

VANESSA GOMES BATISTA

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO TIMO,  
BAÇO E LINFONODO MESENTÉRICO DE RATOS DIABÉTICOS E  
OS EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM FOSFATIDILCOLINA  
SOBRE A COMPOSIÇÃO LIPÍDICA DAS MEMBRANAS E  
FUNCIONALIDADE DE CÉLULAS B e T.**

CURITIBA  
Mai/2006

VANESSA GOMES BATISTA

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO TIMO,  
BAÇO E LINFONODO MESENTÉRICO DE RATOS DIABÉTICOS E  
OS EFEITOS DA SUPLEMENTAÇÃO COM FOSFATIDILCOLINA  
SOBRE A COMPOSIÇÃO LIPÍDICA DAS MEMBRANAS E  
FUNCIONALIDADE DE CÉLULAS B e T.**

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

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

CURITIBA  
Mai/2006

## Agradecimentos

Todas as palavras que eu poderia escrever aqui não demonstram a plenitude da minha gratidão a muitas pessoas. Primeiramente: meus pais... por me garantirem uma base sólida a partir da onde eu consigo dar meus saltos em direção a um futuro melhor; por me apoiarem em qualquer que fosse a minha escolha, pelo incentivo, pelos puxões de orelha quando eu realmente saia dos trilhos e por passarem a mão na minha cabeça quando tudo parecia “perdido”. Para mim é um orgulho ver que consegui deixá-los orgulhosos de mim... À professora Anita, que confiou naquela menina assustada e “corada” que chegou à sua sala pedindo uma oportunidade de estágio. Depois que ela entrou na minha vida esta tomou uma nova direção. Durante esses quatro anos de trabalho juntas ela foi não só uma orientadora, mas em muitas vezes uma amiga... Não menos importante a todos os amigos do laboratório... Dalva, Loli, Gleisson, Lu, Everson, Sandrinho, Diogo, Serginho, Fabi, Fer, Carine, Cris... Todos, cada um com sua maneira peculiar, fizeram do trabalho no laboratório uma rotina deliciosa, me construíram uma segunda casa. Espero ter deixado em cada um, um pouquinho do imenso carinho que tenho por eles... Não poderia deixar de agradecer pessoas como Hilton Takahashi da Universidade de São Paulo, que me ajudou nas análises de HPLC e aos funcionários do biotério da UFPR.

E principalmente a Deus... por permitir que essas pessoas e muitas outras que não foram citadas, fizessem parte da minha vida!

Muito obrigada!

## Lista de abreviaturas

AA	-	Ácido araquidônico
AGE	-	<i>Advanced glycation end-products</i>
BrMMC	-	Bromometil-metoxi-cumarina
ConA	-	Concanavalina A
COX	-	Ciclooxigenase
DAG	-	Diacilglicerol
DHA	-	Ácido docosa-hexaenóico
DMSO	-	Dimetilsulfóxido
EPA	-	Ácido eicosapentaenóico
EPM	-	Erro padrão da média
ESTEÁ	-	Ácido esteárico
FACS	-	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FSC	-	<i>Foward scatter</i>
GRUPO C	-	Grupo controle
GRUPO S	-	Grupo suplementado
GRUPO D	-	Grupo diabético
GRUPO DS	-	Grupo diabético suplementado
HDL	-	Colesterol HDL- <i>high density protein</i>
HPLC	-	<i>High Performance Liquid Cromatography</i>
IDL	-	Colesterol IDL – <i>intermediated density protein</i>
IL-2	-	Interleucina -2
IL-4	-	Interleucina -4
IL-10	-	Interleucina -10
IL2R	-	Receptor para interleucina-2
INF- $\gamma$	-	Interferon- $\gamma$
IP <sub>3</sub>	-	Inositol trifosfato
IRS	-	<i>Insulin receptor substrate</i>
JNK	-	Jun N-terminal kinase
LAU	-	Ácido láurico
LDL	-	Colesterol LDL- <i>low density protein</i>
LINO	-	Ácido linoléico
LPS	-	Lipopolissacarídeo
LTh1	-	Linfócito T <i>helper</i> 1
LTh2	-	Linfócito T <i>helper</i> 2
MAPK	-	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MHC	-	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MIR	-	Ácido mirístico
MTT	-	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
NF-AT	-	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
OLE	-	Ácido oléico
PAF	-	Fator de agregação plaquetária
PALM	-	Ácido palmítico
PALMITOL	-	Ácido palmitoléico
PBS	-	<i>Phosphate buffer saline</i>

