglicerol (1-O-heptadecilglicerol)/g de ração durante 10 dias. Em 1992, DAS et al publicaram estudo envolvendo suplementação crônica de pacientes portadores de deficiência congênita de éteres lipídicos nos tecidos com 5-10 mg do alquilglicerol (1-O-octadecilglicerol) / kg de massa corporal, e observaram aumento expressivo no conteúdo de éteres lipídicos em seus eritrócitos.

No Laboratório de Metabolismo Celular deste departamento os efeitos do óleo de fígado de tubarão sobre imunidade e também sobre crescimento tumoral vêm sendo avaliados desde o ano de 2005. Tem sido utilizado modelo animal, e dose de óleo de fígado de tubarão de 1 g/kg de massa corporal com a finalidade de comparação dos resultados obtidos com aqueles resultantes de investigações com óleo de peixe (também na dose de 1 g/kg de massa corporal, em modelo animal). Diferente da grande maioria dos estudos envolvendo suplementação com óleo de fígado de tubarão, os desenvolvidos no Laboratório de Metabolismo Celular têm adotado a suplementação crônica, ou seja, durante pelo menos oito semanas. Adotando este protocolo de suplementação foi verificada atividade imunoestimulatória do óleo de fígado de tubarão em ratos submetidos a exercício físico moderado (VITORINO et al, 2009), atividade aumentada de linfócitos de diferentes órgãos linfóides obtidos de animais portadores de tumor, acompanhada da redução do tamanho dos tumores de Walker 256 (IAGHER, 2008; IAGHER et al., 2011; IAGHER et al, 2013), e elevação da atividade de macrófagos de animais portadores de tumor de Walker 256 (BELO et al, 2010), entre outros efeitos.

Após análise dos dados encontrados na literatura, fica claro que diferentes concentrações de OFT ou de AKG isolados são utilizadas nos protocolos

experimentais. Além disso, a maioria dos estudos fundamenta-se em suplementação por períodos curtos de tempo. Essas diferenças de concentração e de tempo de suplementação podem gerar diferentes impactos sobre a função imunitária, e a compreensão da dose e do tempo de suplementação necessários para geração de impacto sobre a funcionalidade celular é fundamental para investigações futuras envolvendo o OFT, evitando o uso de subdoses ou doses elevadas demais, bem como falsas interpretações de resultados experimentais. Estabelecer o quanto há efetivamente de incorporação de AKG nas células dependendo da concentração de OFT oferecida e do tempo de suplementação, e relacionar a quantidade de AKG incorporada com alterações nas funções celulares é fundamental para a melhor compreensão da ação dos AKG nos tecidos. Ainda, como este óleo é um nutracêutico facilmente encontrado em estabelecimentos comerciais e disponível para consumo humano, é importante que haja evidências a respeito da dose e tempo de consumo necessários para obtenção dos resultados, e o estudo em animais é o primeiro passo nesta investigação.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Avaliar o efeito da suplementação com óleo de fígado de tubarão em diferentes doses e períodos de tempo sobre a capacidade proliferativa de linfócitos e incorporação celular de alquilgliceróis em tecidos linfóides de ratos da linhagem Wistar.

2.2 ESPECÍFICOS

Avaliar a proliferação de linfócitos obtidos de timo e linfonodos mesentéricos de animais submetidos às diferentes condições de suplementação.

Identificar e quantificar alquilgliceróis em timo e linfonodos mesentéricos de animais submetidos às diferentes condições de suplementação.

Avaliar a massa corpórea, e de tecidos – hepático, adiposo mesentérico e muscular do sóleo.

Avaliar a concentração de eritrócitos e de hemoglobina em sangue total.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratas da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*, var. albinus), com 90 dias de idade, obtidos do biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Os animais foram submetidos a ciclo invertido claro/escuro (12/12 horas), iniciando o ciclo claro às 19hs, com temperatura controlada de 21°C, água e alimentação (Nuvilab AR- Quimtia Ltda., Curitiba, PR, BRA, composta por 66% de carboidratos, 23% de proteínas, 4% de lipídios, 6% de fibras e 1% de vitaminas e minerais) “ad libitum”.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Metabolismo Celular no Departamento de Fisiologia do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados pelo Comissão de Ética para Uso de Animais - CEUA UFPR (certificado número 976).

3.2 SUPLEMENTOS E REAGENTES

O óleo de fígado de tubarão foi gentilmente cedido pela Naturalis Alimentos Naturais Ltda (São Paulo, SP, BRA). Os sais utilizados para preparo de tampões foram obtidos da Reagen Quimibrás Indústria Brasileira S/A (Rio de Janeiro, RJ, BRA), Vetec Química Fina Ltda (Rio de Janeiro, RJ, BRA) ou Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda (Diadema, SP, BRA). Meio de cultura (RPMI 1640), antibióticos (penicilina G e estreptomicina) e soro fetal bovino foram obtidos da Gibco (Grand Island, NY, USA). Os reagentes Concanavalina A, LPS, azul de tripan, foram obtidos da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). Alamar Blue® foi obtido da Biosource Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA). Os reagentes para obtenção dos cromatogramas foram da Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA) e Labsynth Produtos para Laboratórios Ltda (Diadema, SP, BRA).

3.3 PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Os animais foram separados em 5 grupos experimentais com 15 animais/grupo:

Grupo NS – não suplementado;

Grupo 1 – OFT na dose de 1g/kg de massa corporal/dia;

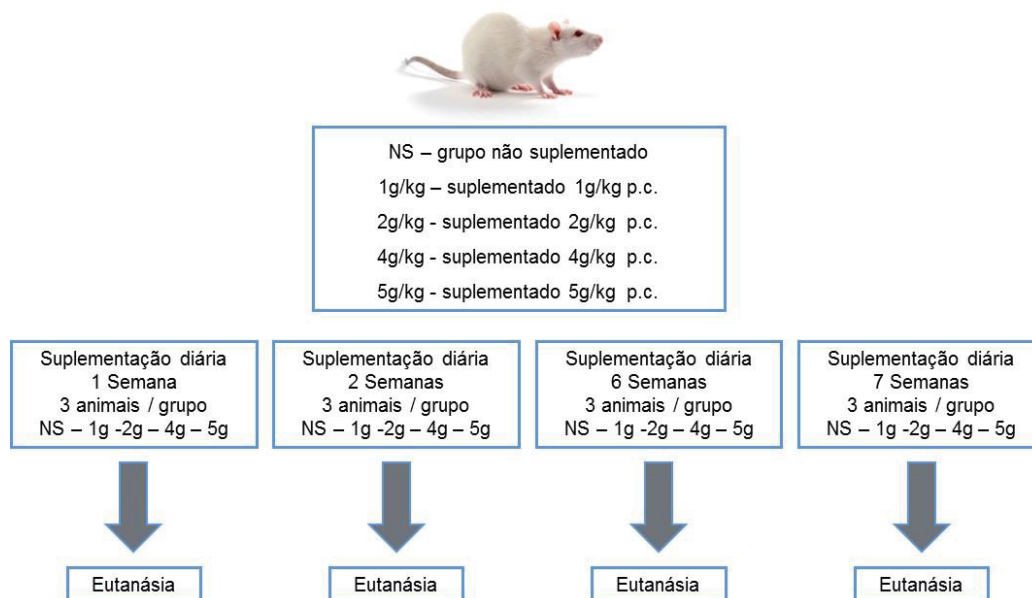
Grupo 2 – OFT na dose de 2g/kg de massa corporal /dia;

Grupo 4 – OFT na dose de 4g/kg de massa corporal /dia;

Grupo 5 - OFT na dose de 5g/kg de massa corporal /dia.

Três animais de cada grupo foram eutanasiados em cada período de tempo determinado: após 1 semana de suplementação, 2 semanas, 6 semanas e 7 semanas, conforme linha do tempo apresentada a seguir:

FIGURA 3. DESENHO EXPERIMENTAL



Os animais foram suplementados via oral com pipeta volumétrica, considerando sua massa corporal, mensurado a cada três dias em balança digital, antes da suplementação. A suplementação foi realizada após às 16h e antes das 22h, quando o ambiente tendia a ser mais calmo, evitando que o período de limpeza das caixas e da suplementação coincidisse, minimizando o estresse do animal.

Após cada período pré-definido de suplementação (1, 2, 6 ou 7 semanas), 3 animais de cada grupo foram eutanasiados por decapitação para obtenção do sangue, timo e linfonodos mesentéricos. A coleta destes tecidos teve como finalidade a extração lipídica para quantificação de AKG e a avaliação da funcionalidade de linfócitos. O fígado, o tecido adiposo mesentérico e o músculo sóleo foram coletados para aferição de massa.

3.4 ISOLAMENTO DE LINFÓCITOS DO TIMO E LINFONODOS MESENTÉRICOS

Para cada grupo de animais foi obtido *pool* de linfócitos dos órgãos linfoides (timo e linfonodos mesentéricos). Os órgãos linfoides (timo e linfonodos mesentéricos) foram mantidos em tampão fosfato com antibióticos (penicilina 10.000 UI e estreptomicina 10 mg/L) (PBS + AB), e macerados com auxílio de êmbolo de seringa em peneira de malha fina e placa de petri. O conteúdo macerado de linfonodos mesentéricos e timo foi filtrado em papel filtro apropriado e centrifugado a $1116 \times g$, durante 5 minutos, a 21°C. Após centrifugação o sobrenadante foi desprezado, e as células foram ressuspensas em solução contendo cloreto de amônio para lise de hemácias. Depois disso os precipitados foram lavados com PBS + AB por duas vezes, e o último precipitado foi ressuspense em meio de cultura RPMI1640.

3.5 PROLIFERAÇÃO LINFOCITÁRIA

Os linfócitos dos diferentes grupos foram cultivados em placas com fundo chato transparente de 96 poços em meio de cultura RPMI-1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino, contendo (penicilina 10.000 UI / estreptomicina 10 mg/L) no volume de 160 μ L de solução de células contendo 5×10^4 células/escavação, e mais:

- 20 μ L/poço do meio RPMI 1640, ou
- 20 μ L/poço do mitógeno concanavalina A (ConA – estimulante preferencial de linfócitos T), ou
- 20 μ L/poço do lipopolissacarídeo de *E. coli*. (LPS – estimulante preferencial de linfócitos B).

Então foram adicionados 20 µL/escavação do detector de atividade metabólica Alamar Blue® (Biosource), e as placas foram mantidas a 37 °C em atmosfera de 95 % ar / 5 % de CO₂ por 72 horas em incubadora de cultivo (Shel Lab 2350T). A determinação da porcentagem de redução do Alamar Blue foi realizada através de leitura fluorimétrica/colorimétrica. O ensaio Alamar Blue® é projetado para medir quantitativamente a proliferação de várias linhagens de células animais, bactérias e fungos. O ensaio é simples de realizar, uma vez que o indicador é solúvel em água, eliminando assim as etapas de lavagem / fixação e extração necessárias em outros ensaios de proliferação celular comumente protocolados. O ensaio Alamar Blue® incorpora um indicador de crescimento fluorimétrico / colorimétrico baseado em detecção de atividade metabólica. O indicador redox específico (fluorimétrico / colorimétrico) incorporado no Alamar Blue® foi escolhido devido a suas várias propriedades:

- Exibe fluorescência e alteração colorimétrica na faixa apropriada de oxidação-redução em relação à redução metabólica celular;
- É minimamente tóxico para células vivas;
- Produz uma mudança clara, estável e distinta, que é fácil de interpretar.

À medida que as células testadas proliferam, a atividade metabólica inata resulta em uma redução química de Alamar Blue®. O crescimento contínuo mantém o ambiente reduzido enquanto a inibição do crescimento mantém o ambiente oxidado. A redução relacionada ao crescimento faz com que o indicador REDOX mude da forma oxidada (não fluorescente, azul) à forma reduzida (fluorescente, vermelha).

A leitura da absorbância foi realizada em 570nm e 600nm pelo leitor multifuncional de microplacas Tecan Infinite® 200 nos momentos, 24, 48 e 72 horas após o plaqueamento.

3.6 ANÁLISE DE ALQUILGLICERÓIS POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSA (*Gas Chromatography – Mass Spectrometry – GC-MS*)

A cromatografia gasosa é um método para a identificação e quantificação de compostos químicos desconhecidos, analisando precisamente substâncias com diferentes concentrações, de microgramas a picogramas. É um tipo de

cromatografia em que a fase móvel é um gás, que separa substâncias que podem ser volatilizadas com facilidade, como é o caso dos lipídeos. O detector utilizado para esta análise foi da marca Shimadzu, modelo GCMS-TQ8040, alocado no Departamento de Química da UFPR.

Os compostos podem ser detectados pelo modo *Full Scan* (em inglês, *Monitoring Ion Current* – MIC- Corrente de Íons Monitorados) que analisa todos os íons presentes em uma amostra, ou pela varredura SIM (do inglês, *Selected Ion Monitoring*, Detecção Seletiva de Íons). O modo *Full Scan* apresenta todas as informações de uma ampla variedade de íons, que é útil para determinar uma vasta gama de compostos em apenas uma análise, ou determinar a identidade de um composto desconhecido a partir de seu espectro. Pelo modo SIM, que foi o que utilizamos, é possível programar o equipamento para que apenas os picos contendo compostos com razão massa/carga determinada sejam quantificados, ou seja, o cromatograma é gerado pesquisando apenas picos referentes a alquilgliceróis. O modo SIM gasta menos tempo na detecção de um sinal de íons que estejam relacionados a um determinado analito, auxiliando na detecção e evitando a interferência de outros compostos na amostra (HAGE, 2012). Utilizamos por sabermos de antemão quais compostos estavam sendo procurados, e que tipo de íons eles produzem no espectrômetro de massa.

3.6.1 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS PARA ANÁLISE CROMATOGRÁFICA - EXTRAÇÃO LIPÍDICA

Foi realizada de acordo com o método descrito por Folch et al (1956). Trinta miligramas de cada amostra de tecido foram utilizados para a extração. Após a pesagem, foi acrescentado ao tecido contido em tubo de vidro, 1,33 mL do solvente extrator (composto por metanol:clorofórmio, 1:2, v:v). O material foi homogeneizado com o auxílio de um homogeneizador (Biospect products, Tissue-Tearor model 985370). Em seguida, foram adicionados 480 µL de metanol ao homogenato, e o material foi então centrifugado a 5000 x g, por 10 minutos a 4°C. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de vidro e foram adicionados 960 µL de clorofórmio (para manter a proporção metanol:clorofórmio em 1:2 v:v). Na sequência, foram adicionados 550 µL de água ultrapura, e o sistema bifásico formado foi então submetido a uma intensa agitação, até não serem mais distinguíveis as suas duas

fases. Cerca de 10 minutos depois, após a reconstituição espontânea do sistema bifásico, o sobrenadante (aquoso) foi removido com o auxílio de uma micropipeta. Foi então adicionado 1 mL de Solução de Folch (metanol 48,98 %; água 47,96 %; clorofórmio 3,06 %; $MgCl_2$ 0,017 %; $CaCl_2$ 0,02 %; NaCl 0,37 %), lentamente para evitar a formação de emulsão, e de maneira que as paredes do tubo fossem lavadas com esta solução. Após a remoção do sobrenadante, este procedimento foi repetido mais duas vezes, e o infranadante submetido à secagem em nitrogênio gasoso.

3.6.2 METANÓLISE ACIDA

Os extratos lipídicos (obtidos pelo método de Folch) foram solubilizados em metanol-HCl (HCl 3% em metanol PA) e agitados em vórtex. Os conteúdos foram transferidos para tubos de hidrólise com tampa e mantidos em estufa a 100°C por 2 horas. Este procedimento hidrolisa ácidos graxos esterificados à estrutura do glicerol de fosfolipídeos e triacilgliceróis presentes nas amostras, restando apenas cadeia lipídica unida por ligação éter ao glicerol (alquilglicerol). Os ácidos graxos são convertidos em ácidos graxos livres metilados (metil ésteres) por este procedimento (SOUZA et al, 2007; SASSAKI et al, 1999).

3.6.3 ACETILAÇÃO

O conteúdo dos tubos de hidrólise foi secado em nitrogênio gasoso e a ele foram adicionados 200 μ L de anidrido acético + 200 μ L de piridina para ligação de grupamentos acetil nas extremidades livres do glicerol. Os tubos de hidrólise foram agitados em vórtex e mantidos em estufa a 100°C por 30 minutos para conclusão do procedimento (SASSAKI et al, 2008). Então foram novamente secados em nitrogênio gasoso, solubilizados em 1000 μ L de acetona e acondicionados no freezer a -20°C até o momento da leitura em GC-MS. Os padrões utilizados foram obtidos do próprio óleo de fígado de tubarão ECOMER® submetido aos mesmos procedimentos de metanólise ácida e acetilação, e injetados na mesma coluna capilar das amostras.

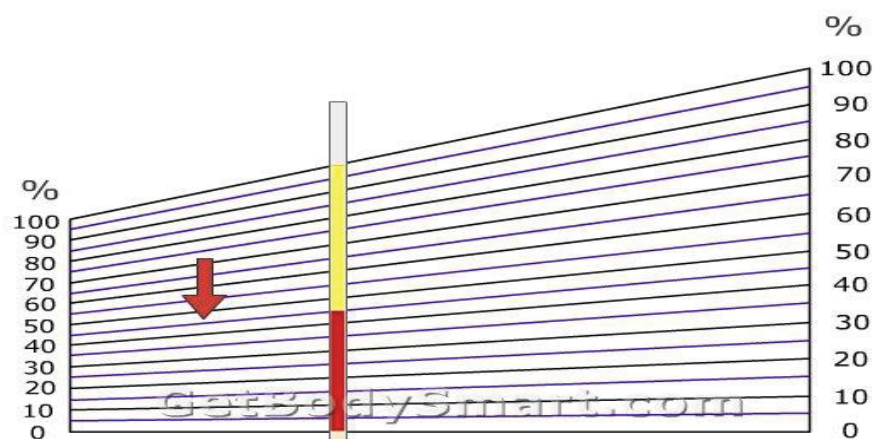
3.6.4 OBTENÇÃO DOS CROMATOGRAMAS – GC-MS

As amostras foram injetadas em cromatógrafo gasoso, sendo a amostra de OFT injetada para leitura no modo *Full Scan* a fim de detectar a presença de íons de razão massa/carga conhecidos. A identificação dos alquilgliceróis foi realizada pelos seguintes fragmentos: 117, referente ao glicerol; e 159, referente ao glicerol acetilado.

3.7 HEMATÓCRITO

O hematócrito é uma análise que pode ser efetuada separadamente do hemograma. Ele mede a porcentagem de volume ocupada pelas hemácias contidas em um volume de sangue. Sangue total heparinizado foi colocado em capilar de vidro e levado à centrifuga de micro hematócrito, de forma que as hemácias ficassem firmemente concentradas em uma coluna vermelha, separada do plasma. A medida foi realizada com auxílio de uma tabela, em superfície plana, alinhando na régua o início da linha vermelha da coluna com o zero, e o final da coluna do plasma em linha 100 (conforme Figura 4). O resultado corresponde à altura da coluna vermelha encontrada, expressa em %.

FIGURA 4. RÉGUA UTILIZADA PARA MEDIÇÃO DE HEMATÓCRITO.



FONTE: PATOLOGIA CLÍNICA VETERINÁRIA UFF.

3.8 CONCENTRAÇÃO DO PIGMENTO HEMOGLOBÍNICO NO SANGUE TOTAL

É determinada através da concentração do pigmento hemoglobínico no sangue total, sendo o resultado expresso em g% de sangue. Foi utilizado o método da cianometahemoglobina, onde os compostos de hemoglobina são convertidos a cianometahemoglobina sob a ação do cianeto de potássio e do ferricianeto de potássio. 20 microlitros de sangue foram colocados em 4 mL de solução de Drabkin (solução contendo ferrocianeto de potássio), e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (marca Siel 500) no comprimento de onda de 540 nm. O resultado foi obtido a partir do cálculo da absorbância lida relacionada a um padrão externo de valor conhecido, e o resultado expresso em g% de sangue.

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados apresentados estão expressos como média \pm erro padrão da média. Dados de proliferação linfocitária foram submetidos à análise de variância de duas vias (fatores: dose de OFT e tempo de incubação) pareada, e pós-teste de Tukey. Os valores de massa corpórea foram submetidos à área sob a curva (que utiliza os dados da média e do desvio padrão de cada grupo para aí então comparar cada grupo entre si), e análise de variância de duas vias (fatores: dose de OFT e tempo de suplementação) e pós-teste de Tukey. Os valores de hematócrito, concentração do pigmento hemoglobínico, e peso dos órgãos foram submetidos à análise de variância de uma via, e pós-teste de Tukey. Toda a análise estatística foi realizada utilizando-se o software GraphPad Prism 7®, com intervalo de confiança $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 CAPACIDADE PROLIFERATIVA DE LINFÓCITOS DE LINFONODOS MESENTÉRICOS

A FIGURA 5 mostra a capacidade proliferativa de linfócitos obtidos de animais dos diferentes grupos, após 4 diferentes períodos de suplementação com OFT (1, 2, 6 e 7 semanas), estimulados com o mitógeno concanavalina A durante 24, 48 e 72h de cultivo.

Após uma semana de suplementação, linfócitos de animais do grupo 5 g/kg apresentaram proliferação igual ou inferior à observada nos demais grupos, após 24, 48 e 72 h de cultivo ($p < 0,05$). Observa-se também que os animais suplementados com 1 g/kg, 2 g/kg e 4 g/kg apresentaram proliferação superior à dos animais não suplementados (grupo NS) apenas após 72 h ($p < 0,05$). Também é possível perceber que após 72 h em contato com o mitógeno houve aumento significativo da proliferação linfocitária dos grupos 1, 2 e 4 g/kg em relação aos respectivos grupos cultivados por 24 h e 48 h ($p < 0,05$).

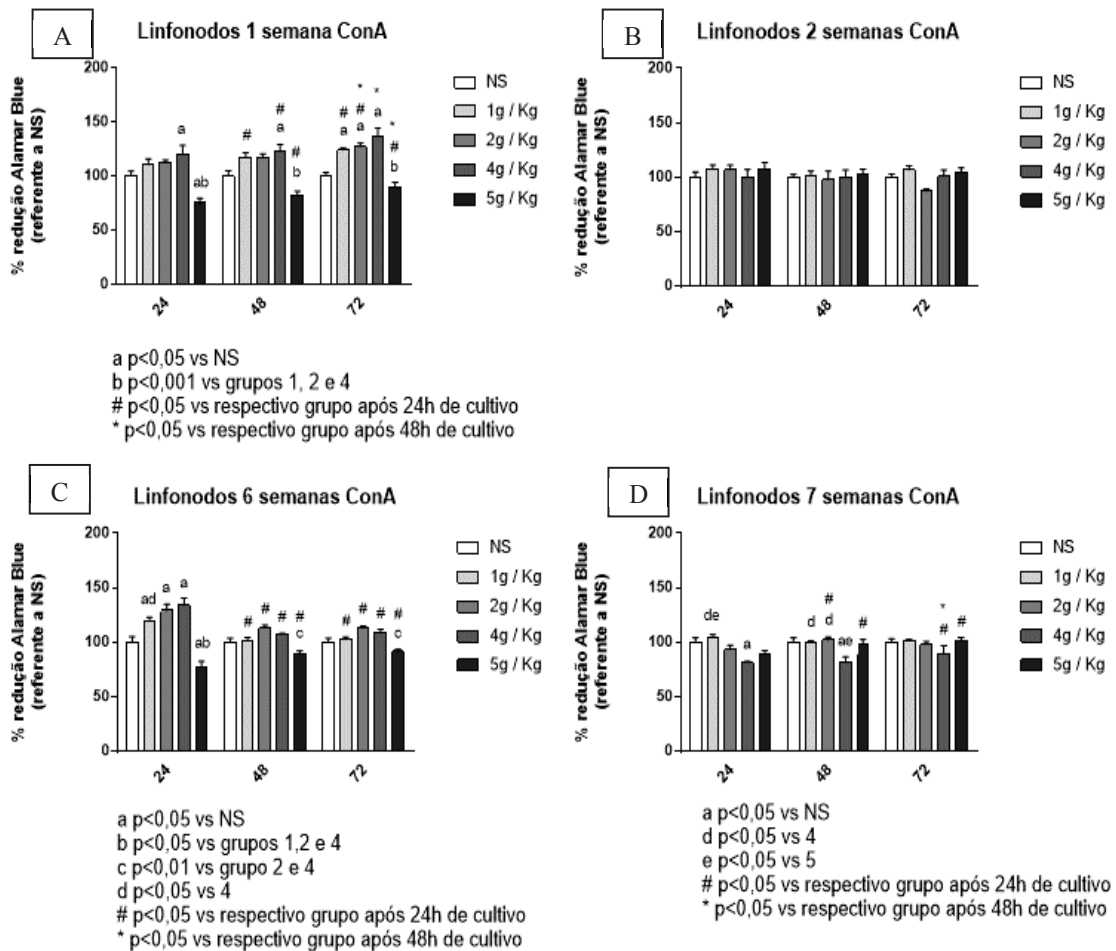
Após duas semanas de suplementação, o grupo 5 g/kg não apresentou redução de sua capacidade proliferativa em relação aos demais grupos, nos três tempos analisados, e não houve diferença entre os grupos no mesmo tempo de cultivo, nem mesmo entre grupos de tempo de cultivo diferentes ($p > 0,05$).