PC	-	Fosfatidilcolina
PG	-	Prostaglandina
PKC	-	Proteína quinase C
PLC	-	Fosfolipase C
PLD	-	Fosfolipase D
PPAR	-	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PUFA	-	<i>Polyunsaturated fatty acids</i>
RAGE	-	Receptor para <i>advanced glycation end-products</i>
SSC	-	<i>Side scatter</i>
Th1	-	Célula T <i>helper</i> 1
Th2	-	Célula T <i>helper</i> 2
VLDL	-	Colesterol VLDL – <i>very low density lipoprotein</i> .

## Resumo

Indivíduos diabéticos geralmente apresentam um quadro de dislipidemia associado a um comprometimento de seu sistema imunitário, o que prejudica sua qualidade de vida. Uma ferramenta empregada para controlar a lipemia sanguínea é a suplementação com lecitina de soja, a qual é capaz de reduzir a concentração de colesterol LDL e aumentar a concentração de colesterol HDL. Por outro lado, o efeito dessa suplementação sobre as células do sistema imunitário desses indivíduos ainda não foi elucidado. Por isso, este trabalho avaliou os efeitos da suplementação com lecitina de soja sobre a funcionalidade de células T e B provenientes do timo, baço e linfonodo mesentérico. Os parâmetros avaliados foram: capacidade proliferativa dos linfócitos por citometria de fluxo, metabolismo energético através da redução do MTT, produção de interleucinas IL-2, INF- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 e composição de ácidos graxos das membranas por. Outros parâmetros analisados foram ganho de peso e determinações séricas de glicose, colesterol e triacilglicerol. Para tal, ratos Wistar foram separados em quatro grupos: controle, suplementado, diabético e diabético suplementado. A indução de diabetes foi feita com estreptozotocina (60mg/Kg) e os animais dos grupos suplementados receberam diariamente, por via oral, 2g/Kg de lecitina de soja por 21 dias. Após esse período os animais foram guilhotinados. O sangue foi recolhido para as determinações bioquímicas e os órgãos linfóides removidos. Os linfócitos de cada grupo e de cada órgão linfóide foram estimulados por ConA ou LPS e após 66 horas de cultivo foram realizados os ensaios do MTT e determinação de proliferação celular. A partir dessas mesmas culturas foram dosadas as concentrações de interleucinas. Os resultados demonstram um efeito principalmente inibitório sobre a proliferação de linfócitos T e B de animais diabéticos que receberam lecitina de soja. A suplementação foi capaz ainda de modular a produção de IL-2 pelos animais diabéticos, porém a proliferação celular não foi afetada por alterações na síntese dessa interleucina. Isso demonstra que outros mecanismos de ação podem estar envolvidos. A composição de ácidos graxos das membranas, nessa dose e tempo de tratamento, não foi alterada. Entretanto, é possível que tenham ocorrido alterações na composição de ácidos graxos de microdomínios de membrana, de onde partem os sinais de transdução. Isso porque se sabe que os lipídios da dieta são incorporados às membranas e alterações na funcionalidade ocorreram principalmente em células Th1 – dependente desses microdomínios, e não em Th2, cuja ativação não está ligada a tais estruturas. Nessas condições experimentais, o uso de lecitina de soja alterou a função de células T e B, indicando um caráter imunomodulatório da fosfatidilcolina.