O padrão de resposta volta a mudar após 6 semanas de suplementação. A capacidade proliferativa dos linfócitos dos grupos, exceto do grupo 5 g/kg, apresenta a maior elevação em relação ao grupo NS logo após 24 horas de cultivo ($p < 0,05$). O grupo 5 g/kg volta a apresentar redução da proliferação em relação ao grupo NS após 24 de cultivo ($p < 0,05$), e permanece com valor semelhante ao observado para NS após 48 e 72 h de cultivo ($p > 0,05$). É possível perceber que após 48 e 72 h de cultivo há sutil, porém, significativa redução na capacidade proliferativa dos grupos 1, 2, 4 e 5 g/kg em relação aos mesmos grupos cultivados por 24 h ($p < 0,05$).

Após 7 semanas de suplementação, o efeito de elevação da proliferação após pouco tempo de cultivo (24 h) nos grupos 1, 2 e 4 g/kg em relação ao grupo NS não aparece, havendo, pelo contrário, redução da capacidade proliferativa no grupo 4 g/kg, o que também é detectado após 48 h de cultivo ($p < 0,05$). A elevação

da capacidade proliferativa com mais tempo em contato com mitógeno (48 e 72 h) em relação ao tempo de 24 h é mais pontual que o aumento observado após 1 e 6 semanas de suplementação, aparecendo apenas em alguns grupos.

FIGURA 5: CAPACIDADE PROLIFERATIVA DE LINFÓCITOS OBTIDOS DE LINFONODOS MESENTÉRICOS, DADA PELA % DE REDUÇÃO DE ALAMAR BLUE®, DOS GRUPOS 1 G/KG (SUPLEMENTADO COM 1G DE OFT/KG DE PESO CORPÓREO), 2 G/KG, 4 G/KG E 5 G/KG, EM RELAÇÃO AO GRUPO NÃO SUPLEMENTADO (NS), APÓS 24, 48 E 72 H DE CULTIVO CELULAR NA PRESENÇA DE CONCANAVALINA A (CONA). A: APÓS 1 SEMANA DE SUPLEMENTAÇÃO DIÁRIA; B: APÓS 2 SEMANAS; C: APÓS 6 SEMANAS; E D: APÓS 7 SEMANAS. ^a P<0,05 EM RELAÇÃO AO GRUPO NS; ^b P<0,001 EM RELAÇÃO AOS GRUPOS 1, 2 E 4 G/KG; ^c P<0,01 EM RELAÇÃO AOS GRUPOS 2 E 4 G/KG; ^d P<0,05 EM RELAÇÃO AO GRUPO 4 G/KG; ^e P<0,05 EM RELAÇÃO AO GRUPO 5G/KG; # P<0,05 EM RELAÇÃO AO RESPECTIVO GRUPO APÓS 24 H DE CULTIVO; * P<0,05 EM RELAÇÃO AO RESPECTIVO GRUPO APÓS 48 H DE CULTIVO. 24, 48 e 72 REFEREM-SE ÀS HORAS DE INCUBAÇÃO E RESPECTIVA LEITURA EM ESPECTROFOTOMETRO.



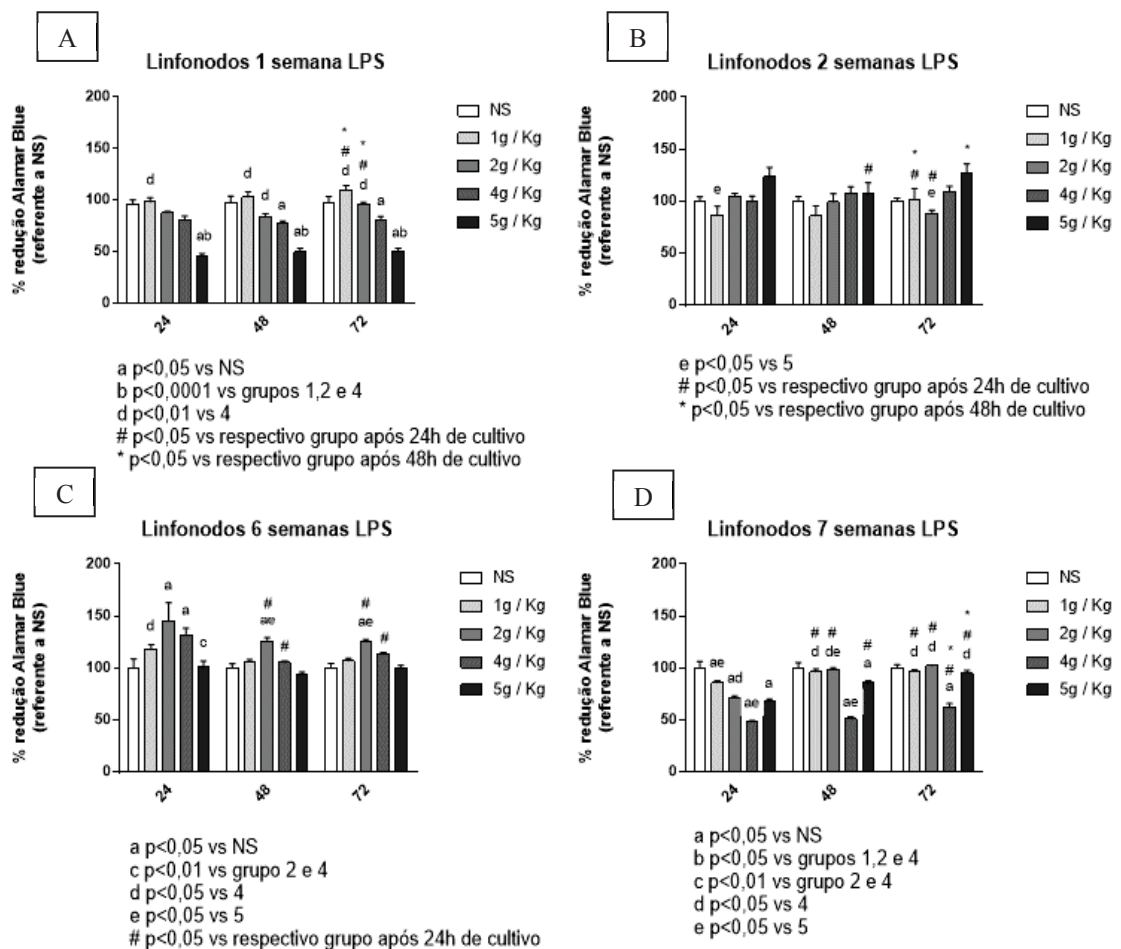
A proliferação de linfócitos obtidos de linfonodos mesentéricos estimulada por LPS está apresentada na Figura 5. Uma semana de suplementação não foi capaz de alterar a proliferação celular do grupo 1 g/kg em relação ao grupo NS ($p > 0,05$), e as demais doses (relativas aos grupos 2, 4 e 5 g/kg) mantiveram a capacidade proliferativa igual ou inferior à do grupo NS, sendo que a maior dose (5 g/kg) reduziu cerca de 50 % a proliferação celular em relação ao grupo NS ($p < 0,0001$). Apesar da ausência de resposta promovida pelo OFT ofertado nas doses 1 e 2g/kg, após 72 h na presença do desafio imune (LPS) houve discreto aumento da proliferação celular nestes grupos em relação aos mesmos grupos após 24 e 48h de cultivo ($p < 0,05$).

Depois de 2 semanas de suplementação, apenas os linfócitos do grupo 1 g/kg proliferaram mais após 72 h de cultivo em relação ao mesmo grupo após 24 h e 48 h na presença de LPS ($p < 0,05$). E ao contrário do que foi visto na semana 1, na semana 2 a dose de 5 g/kg levou à tendência de aumento da proliferação em relação ao grupo NS após 24, 48 e 72 h de estímulo com mitógeno.

Ao final de 6 semanas de suplementação, o cultivo dos linfócitos por 24 h foi capaz de elevar a capacidade proliferativa de forma significativa nos grupos 2 e 4 g/kg, em relação ao grupo NS ($p < 0,05$). Esta capacidade foi mantida superior ao grupo NS após 48 e 72 h de cultivo ($p < 0,05$) no grupo 2 g/kg, porém inferior em relação ao mesmo grupo após 24 h de cultivo ($p < 0,05$).

Após 7 semanas, o grupo 4 g/kg foi o que apresentou menor capacidade proliferativa em relação ao grupo NS ($p < 0,05$), após 24, 48 e 72 h. Os grupos 1, 2 e 5 g/kg apresentaram elevação gradativa da proliferação linfocitária após 48 e 72 h ($p < 0,05$), sem superar, no entanto, a proliferação do grupo NS.

FIGURA 6: CAPACIDADE PROLIFERATIVA DE LINFÓCITOS OBTIDOS DE LINFONODOS MESENTÉRICOS, DADA PELA % DE REDUÇÃO DE ALAMAR BLUE®, DOS GRUPOS 1 G/KG (SUPLEMENTADO COM 1 G DE OFT/KG DE PESO CORPÓREO), 2 G/KG, 4 G/KG E 5 G/KG, EM RELAÇÃO AO GRUPO NÃO SUPLEMENTADO (NS), APÓS 24, 48 E 72 H DE CULTIVO CELULAR NA PRESENÇA DE LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS). A: APÓS 1 SEMANA DE SUPLEMENTAÇÃO DIÁRIA; B: APÓS 2 SEMANAS; C: APÓS 6 SEMANAS; E D: APÓS 7 SEMANAS. ^a P<0,05 EM RELAÇÃO AO GRUPO NS; ^b P<0,001 EM RELAÇÃO AOS GRUPOS 1,2 E 4 G/KG; ^c P<0,01 EM RELAÇÃO AOS GRUPOS 2 E 4 G/KG; ^d P<0,05 EM RELAÇÃO AO GRUPO 4 G/KG; ^e P<0,05 EM RELAÇÃO AO GRUPO 5 G/KG; # P<0,05 EM RELAÇÃO AO RESPECTIVO GRUPO APÓS 24 H DE CULTIVO; * P<0,05 EM RELAÇÃO AO RESPECTIVO GRUPO APÓS 48 H DE CULTIVO. 24, 48 e 72 REFEREM-SE ÀS HORAS DE INCUBAÇÃO E RESPECTIVA LEITURA EM ESPECTROFOTOMETRO.