## Abstract

Diabetic individuals often presents increased levels of triglycerides and LDL-cholesterol associated to an immune response impairment, two features related to a limited health quality. One tool that could be useful to those individuals is the dietary supplementation with soybean lecithin, which is known to reduce cholesterol levels. However the effects of dietary soybean lecithin upon immune system are still unknown. In this work it was evaluated the effects of dietary supplementation with soybean lecithin upon T and B cells from thymus, spleen and mesenteric lymph nodes. Wistar rats were separated into four groups: (C) control, (S) supplemented; (D) diabetic and (SD) supplemented diabetic group. Diabetes was induced by injecting 60mg/kg b.w of streptozotocin. Supplemented groups received 2g/kg b.w, daily, for 21 days. After this period, it was evaluated: lymphocyte proliferation, MTT reduction capacity, cytokine production (IL-2, INF- $\gamma$ , IL-4 and IL-10) and fatty acids composition of the cellular membranes. Others parameters were weight gain, plasma glucose, cholesterol and triglycerides levels. Lymphocytes were stimulated with ConA or LPS for 66 hours in culture. The results show that diabetic animals which received the dietary supplementation presented an impairment of B and T cell proliferation. IL-2 production was modulated but this alteration does not seem to be responsible for the impairment of lymphocyte proliferation, since IL-2 production was higher in SD groups. Other mechanism may be involved. The fatty acid composition of the cellular membranes did not present any alteration in these experimental conditions. Although it is known that dietary lipids are incorporated into cell membranes, Th1 cells but not Th2 cells had their activity modulated by the dietary supplementation with soybean lecithin. Fatty acids incorporation could have occurred into specific microdomains, since lipid rafts of the membranes are involved in Th1 cells but not in Th2 cells. We conclude that, in these experimental conditions, dietary supplementation with soybean lecithin altered T and B cells functions, indicating an immunomodulatory effect of phosphatidylcholine.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	iii
RESUMO.....	v
ABSTRACT.....	vi
1 INTRODUÇÃO .....	1
1.1 DIABETES MELLITUS.....	1
1.2 LECITINA DE SOJA .....	4
2 OBJETIVOS .....	10
3 MATERIAIS E MÉTODOS:.....	11
3.1 ANIMAIS:.....	11
3.3 INDUÇÃO DE DIABETES.....	11
3.2 SUPLEMENTAÇÃO:.....	12
3.4 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS .....	12
3.5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	12
3.5.1 Determinações séricas.....	12
3.5.2 Proliferação de linfócitos .....	13
3.5.3 Metabolismo de enzimas mitocondriais:.....	14
3.5.3 Produção de interleucinas:.....	14
3.5.4 Determinação da composição de ácidos graxos da membrana celular: 15	
4 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	17
5 RESULTADOS .....	18
5.1 COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DA RAÇÃO.....	18
5.2 COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DA LECITINA DE SOJA:.....	19
5.3 PESO DOS RATOS.....	20
5.4 METABOLISMO DAS DESIDROGENASES MITOCONDRIAIS:.....	21
5.4.1 Células T .....	21
5.4.2 Células B.....	24
5.5 PROLIFERAÇÃO CELULAR .....	27
5.5.1 Células T .....	27
5.5.2 Células B.....	30
5.6 PRODUÇÃO DE INTERLEUCINAS.....	36
5.6.1 IL- 2.....	37
5.6.2 INF- $\gamma$ .....	40
5.6.3 IL-4 .....	43
5.6.4 IL-10 .....	45
5.7 RAZÃO DE CITOCINAS PRODUZIDAS POR CÉLULAS TH1 E TH2.....	49
5.8 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA.....	50
5.9 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS.....	51
6 DISCUSSÃO .....	53
7 CONCLUSÃO.....	66
8 REFERENCIAS .....	67



## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 DIABETES MELLITUS

A *diabetes mellitus* é uma patologia crônica de distúrbios do metabolismo intermediário, resultante da ausência ou de uma ação ineficiente da insulina. Além da hiperglicemia e suas complicações, a hiperlipidemia que se desenvolve nos pacientes diabéticos acaba sendo a principal causa de morbidade e mortalidade, devidas principalmente ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares (HAFFNER, 1999; GARBER, 2000; STEINER, 2001). Segundo a Organização Mundial da Saúde, cerca de 3,2 milhões de mortes por ano são atribuídas às complicações da diabetes e o Brasil está entre os 10 países com maior número de casos (OMS, 2004). A aterosclerose é de duas a quatro vezes mais freqüente nos indivíduos diabéticos do que em pessoas não-diabéticas (NATHAN, MEIGS, SINGER, 1997; STEINER, 2001), sendo a sua principal causa de morte (GARBER; KARLSSON, 2001).