4.2 CAPACIDADE PROLIFERATIVA DE LINFÓCITOS DE TIMO

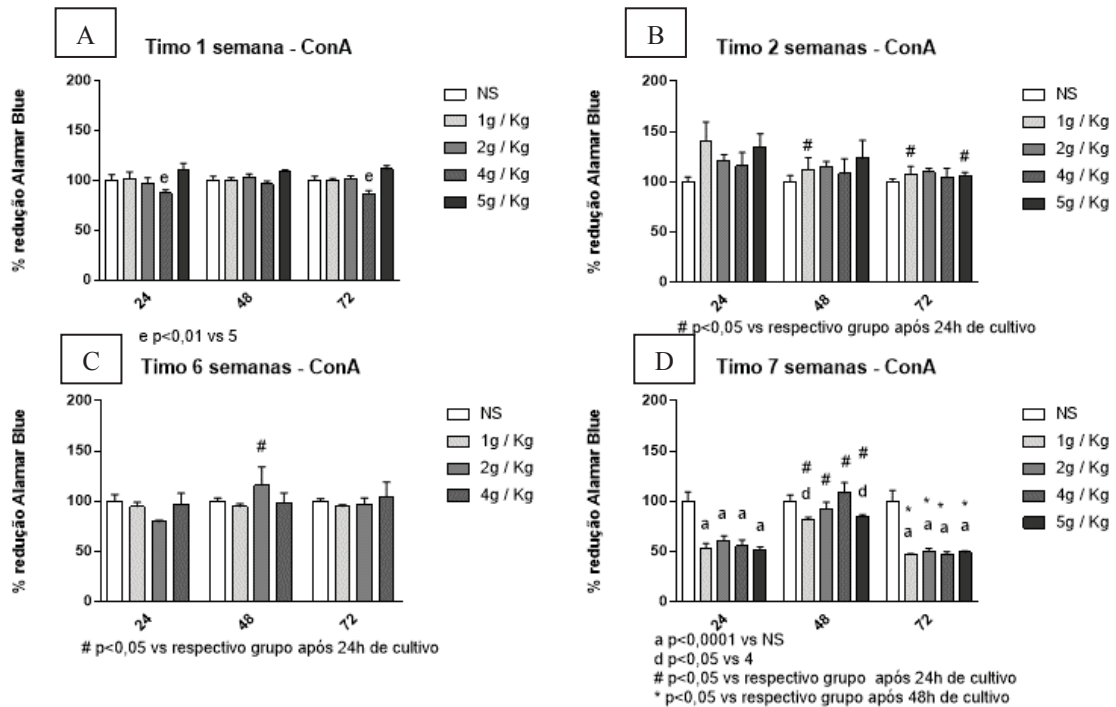
Linfócitos obtidos do timo dos animais dos diferentes grupos, e mantidos em cultivo na presença de ConA (FIGURA 6) apresentaram padrão de proliferação bastante diferente daquele visto para os linfócitos de linfonodos mesentéricos submetidos ao mesmo estímulo. Uma semana de suplementação com OFT não promoveu alterações significativas da capacidade proliferativa dos linfócitos de animais suplementados (grupos 1, 2, 4 e 5 g/kg) em relação a dos animais do grupo NS ($p>0,05$).

Após 2 semanas observa-se, já após 24 h de cultivo, elevação da proliferação de linfócitos de animais do grupo 1 g/kg em relação a NS, apesar de não significativa ($p=0,1862$), proliferação esta que reduz após 48 e 72 h ($p<0,05$). O grupo 5 g/kg apresenta redução da proliferação após 72 h de cultivo em relação ao mesmo grupo após 24 h ($p<0,05$).

Após 6 semanas de suplementação não foram observadas alterações na capacidade proliferativa linfocitária, exceto pela elevação registrada para o grupo 2g/kg após 48h de cultivo em relação ao mesmo grupo após 24 h ($p<0,05$).

Sete semanas de suplementação foram capazes de mudar drasticamente o padrão de resposta das células, havendo redução acentuada da proliferação linfocitária dos grupos suplementados (grupos 1, 2, 4 e 5 g/kg) em relação ao grupo NS, após 24 e 72 h de cultivo na presença de ConA ($p>0,05$). Após 48 h de cultivo, entretanto, esta redução não foi observada ($p>0,05$), mas sim uma tendência da proliferação linfocitária dos grupos suplementados (1, 2, 4 e 5 g/kg) de alcançar a proliferação observada para o grupo NS.

FIGURA 7: CAPACIDADE PROLIFERATIVA DE LINFÓCITOS OBTIDOS DE TIMO, DADA PELA % DE REDUÇÃO DE ALAMAR BLUE®, DOS GRUPOS 1 G/KG (SUPLEMENTADO COM 1G DE OFT/KG DE PESO CORPÓREO), 2 G/KG, 4 G/KG E 5 G/KG, EM RELAÇÃO AO GRUPO NÃO SUPLEMENTADO (NS), APÓS 24, 48 E 72 H DE CULTIVO CELULAR NA PRESENÇA DE CONCANAVALINA A (CONA). A: APÓS 1 SEMANA DE SUPLEMENTAÇÃO DIÁRIA; B: APÓS 2 SEMANAS; C: APÓS 6 SEMANAS; E D: APÓS 7 SEMANAS. ^a P<0,05 EM RELAÇÃO AO GRUPO NS; ^d P<0,05 EM RELAÇÃO AO GRUPO 4 G/KG; ^e P<0,05 EM RELAÇÃO AO GRUPO 5 G/KG; # P<0,05 EM RELAÇÃO AO RESPECTIVO GRUPO APÓS 24 H DE CULTIVO; * P<0,05 EM RELAÇÃO AO RESPECTIVO GRUPO APÓS 48 H DE CULTIVO. 24, 48 e 72 REFEREM-SE ÀS HORAS DE INCUBAÇÃO E RESPECTIVA LEITURA EM ESPECTROFOTOMETRO.



Células obtidas do timo de animais suplementados durante 1 semana (Figura 7) apresentaram maior capacidade proliferativa em relação ao grupo NS apenas após 72 horas de cultivo com LPS (grupos 1 e 5 g/kg; $p < 0,05$). O grupo 1 g/kg apresentou maior proliferação após 72 h em relação ao mesmo grupo cultivado por 24 h ($p < 0,05$), e o grupo 5 g/kg apresentou valores superiores aos encontrados para o mesmo grupo após 24 e 48 h ($p < 0,05$). Em todos os períodos de cultivo (24, 48 e 72h), o grupo 4 g/kg apresentou menor capacidade proliferativa que os grupos 2 e 5 g/kg.

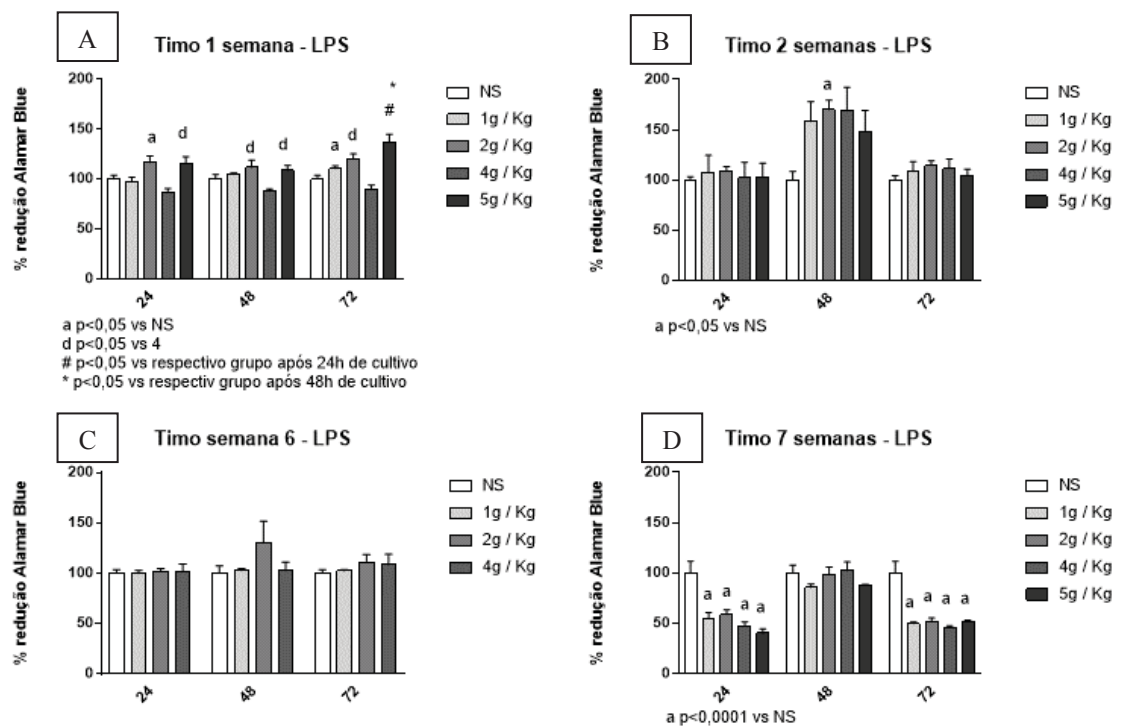
Após 2 semanas de suplementação, a capacidade de proliferação dos linfócitos apresentou-se bastante elevada depois de 48 h na presença de LPS. Este aumento não foi observado após outros períodos de suplementação.

Após 6 semanas de suplementação, não foram observadas alterações entre os grupos exceto pelo aumento da proliferação, porém não significativo,

apresentado pelas células do grupo 2g/kg após 48 h de cultivo com LPS, em relação ao grupo NS ($p > 0,05$).

Após 7 semanas de suplementação, as células de animais suplementados de todos os grupos apresentaram redução na capacidade proliferativa após 24 e 72 h de cultivo com mitógeno. Após 48h, no entanto, os linfócitos de grupos suplementados apresentaram proliferação semelhante a observada para o grupo NS.

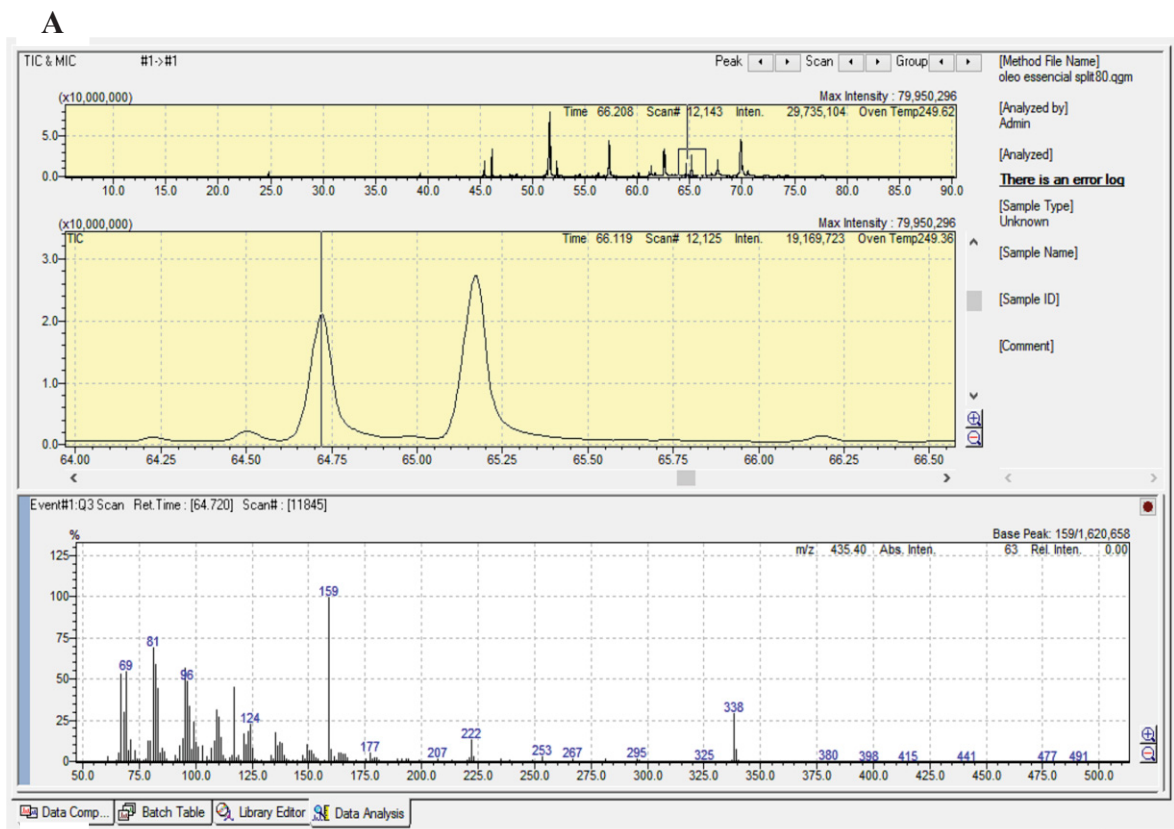
FIGURA 8: CAPACIDADE PROLIFERATIVA DE LINFÓCITOS OBTIDOS DE TIMO, DADA PELA % DE REDUÇÃO DE ALAMAR BLUE®, DOS GRUPOS 1 G/KG (SUPLEMENTADO COM 1 G DE OFT/KG DE PESO CORPÓREO), 2 G/KG, 4 G/KG E 5 G/KG, EM RELAÇÃO AO GRUPO NÃO SUPLEMENTADO (NS), APÓS 24, 48 E 72 H DE CULTIVO CELULAR NA PRESENÇA LIPOPOLISSACARÍDEO (LPS). 24, 48 e 72 REFEREM-SE ÀS HORAS DE INCUBAÇÃO E RESPECTIVA LEITURA EM ESPECTROFOTOMETRO.



4.3 AVALIAÇÃO DA INCORPORAÇÃO DE ALQUILGLICERÓIS EM TIMO E LINFONODOS MESENTÉRICOS

Após suplementação com diferentes concentrações e períodos de tempo com óleo de fígado de tubarão, foram coletados timo e linfonodos mesentéricos. A Figura 10 apresenta cromatograma obtido após extração lipídica, metanólise e acetilação do óleo de fígado de tubarão, que serviu como padrão para identificação e quantificação dos alquilgliceróis nos tecidos coletados. Os picos registrados em diferentes tempos de retenção (A) referem-se a diferentes moléculas de natureza lipídica, dentre as quais estão os diferentes alquilgliceróis. Após fragmentação das moléculas, os espectros de massa (B) foram gerados para que a identificação dos alquilgliceróis fosse realizada.

FIGURA 9: CROMATOGRAMA (A) GERADO EM CROMATÓGRAFO GASOSO, E ESPECTRO DE MASSA (B) OBTIDOS A PARTIR DE ÓLEO DE FÍGADO DE TUBARÃO APÓS EXTRAÇÃO LIPÍDICA, METANÓLISE E ACETILAÇÃO. A IDENTIFICAÇÃO DOS ALQUILGLICEROIS É REALIZADA PELA PRESENÇA DOS FRAGMENTOS 117 (REFERENTE AO GLICEROL) E 159 (REFERENTE AO GLICEROL ACETILADO).



A TABELA 1 apresentam a porcentagem de AKG identificados e quantificados a partir de linfonodos mesentéricos de animais dos diferentes grupos. Apesar de os valores apresentados terem sido obtidos de somente um animal por grupo, é possível observar que a quantidade de AKG aumenta em relação ao animal não suplementado após 6 semanas de suplementação, e não para todos os grupos. Após 7 semanas de suplementação foi observada a maior porcentagem de AKG em relação ao grupo NS.

TABELA 1: AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE ALQUILGLICERÓIS (%) OBTIDOS DE LINFONODOS MESENTÉRICOS DE ANIMAIS SUPLEMENTADOS DURANTE DIFERENTES PERÍODOS DE TEMPO COM 1, 2, 4 E 5 G/KG DE ÓLEO DE FÍGADO DE TUBARÃO, EM RELAÇÃO AO GRUPO NÃO-SUPLEMENTADO (NS).

	Grupos			
	1 g/kg	2 g/kg	4 g/kg	5 g/kg
Semana 1	0	0	0	0
Semana 2	0	0	0	0
Semana 6	25%	4%	0	0
Semana 7	5%	213%	0	187%

Os valores apresentados referem-se à porcentagem de alquilgliceróis identificados e quantificados no órgão (linfonodos mesentéricos) de um animal por grupo.

Em relação ao timo (TABELA 2) observou-se que a porcentagem de AKG foi mais elevada nos animais suplementados em relação ao grupo NS já após 1 semana de suplementação, sendo que após 2 semanas todos os grupos suplementados apresentaram valores positivos.

TABELA 2: AUMENTO DA CONCENTRAÇÃO DE ALQUILGLICERÓIS (%) OBTIDOS DE TIMO DE ANIMAIS SUPLEMENTADOS DURANTE DIFERENTES PERÍODOS DE TEMPO COM 1, 2, 4 E 5 G/KG DE ÓLEO DE FÍGADO DE TUBARÃO, EM RELAÇÃO AO GRUPO NÃO-SUPLEMENTADO (NS).

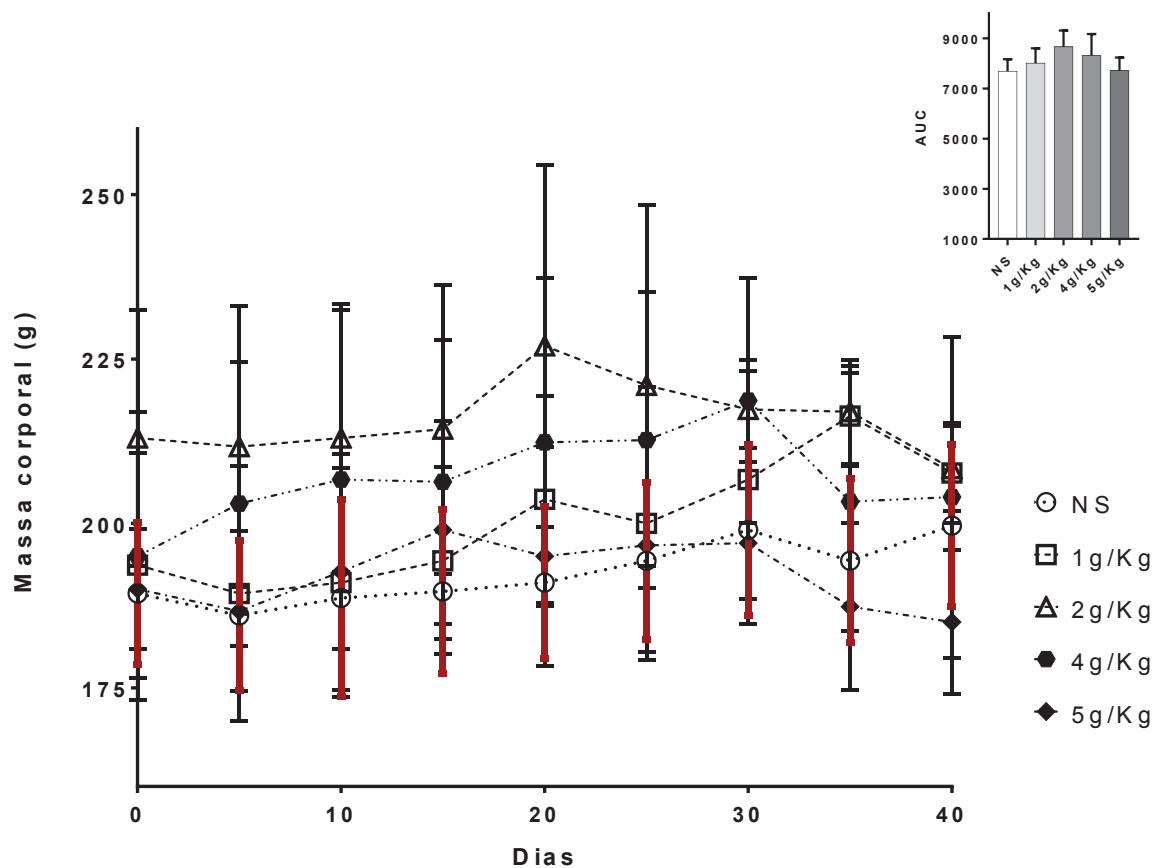
	Grupos			
	1 g/kg	2 g/kg	4 g/kg	5 g/kg
Semana 1	0	18%	0	131%
Semana 2	16%	40%	68%	7%
Semana 6	0	0	0	78%
Semana 7	53%	6%	0	0

Os valores apresentados referem-se à percentagem de alquilgliceróis identificados e quantificados no órgão (timo) de um animal por grupo.

4.4 MASSA DOS ANIMAIS

A evolução de massa corporal dos animais durante o período de experimentação está apresentada na Figura 10. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados, ou seja, mesmo os animais que receberam a maior dose de OFT (5 g/kg) não tiveram alteração de massa corpórea. A variação de peso para esta idade (animais de 90 dias) ocorreu dentro dos parâmetros de referência para animais de laboratório (HAYAKAWA, 2001).

FIGURA 10. EVOLUÇÃO DA MASSA CORPORAL DOS ANIMAIS DOS GRUPOS NS (NÃO SUPLEMENTADO), 1 G/KG (SUPLEMENTADO COM 1 G/KG P.C.), 2 G/KG (SUPLEMENTADO COM 2G/KG P.C.), 4 G/KG (SUPLEMENTADO COM 4 G/KG P.C.), E 5 G/KG (SUPLEMENTADO COM 5 G/KG P.C.) DURANTE 40 DIAS DE SUPLEMENTAÇÃO – (n=60)



4.5 MASSA DE ÓRGÃOS

Fígado, tecido adiposo mesentérico e músculo sóleo dos animais foram avaliados. Não houve diferença estatística entre os grupos em nenhum parâmetro avaliado.

FIGURA 11: MASSA DO FÍGADO (G) DOS ANIMAIS DOS GRUPOS NS (CONTROLE, SEM SUPLEMENTAÇÃO), 1 G/KG (SUPLEMENTADOS COM 1 G/KG P.C.), 2 G/KG (SUPLEMENTADOS COM 2 G/KG P.C.), 4 G/KG (SUPLEMENTADOS COM 4 G/KG P.C.), E 5 G/KG (SUPLEMENTADOS COM 5 G/KG P.C.), (n-60).

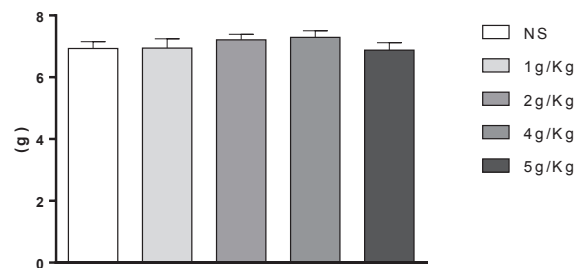


FIGURA 12: MASSA DE TECIDO ADIPOSEO MESENTÉRICO (G) DOS ANIMAIS DOS GRUPOS NS (CONTROLE, SEM SUPLEMENTAÇÃO), 1 G/KG (SUPLEMENTADOS COM 1 G/KG P.C.), 2 G/KG (SUPLEMENTADOS COM 2 G/KG P.C.), 4 G/KG (SUPLEMENTADOS COM 4 G/KG P.C.), E 5 G/KG (SUPLEMENTADOS COM 5 G/KG P.C.), (n-60).

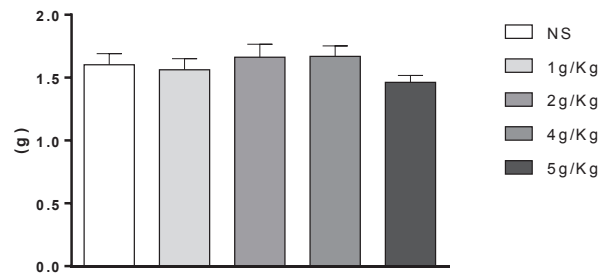
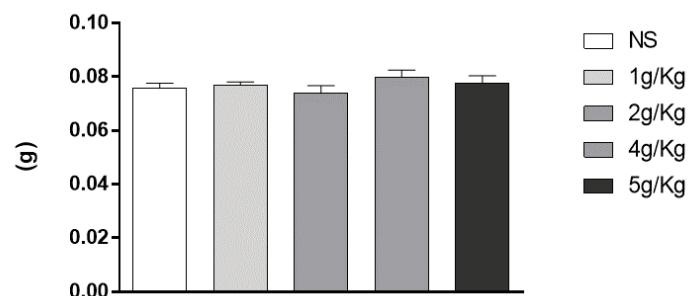


FIGURA 13: MASSA DO MÚSCULO SÓLEO (G) DOS ANIMAIS DOS GRUPOS NS (CONTROLE, SEM SUPLEMENTAÇÃO), 1 G/KG (SUPLEMENTADOS COM 1 G/KG P.C.), 2 G/KG (SUPLEMENTADOS COM 2 G/KG P.C.), 4 G/KG (SUPLEMENTADOS COM 4 G/KG P.C.), E 5 G/KG (SUPLEMENTADOS COM 5 G/KG P.C.), (n-60).



4.6 HEMATÓCRITO E HEMOGLOBINA

Os valores encontrados estão dentro dos parâmetros de referência para animais de laboratório (HAYAKAWA, 2001), e não apresentaram significância estatística entre os grupos.

FIGURA 14: HEMATÓCRITO (%) DOS ANIMAIS DOS GRUPOS NS (CONTROLE, SEM SUPLEMENTAÇÃO), 1 G/KG (SUPLEMENTADOS COM 1 G/KG P.C.), 2 G/KG (SUPLEMENTADOS COM 2 G/KG P.C.), 4 G/KG (SUPLEMENTADOS COM 4 G/KG P.C.), E 5 G/KG (SUPLEMENTADOS COM 5 G/KG P.C.), (n-60).

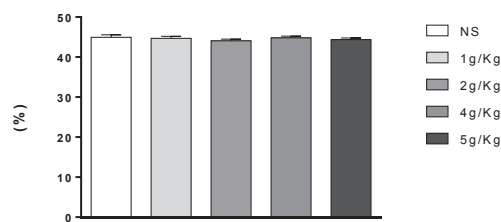
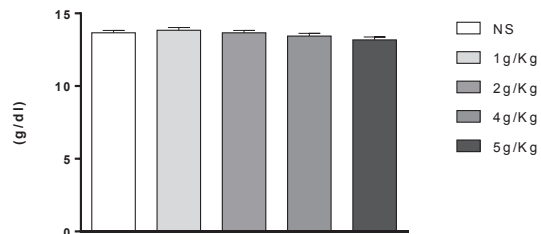


FIGURA 15: HEMOGLOBINA (g/dL) DOS ANIMAIS DOS GRUPOS NS (CONTROLE, SEM SUPLEMENTAÇÃO), 1 G/KG (SUPLEMENTADOS COM 1 G/KG P.C.), 2 G/KG (SUPLEMENTADOS COM 2 G/KG P.C.), 4 G/KG (SUPLEMENTADOS COM 4 G/KG P.C.), E 5 G/KG (SUPLEMENTADOS COM 5 G/KG P.C.), (n-60).



5 DISCUSSÃO

A suplementação com OFT pode modular as respostas imunes aumentando a proliferação e maturação de linfócitos (QIAN et al, 2014). No entanto os estudos envolvendo OFT e função linfocitária utilizam diferentes doses de OFT e diferentes tempos de suplementação, não havendo pesquisas na área que avaliem o efeito da dose e do tempo sobre a resposta dos linfócitos em um mesmo protocolo experimental. Neste sentido, um dos objetivos deste trabalho foi investigar se a capacidade proliferativa de linfócitos de órgãos linfoides (linfonodos mesentéricos e timo) poderia ser alterada dependendo da dose de OFT utilizada e do tempo de suplementação, considerando que a literatura sugere ser este um importante dado a ser pesquisado (BLANK et al, 1991). Os resultados aqui apresentados demonstram que sim, no entanto a influência da dose e do tempo não se dá de forma linear, ou seja, nem sempre a maior dose ou o maior tempo de suplementação levaram à maior proliferação. Foi possível observar que linfócitos de linfonodos mesentéricos apresentam resposta proliferativa diferente da resposta dos linfócitos do timo, e que linfócitos T (estimulados com ConA) e B (estimulados com LPS) também respondem de forma diferente à dose e ao tempo de suplementação. Ao investigar a incorporação de AKG nos tecidos linfoides estudados, foi possível observar em um primeiro momento que a incorporação de AKG nos tecidos linfoides não se dá de forma dose e tempo dependente, e que o aumento da proliferação linfocitária não está relacionado diretamente à incorporação de AKG nesses tecidos. As diferentes doses de OFT e os diferentes tempos de suplementação não interferiram no hematócrito e na concentração de hemoglobina dos indivíduos, nem mesmo em sua massa corpórea, massa do fígado e do tecido adiposo mesentérico.

Os linfócitos T e B são os componentes primários da resposta imunológica adaptativa, sendo a determinação da resposta proliferativa de linfócitos sob estimulação com vários mitógenos *ex vivo* um ensaio já bem estabelecido para determinar esta capacidade funcional. Na investigação da proliferação dos linfócitos de timo e linfonodos mesentéricos demonstramos que a proliferação sofreu alterações variadas conforme doses e tempos de suplementação, sob os estímulos de ConA e LPS.

A proliferação linfocitária de linfonodos mesentéricos estimulada com ConA (FIGURA 6) mostra elevação significativa de grupos suplementados (1, 2 e 4 g/kg) em relação ao grupo NS após 1 e 6 semanas de suplementação, sendo que após 2 semanas não houve diferença alguma entre os grupos, e após 7 semanas as diferenças foram muito sutis. Fica evidente, especialmente após 1 e 6 semanas, que a dose de 5g/kg de OFT atua reduzindo a proliferação celular. Estes dados revelam que o aumento da disponibilidade de OFT e seus componentes, especialmente AKG, não determina necessariamente o aumento da atividade celular, o mesmo valendo para o tempo de suplementação. Quando são comparados os resultados obtidos da estimulação com ConA (mitógeno de linfócitos T, FIGURA 6) e da estimulação com LPS (mitógeno de linfócitos B, FIGURA 7), observa-se que há diferenças e semelhanças nas respostas celulares de linfócitos T e B submetidos às mesmas condições (doses e tempos de suplementação). Após 1 semana de suplementação, os linfócitos estimulados com ConA dos grupos 1, 2 e 4g/kg apresentaram elevação da proliferação em relação ao grupo não suplementado (NS), e redução no grupo 5g/kg (FIGURA 6). Ao contrário, quando estimulados com LPS, os linfócitos dos grupos 2 e 4g/kg apresentaram tendência à redução da proliferação em relação ao grupo NS (FIGURA 7). Em ambos os casos, entretanto, após 1 semana de suplementação, o grupo que recebeu a maior dose de OFT, grupo 5g/kg, apresentou proliferação inferior. Após 2 semanas (FIGURAS 6 e 7), não houve respostas diferentes dos linfócitos estimulados com ConA, enquanto os estimulados com LPS do grupo 5g/kg apresentaram tendência à elevação da proliferação. Após 6 semanas (FIGURAS 6 e 7), nota-se que, tanto linfócitos estimulados com ConA quanto com LPS apresentaram elevação ou tendência à elevação na proliferação linfocitária do grupo 2g/kg, e o grupo 5g/kg foi o que mostrou menor proliferação linfocitária sob os dois estímulos. Após 7 semanas (FIGURAS 6 e 7), linfócitos do grupo 4g/kg apresentaram redução ou tendência à redução da proliferação. Estes resultados sugerem que linfócitos T e B respondem de forma diferente à suplementação com OFT, especialmente em períodos curtos de suplementação (1 e 2 semanas).

Há na literatura relatos de diferentes influências promovidas pelo mesmo composto sobre linfócitos T e B. Um exemplo é o trabalho de Camps-Bossacoma et al. (2017) que observaram que a suplementação de animais com cacau, promoveu estímulo da proliferação de linfócitos T, e redução da produção de

anticorpos por linfócitos B. Outro exemplo é o trabalho de Cerqueira et al (2004) que demonstrou diferença de resposta a mitógeno de linfócitos T e B tratados com diterpenos de *Plectranthus grandidentatus*, *in vitro*.

A proliferação de linfócitos do timo, estimulada com ConA (FIGURA 8) mostra uma tendência de elevação do grupo suplementado com 5 g/kg em relação ao grupo NS após 1 semana de suplementação. Após 2 semanas foram observados os maiores valores de proliferação dos linfócitos após 24h de cultivo. Depois de 7 semanas houve um decréscimo significativo da proliferação de linfócitos de animais suplementados (grupos 1, 2, 4 e 5g/kg), após 24 e 72h de cultivo celular. Demonstra-se novamente que o aumento da disponibilidade de OFT e seus componentes, especialmente AKG, não determina necessariamente o aumento da atividade celular, sendo menos significativo ainda o tempo de suplementação. Comparando-se os resultados obtidos da estimulação com ConA (mitógeno de linfócitos T, FIGURA 8) e da estimulação com LPS (mitógeno de linfócitos B, FIGURA 9), observa-se que após 1 semana de suplementação, apenas os linfócitos estimulados com ConA do grupo 4g/kg apresentam redução da proliferação em relação ao grupo 5g/kg após 24 e 72h de cultivo (FIGURA 8). Ao contrário, quando estimulados com LPS, os linfócitos dos grupos 1, 2 e 5g/kg apresentaram tendência ao aumento da proliferação em relação ao grupo NS (FIGURA 9). Após 2 semanas (FIGURAS 8 e 9), linfócitos estimulados com ConA e com LPS apresentaram os maiores valores de proliferação (% de redução de Alamar Blue próxima de 150 para vários grupos experimentais). Após 6 e 7 semanas (FIGURAS 8 e 9), é possível observar que a proliferação estimulada com ConA e com LPS segue um perfil de resposta bastante semelhante, sendo que após 7 semanas é observada redução da proliferação nos grupos suplementados. Os resultados obtidos a partir de linfócitos do timo sugerem que períodos curtos de suplementação (1 e 2 semanas) promovem respostas diferentes para linfócitos T e B, da mesma forma que foi observado para linfócitos dos linfonodos mesentéricos.

Analisando os dados obtidos a partir de tecidos linfóides primário (timo) e secundário (linfonodos), observamos que há diferença no padrão de resposta. Os linfócitos de linfonodos de grupos suplementados, de forma geral, apresentaram resposta mais precoce sob estímulo de mitógeno (após 24h de cultivo) depois de 6 semanas de suplementação (FIGURAS 6 e 7). Já os linfócitos de timo de grupos

suplementados responderam mais precocemente ao estímulo após 2 semanas de suplementação.

A dinâmica das populações celulares em vários órgãos linfóides reflete os perfis diferentes da resposta imune adaptativa que conduz às flutuações no número e subpopulações dos linfócitos em tecidos distintos do sistema imunológico (MORROT et al, 2012).

O timo e os linfonodos mesentéricos apresentam diferente organização celular. Os linfonodos são órgãos altamente complexos com vários elementos estromais formando uma estrutura que acomoda várias células mieloides e linfóides. As quimiocinas, as citocinas e as moléculas de adesão presentes no estroma dos linfonodos criam microambientes que ancoram diferentes populações de leucócitos. Nos linfonodos, macrófagos e linfócitos ficam estrategicamente organizados, e esta microarquitetura impede que patógenos ali retidos se espalhem pelo corpo, bem como permite que antígenos detectados nos tecidos sejam eficientemente apresentados para linfócitos T naive ou haja rápida reativação de células de memória. Uma característica marcante dos linfócitos dos linfonodos é sua capacidade de ora estarem presentes neste órgão linfoide, ora na circulação (GASTEIGER et al, 2016).

O timo é um órgão com microambiente particular que induz à diferenciação e garante a sobrevivência de linfócitos T antígeno-específicos, bem como libera estas células para a periferia (MIGNINI et al, 2014). Cabe ressaltar que linfócitos B no timo correspondem a uma população particular, uma vez que este órgão linfoide primário é responsável pelo desenvolvimento e seleção de linfócitos T. Os linfócitos B presentes no timo residem na junção córtico-medular, são fenotipicamente diferentes dos linfócitos B presentes na periferia. Há evidências de que os linfócitos B tímicos participem da seleção negativa de linfócitos T neste órgão (PERERA & HUANG, 2015).

No presente trabalho, para a obtenção dos linfócitos T e B, timo e linfonodos mesentéricos foram macerados e esta organização particular de cada um dos órgãos linfóides foi perdida. Portanto, o comportamento proliferativo dos linfócitos T e B sob estímulo de mitógeno *ex vivo* não sofreu influência desta organização celular. No entanto, os AKG presentes no OFT foram disponibilizados para as células enquanto ainda estavam organizadas no microambiente linfoide, e não temos como saber, pelo menos por ora, se a capacidade de incorporação de AKG

por células estromais, linfoides e mieloides presentes em timo e em linfonodo é a mesma. Este fato poderia explicar em parte porque linfócitos de timo e linfonodos apresentaram diferenças na capacidade proliferativa quando submetidos a uma mesma dose e tempo de suplementação.

Por outro lado, tem que ser considerado o fato de que linfócitos de diferentes órgãos linfoides apresentam estado de diferenciação particular, e portanto, maquinaria proteica intracelular diferente, para responder a uma mesma carga de AKG incorporados nas suas membranas. No timo encontramos células progenitoras capazes de responder mais à ativação da maturação para diferenciação em linfócitos T, enquanto a capacidade proliferativa está reduzida para células do tipo B (PERERA & HUANG, 2015).

Cerqueira et al (2004) demonstrou que o sinal proliferativo em linfócitos é gerado por membros de uma família de proteínas tirosina quinases que catalisam a fosforilação de substratos celulares, e estes por sua vez, levam à proliferação de células T, sendo que a fosforilação da tirosina também incorre na ativação de linfócitos B mas em menor intensidade. A expressão de interleucinas, que é um componente essencial na ativação e manutenção da proliferação de células T, com a adição de estimulantes (ConA) promove respostas variadas em timo e linfonodos mesentéricos provavelmente pela expressão destas proteínas, que no timo e linfonodos, associado aos receptores de membrana, é maior nos linfócitos do tipo T.

GASTEIGER et al (2016) em seu estudo cita que a capacidade aumentada de proliferação de células T em linfonodos mesentéricos está diretamente ligada à sua capacidade de perceber a presença de antígenos em constante circulação no sistema linfático e sanguíneo. Isso difere da forma como ocorre a maturação e proliferação linfocitária no timo, onde os linfócitos T mantêm sua ativação pela ação de timosina (PERERA & HUANG, 2015) além de interleucinas. Nos linfonodos, os linfócitos T migram para o córtex para estimular linfócitos B que são responsáveis por diferenciar-se em células plasmáticas para a produção efetiva de anticorpos, estimulada pela exposição ao antígeno.

Estas informações obtidas da literatura demonstraram que, de fato, as respostas de linfócitos T e B, bem como as respostas de linfócitos de linfonodos mesentéricos e de timo podem ser diferentes, o que justifica as diferentes respostas

obtidas no presente estudo sob influência da suplementação com OFT em diferentes doses e tempos de duração.

A hipótese inicial deste trabalho era encontrar capacidade proliferativa crescente dos linfócitos à medida que fossem aumentados dose e tempo de suplementação. Esta hipótese fundamentou-se na informação prévia de outros estudos de que AKG se incorporam na membrana das células e assim servem como substratos para geração de sinais intracelulares capazes de comandar o metabolismo, incluindo a proliferação. Não foi o observado, em parte porque, como mencionado acima, diferentes populações linfocitárias apresentam estados diferenciados específicos que levam a respostas específicas, mesmo que submetidas à maior disponibilidade de AKG.

Além disso, os resultados iniciais aqui demonstrados obtidos por cromatografia gasosa dos extratos lipídicos de timo e linfonodos mesentéricos revelam que não há efeito claro dose-dependente ou tempo-dependente sobre a incorporação de AKG. As TABELAS 1 e 2, quando comparadas, demonstram que nos linfonodos, 7 semanas de suplementação promoveram maior incorporação de AKG pelos linfócitos nas doses 2 e 5 g/kg, enquanto no timo as mesmas doses administradas por 7 semanas não promoveram o mesmo grau de incorporação, sugerindo que a incorporação de AKG não se dá da mesma forma em órgãos linfoides diferentes.

Nos linfonodos mesentéricos a suplementação por 7 semanas demonstra maior incorporação de AKG nas doses de 2 e 5g/kg, e reduz significativamente com 6 semanas nestas mesmas doses. Com 1 e 2 semanas de suplementação os valores incorporados no tecido são menores ainda. Estes dados preliminares parecem indicar que há maior tendência à incorporação com o aumento do tempo de suplementação. As doses de 2 e 5g/kg após 7 semanas promoveram o maior valor de incorporação nos linfonodos, mas esses resultados comparados aos resultados de proliferação (FIGURAS 7 e 8) indicam que essa maior incorporação não resultou em maior capacidade proliferativa. Inversamente no timo, os maiores valores de incorporação de AKG foram encontrados na dose de 5g/kg, após 1, 4 e 6 semanas de suplementação. Assim como observado para os linfócitos de linfonodos, a maior incorporação de AKG não promoveu aumento da capacidade proliferativa de linfócitos de timo do grupo 5g/kg após 6 semanas de suplementação (observar FIGURAS 9 e 10). No entanto, após 1 semana de suplementação, o

grupo 5 g/kg apresentou tendência ao aumento da proliferação (FIGURA 9 e 10) e efetivo aumento da proliferação linfocitária (FIGURA 10, 72 h).

Tomados juntos esses dados sugerem que a incorporação de AKG em linfócitos de linfonodos mesentéricos sofre maior influência do tempo de suplementação, enquanto que a incorporação em linfócitos do timo sofre maior influência da dose administrada. Ainda, em linfócitos do timo a maior incorporação de AKG está relacionada com a maior tendência a aumento de proliferação linfocitária, enquanto em linfócitos de linfonodos mesentéricos não foi possível observar esta relação. São necessários mais dados de GC-MS para a confirmação destes dados, e as pesquisas deste trabalho continuarão.

Observa-se a diversidade de comportamento das várias populações linfocitárias, sugerindo que a incorporação de lipídios na formação das membranas e a sua biodisponibilidade é diferente em órgãos linfoides primários e secundários. Há poucos dados na literatura que demonstram incorporação de AKG em tecidos, e particularmente em relação aos tecidos linfoides não temos conhecimento de trabalho a respeito. Weber (1985) demonstrou por espectrometria gasosa que intestino e fígado possuem maior incorporação de rac-1-0-[1¹-¹⁴C] dodecylglycerol após suplementação com este AKG comparados a outros tecidos corporais. DAS et al (1988) demonstrou que após a suplementação com AKG (heptadecilglicerol) vários tecidos incorporam, em distintas populações celulares (rim, cérebro, coração, fígado, pulmão, testículos) éteres lipídicos em suas membranas em quantidades variáveis, sendo estas variações dependentes da existência de uma situação patológica ou não.

Sobre a avaliação hematológica, hematócrito e hemoglobina costumam apresentar incremento nos valores basais em situações patológicas, mas em homeostasia os valores apresentam-se dentro da faixa de referência (ANADON et al, 2010). O interesse em avaliar hematócrito e hemoglobina após suplementação com OFT foi porque estudos anteriores relataram que a suplementação com heptadecilglicerol (2% adicionados à ração de camundongos; DAS et al, 1988) e com OFT (32 mg/dia em porcas gestantes e lactantes, MITRE et al, 2005) possuía propriedades estimulantes hematopoiéticas. No presente trabalho, os valores encontrados mantiveram-se dentro da faixa de referência para ratos Wistar (HAYAKAWA, 2001), mesmo após alta dose (5 g/Kg) e elevado tempo de

suplementação (7 semanas). Há que se considerar que nos dois estudos citados (DAS et al, 1988 e MITRE et al, 2005) outras metodologias foram adotadas.

Em relação à massa corporal, não houve diferença estatística entre grupos, e mesmo suplementação crônica de OFT em altas doses não foi capaz de promover aumento de peso, corroborando o trabalho de ANADON et al (2010), e indicando que mesmo suplementação em altas doses não afeta a massa corpórea. Este resultado também reflete o que foi observado para a massa do fígado, do tecido adiposo e do músculo sóleo, que não sofreram alteração com a suplementação.

6 CONCLUSÃO

A suplementação com AKG interfere na proliferação linfocitária, porém de maneira diferente em linfócitos T e B, e em cada tecido linfóide avaliado (timo e linfonodos mesentéricos), sem promover elevação proporcional da proliferação com o aumento da dose e do tempo de suplementação.

Os dados preliminares obtidos por GC-MS mostram que a incorporação de AKG em timo parece depender mais da dose do que do tempo de suplementação, e que a incorporação em linfonodos mesentéricos sofre maior influência do tempo de suplementação.

A oferta de AKG em todas as doses e tempos de suplementação não induziu ganho de massa corpórea, apesar da oferta de calorias na forma de lipídios ser elevada, nem foi capaz de causar alterações de massa nos tecidos avaliados (fígado, tecido adiposo mesentérico, musculo sóleo), e alterações no hematócrito e na dosagem de hemoglobina.

REFERÊNCIAS

ABBAS AK, LICHTMAN AH, PILLAI S. Cellular and Molecular Immunology, 6^a ed, California: Editora Saunders, 2007.

ACEVEDO, R.; GIL, D.; DEL CAMPO, J.; BRACHO, G.; VALDES, Y.; PEREZ, O. The adjuvant potential of synthetic alkylglycerols. *Vaccine*, Havana, 24S2, S2/32–S2/33, 2006.

ANADÓN, A.; MARTINEZ, M.A.; ARES, I.; RAMOS, E.; SEÑORÁNS, F.J.; REGLERO, G.; TORRES, C. Acute and repeated dose (28 days) oral safety studies of an alkoxyglycerol extract from shark liver oil in rats. *J. Afric. Food Chem.*, v. 58, p. 2040-2046, 2010.

BELO, S. R. B. Estudo da suplementação com óleo de peixe associado ao de fígado de tubarão sobre o crescimento tumoral e resposta de macrófagos peritoneais em ratos portadores de tumor de Walker 256. Dissertação (Mestrado em Fisiologia). Universidade Federal do Paraná, 2007.

BERDEL, W.E.; BAUSERT, W.R.; WELTZIEN, H.U.; MODOTELL, M.L.; WIDMANN, K.H.; MUNDER, P.G. The influence of alkyl-lysophospholipids and lysophospholipid activated macrophages on the development of metastasis of 3-Lewis lung carcinoma. *Eur. J. Cancer*, Alemanha, v. 16, 1199–1204, 1980.

BERGSTROM, S.; BLOMSTRAND, R. The intestinal absorption and metabolism of chymyl alcohol in the rat. *Acta Physiol. Scand.*, Suécia, v. 38, p. 166-172, 1956.

BERRIDGE, M.J. Lymphocyte activation in health and disease. *Critical Reviews in Immunology*, Cambridge, v. 17, p. 155-178, 1997.

BLANK, M. L.; CRESS, E. A.; SMITH, Z. L.; SNYDER, F. Dietary Supplementation with Ether-Linked Lipids and Tissue Lipid Composition. *LIPIDS*, Tennessee, Vol. 26, Nº 02, 1991.

BROHULT, A. Alkoxyglycerol-esters in irradiation treatment. *Nature*, Suécia, v. 193, n. 4822, 1962.

BROHULT, A.; BROHULT, J.; BROHULT, S. Biochemical effects of alkoxyglycerols and their use in cancer therapy. *Acta Chemica Scandinavica*, Suécia, v. 24, p. 730-732, 1970.

BROHULT, A.; BROHULT, J.; BROHULT, S. JOELSSON, I. Effect of alkoxyglycerols on the frequency of injuries following radiation therapy for carcinoma of the uterine cervix. *Acta Obstet Gynecol Scand*, Suécia, v. 56, p. 441-448, 1977.

BROHULT, A.; BROHULT, J.; BROHULT, S. Regression of tumour growth after administration of alkoxyglycerols. *Acta Obstet Gynecol Scand*, Suécia, v.57, p. 79-83, 1978.

BROHULT, A.; BROHULT, J.; BROHULT, S. JOELSSON, I. Alkoxyglycerols in cell membranes stop tumor growth?, 3rd International Conference on Surface and Colloid Science, Stockholm, August, 1979.

BROHULT, A.; BROHULT, J.; BROHULT, S. JOELSSON, I. Reduced mortality in cancer patients after administration of alkoxyglycerols. *Acta Obstet Gynecol Scand*, Suécia, v. 65, p. 779-785, 1986.

CALDER, P.C. N-3 fatty acids, inflammation and immunity: pouring oil on troubled waters or another fishy tale. *Nutrition Research*, Reino Unido, v. 21, p. 309-341, 2001.

CALDER, P.C. Immunomodulation by omega-3 fatty acids. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, Reino Unido, v. 77, p. 327-335, 2007a.

CALDER, P.C. Immunological Parameters: What Do They Mean? *J. Nutr*, Reino Unido, v. 137: 773S–780S, 2007.

CAMPS-BOSSACOMA, M.; MASSOT-CLADERA, M.; ABRIL-GIL, M.; FRANCH, A.; PÉREZ-CANO, F.J.; CASTELL, M. Cocoa diet and antibody immune response in preclinical studies. *Frontiers in Nutrition*, Barcelona, v. 4, article 28, 2017.

CERQUEIRA, F.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; GASPARG-MARQUES, C.; SIMÕES, F.; PINTO, M.M.M.; NASCIMENTO, M. S. J. Effect of abietane diterpenes from *Plectranthus grandidentatus* on T- and B-lymphocyte proliferation. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, Portugal, v. 12, p. 217–223, 2004.

DAS, A.K.; HAJRA, A.K. High incorporation of dietary 1-O-heptadecyl glycerol into tissue plasmalogens of young rats. *FEBS Letters*, USA, v. 227, n. 2, p. 187-190, 1988.

DAS, A.K.; HOLMES, R.D.; WILSON, G.N.; HAJRA, A.K. Dietary ether lipid incorporation into tissue plasmalogens of humans and rodents. *Lipids*, USA, v. 27, p. 401-405, 1992.

DENIAU, A.L.; MOSSET, P.; PÉDRONO, F.; MITRE, R.; LE BOT, D.; LEGRAND, A.B. Multiple beneficial health effects of natural alkyglycerols from shark liver oil. *Mar. Drugs*, França, v.8, p. 2175-2184, 2010.

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*, USA, v. 226, p. 497-509, 1957.

GIRARD JP, MOUSSION C, FÖRSTER R. HEVs, lymphatics and homeostatic immune cell trafficking in lymph nodes. *Nature Reviews Immunology*, França, Nov; 12(11):762-73, 2012.

HAGE, DAVID S. Química analítica e análise quantitativa. 1ªed. São Paulo. Pearson Prentice Hall, cap. 21, p. 510 -524, 2012.

HAYAKAWA, T., IWAKI, T. A color atlas of sectional anatomy of the rat. 1^aed., p. 166 - International Edition - Japão, 2001.

HALLGREN, B.; STALLBERG, G.; BOERYD, B. Occurrence synthesis and biological effects of substituted glycerol ethers. *Prog Chem Fats Other Lipids*, Suécia, v. 16, p. 45-58, 1978.

HEYMANS, F.; DA SILVA, C.; MARREC, N.; GODFROID, J. J.; CASTAGNA, M. Alkyl analogs of diacylglycerol as activators of protein kinase. *Febs Letters*, França, v. 218, p.35-40, 1987.

HOMMA, S.; YAMAMOTO, N. Activation process of macrophages after in vitro treatment of mouse lymphocytes with dodecylglycerol. *Clin Exp Immunol*, USA, v. 79, p. 307-313, 1990.

HAJIMORADI, M.; HASSAN, Z.M.; POURFATHOLLAH, A.A; DANESHMANDI, S.; PAKRAVAN, N. The effect of shark liver oil on the tumor infiltrating lymphocytes and cytokine pattern in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, Irã, 126, 565-570, 2009.

IAGHER, F. Efeito da suplementação conjunta crônica com óleo de fígado de Tubarão e óleo de peixe sobre crescimento tumoral, caquexia e atividade linfocitária de ratos wistar portadores de tumor de Walker 256. Tese (Doutorado em Fisiologia), Universidade Federal do Parná, 2008.

IAGHER, F.; BELO, S. R. B.; NALIWAIKO, K.; FRANZÓI, A. M.; BRITO, G. A. P.; YAMAZAKI, R. K.; MURITIBA, A. L.; MUEHLMANN, L. A.; STEFFANI, J. A.; FERNANDES, L. C. Chronic Supplementation With Shark Liver Oil for Reducing Tumor Growth and Cachexia in Walker 256 Tumor-Bearing Rats. *Nutrition and Cancer*, Brasil, v 63, n 8, p. 1307-1315, 2011.

IAGHER, F., BELO, S. R. B., SOUZA W. M., NUNES J. R., NALIWAIKO K., SASSAKI G. L., BONATTO S. J. R., OLIVEIRA H. H. P., BRITO G. A. P., LIMA C., KRYCZYK M., SOUZA C. F., STEFFANI J. A., NUNES E. A., Fernandes L. C. Antitumor and anti-cachectic effects of shark liver oil and fish oil: comparison between independent or associative chronic supplementation in Walker 256 tumor-bearing rats. *Lipids Health Dis*, Brasil, 12: 146. Published online 2013 October 16. doi: 10.1186/1476-511X-12-146, 2013.

IANNITI, T.; PALMIERI, B. An update on the therapeutic role of alkylglycerols. *Mar. Drugs*, v. 8, p. 2267-2300, 2010.

KANTAH, M.K.; WAKASUGI, H.; KUMARI, A.; CARRERA-BASTOS, P.; PALMIERI, B.; NAITO, Y.; CATANZARO, R.; KOBAYASHI, R.; MAROTTA, F. Intestinal immune-potentiation by a purified alkylglycerols compound. *Acta Biomed*, v. 83, 2012.

KRAUSS, Ronald M. Dietary guidelines for healthy American adults – a statement for health professionals from the Nutrition Committee, American Heart Association. American Heart Association, Inc., USA, p. 1795-1800, 1996.

KROTKIEWSKI, M.; PRZYBYSZEWSKA, M. JANIK, P. Cytostatic and cytotoxic effects of alkylglycerols (Ecomer). *Med Sci Monit, Polônia*, v. 9, n. 11, p. 131-135, 2003.

LEWKOWICZ P, BANASIK M, GLOWACKA E, LEWKOWICZ N, TCHORZEWSKI H. Effect of high doses of shark liver oil supplementation on T cell polarization and peripheral blood polymorphonuclear cell function. *Pol. Merk. Lek.*, 18:686–692, 2005.

MADHAVI,N.;DAS,U.N.;PRABHA,P.S.;KUMAR,G.S.;KORATKAR,R.;SAGAR,P.S. Suppression of human T-cell growth in vitro by cis-unsaturated fatty acids: relationship to free radicals and lipid peroxidation. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. Jul, 51(1):33-40, 1994.

MAGNUSSON, C.D.; HARALDSSON, G.G. Ether lipids. *Chemistry and physics of lipids*, v. 164, p. 315-340, 2011.

MARBERG, C.M.; WILES, H.O. Granulocytopoietic fraction of yellow bone marrow. *Archives of Internal Medicine*, v. 61, p. 408, 1938.

MARIGNY, K.; PEDRONO, F.; MARTIN-CHOULY, C.A.E.; YOUMINE, H.; SAIAG, B.; LEGRAND, A.B. Modulation of endothelial permeability by 1-O-alkylglycerols. *Acta Physiologica Scandinavica*, v. 176, n. 4, p. 263, 2002.

MIGNINI, F.; SABBATINI, M.; MATTIOLI, L.; COSENZA, M.; ARTICO, M.; CAVALLOTTI, C. Neuro-immune modulation of the thymus microenvironment (Review). *international journal of molecular medicine* 33: 1392-1400, 2014.

MITRE, R.; ETIENNE, M.; MARTINAIS, S.; SALMOS, H.; ALLAUME, P.; LEGRAND, P.; LEGRAND, A.B. Humoral defence improvement and haematopoiesis stimulation insows and offspring by oral supply of shark liver oil to mothers during gestation and lactation. *British Journal of Nutrition*, v. 94, p. 753-762, 2005.

MORROT, A.; ALBUQUERQUE, J. B.; BERBERT, L. R.; PINTO, C.E.C.; MEIS, J.; SAVINO, W.S. Dynamics of Lymphocyte Populations during *Trypanosoma cruzi* Infection: From Thymocyte Depletion to Differential Cell Expansion/Contraction in Peripheral Lymphoid Organs. *Journal of Tropical Medicine*, vol. 2012, Article ID 747185, doi:10.1155/2012/747185, 2012.

NAVARRO-GARCIA, G.; PACHECO-AGUILAR, R.; VALLEJO-CORDOVA, B.; RAMIREZ-SUAREZ J. C.; BOLANOS A. Lipid composition of the liver oil of shark species from the Caribbean and Gulf of California waters. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 13, n. 5, p. 791-798, 2000.

NGWENYA, B.Z.; FOSTER, D.M. Enhancement of antibody production by lysophosphatidylcholine and alkylglycerol. *Lipid Metabolites and Antibody Enhancement*, v. 196, p. 69-75, 1991.

OH, S.Y.; JADHAV, L.S. Effects of dietary alkylglycerols in lactating rats on immune responses in pups. *Pediatric Research*, v. 36, n. 3, p. 300-305, 1994.

PALMIERI, B.; PENNELLI, A.; DI CERBO, A. Jurassic surgery and immunity enhancement by alkylglycerols of shark liver oil. *Lipids in Health and Disease*, 13:78, 2014.

PERERA, J. HUANG, H. The development and function of thymic B cells. *Cell Mol Life Sci*, v. 72, n. 14, p. 2657-2663, 2016.

PICK E, MIZEL, D. J. Rapid microassays for the measurement of superoxide and hydrogen peroxide production by macrophages in culture using an automatic enzyme immunoassay reader. *J Immunol Methods* 46: 211-226, 1981.

PUGLIESE, P. T.; JORDAN, K.; CEDERBERG, H.; BROHULT, J. Some biological actions of alkylglycerols from shark liver oil. *Jornal Alternative Complement Medicine*, v.4, p.87-99, 1998.

QIAN, L.; ZHANG M.; WU S.; ZHONG Y. VAN TOL E.; CAI W; Alkylglycerols Modulate the Proliferation and Differentiation of Non-Specific Agonist and Specific Antigen-Stimulated Splenic Lymphocytes. *Plos One*, volume 9, Issue 4, e96207, 2014.

REICHWALD, I.; MANGOLD, H.K. Assessment of the specificity of enzymatic reactions using mixed substrates: incorporation of alkylglycerols in the ionic alkoxy lipids of the rat's intestinal mucosa. *Nutr. Metab.*, v. 21, n. 1, p. 198-201, 1977.

ROBINSON, M.; CHEN, T.; WARNE, T. R. IL-3-induced generation of alkylacylglycerol and diacylglycerol in an IL-3-dependent cell line. *The journal of immunology*, v. 147, n.8, p. 2624-2629, 1991.

SOUZA, L.M.; IACOMINI, M.; GORIN, P.A.J.; SARI, R.S.; HADDAD, M.A.; SASSAKI, G.L. Glyco- and sphingophosphonolipids from the medusa *Phyllorhiza punctata*: NMR and ESI-MS/MS fingerprints. *Chem and Phys of Lipids*, v. 145, n. 2, p. 85-96, 2007.

SASSAKI, G.L.; MACHADO, M.J.; TISCHER, C.A.; GORIN P.A.J.; IACOMINI. M. Glycosyldiacylglycerolipids from the Lichen *Dictyonema glabratum*, *J. Nat. Prod.*, v. 62, n. 6, p. 844-847, 1999.

SASSAKI, G.L.; SOUZA, L.M.; SERRATO, R.V.; CIPRIANI, T.R.; GORIN, P.A.J.; IACOMINI, M. Application of acetate derivatives for gas chromatography-mass spectrometry: Novel approaches on carbohydrates, lipids and amino acids analysis. *Journal of Chromatography*, v. 1208, p. 215-222, 2008.

VISSER, K.E.; EICHTEN, A.; COUSSENS, L. Paradoxical roles of the immune system during cancer development. *Nature Reviews Cancer*, 6:24-37, 2006.

VITORINO, D. C.; BUZZACHERA, DSSCC. F.; CURI, R.; FERNANDES, L. C. Effect of chronic supplementation with shark liver oil on immune responses of exercise-trained rats. *Eur J Appl Physiol* 108:1225-1232, 2010.

WEBER, N. Metabolism of orally administered *rac*-1-O[1'-¹⁴C]dodecylglycerol and nutritional effects of dietary *rac*-1-O-dodecylglycerol in mice. *Journal of Lipid Research*, v. 26, p. 1412-14-20, 1985.

YAMAMOTO, N.; CLAIRE, D.A., ST.; HOMMNA, S., JR.; NGWENYA, B.Z. Activation of Mouse Macrophages by Alkylglycerols, Inflammation Products of Cancerous Tissue. *Cancer Res.* 48, 6044–6049, 1988.