O quadro de dislipidemia se estabelece porque a insulina é necessária para a ativação e inativação de enzimas envolvidas no metabolismo de lipoproteínas. Sem esse hormônio, a lipase hormônio-sensível permanece ativada, liberando ácidos graxos do tecido adiposo para a circulação. O fígado responde aumentando a velocidade de síntese de lipoproteínas VLDL ricas em triacilgliceróis. Essas lipoproteínas permanecem por mais tempo na circulação porque a ação da enzima lipase lipoprotéica, que seria ativada pela insulina, fica diminuída (LEWIS; STEINER, 1996; BETTERIDGE, 2001). Como consequência, os indivíduos diabéticos apresentam concentrações aumentadas de triacilgliceróis e de todas as lipoproteínas que têm a função de distribuir os lipídios para os tecidos extra-hepáticos, como a VLDL, IDL e LDL (HIRANO *et al.*, 1991; STEWART, LAKER, ALBERTI, 1994; STEINER, 2001) e uma diminuição na concentração de HDL colesterol, lipoproteína responsável pela retirada de colesterol dos tecidos (BROWN, 1994; PARIS, SERRANO, GAMBOA, 1996; RASHID *et al.*, 2003).

Além do aumento da concentração de lipídios no sangue, ocorrem várias alterações na composição das lipoproteínas, tornando-as mais aterogênicas. Diabetes está freqüentemente associada a partículas menores e mais densas de LDL. Em adição, concentrações elevadas de glicose sanguínea levam a um aumento da glicação (reação não enzimática com glicose) de LDL e outras lipoproteínas (BIONDI-ZOCCAI *et al.*, 2003). O indivíduo diabético apresenta ainda um desbalanço na razão de moléculas oxidantes/anti-oxidantes, com um aumento da concentração de radicais livres (BIONDI-ZOCCAI *et al.*, 2003). A hiperglicemia crônica está associada à geração desse estresse oxidativo nas células (LIPINSKI, 2001). Essas alterações facilitam a oxidação de lipoproteínas (KUYVENHOVEN, MEINDERS, 1999; LIPINSKI, 2001). LDL-oxidada é quimiotática para células T e monócitos, induz a adesão de leucócitos à parede do endotélio e a formação de *foam cells* (células espumosas, ricas em partículas lipídicas). Isso leva ao desencadeamento da resposta imunológica na parede dos vasos, característica da aterosclerose (FEI *et al.*, 2003). Além das lipoproteínas, proteínas também podem sofrer glicosilação e gerar produtos avançados de glicosilação (AGE- *advanced glycated end-products*). Esses produtos podem ativar receptores específicos chamados de RAGE, presentes no endotélio, monócitos/macrófagos e linfócitos (SCHIMIDT *et al.*, 2001) e sua ativação está associada à indução de respostas pro-inflamatórias, que facilitariam a progressão da placa aterosclerótica (RAMASAMY *et al.*, 2005).

Ao quadro de complicações tardias da diabetes e o risco de doenças cardiovasculares alia-se a maior susceptibilidade dos indivíduos diabéticos às infecções. Vários estudos demonstram uma linfopenia (EASTMAN *et al.*, 1991; OTTON *et al.*, 2004), causada por diversos fatores. As alterações na expressão de certos genes, na ausência de insulina, levam a distúrbios na função celular e no controle do ciclo celular e apoptótico. Sabe-se que a insulina age como fator de crescimento em várias células dos mamíferos (SNOW, FELDBUSH, OAKS, 1980) e que o estado de hipoinsulinemia poderia levar a uma ativação da cascata de morte celular programada em linfócitos (OTTON *et al.*, 2004). A hiperglicemia por si só já é outro fator que contribui para a linfopenia (KANEL, MILLS, DIMSDALE,

2001). Foi demonstrado ainda, que o estresse oxidativo inibe a fosforilação de resíduos de tirosina em linfócitos (FLESCHER *et al.*, 1994) e é capaz de induzir apoptose (PAHLAVANI; HARRIS, 1998). Os radicais livres desencadeiam a peroxidação lipídica das membranas e isso afeta a expressão de moléculas de superfície (DE PABLO, CIENFUEGOS, 2000). Em patologias onde ocorre um desequilíbrio no balanço oxidativo das células, como na diabetes, a peroxidação lipídica ocorre em maior grau, podendo influenciar a resposta imunológica.

A taxa de apoptose aumentada nos linfócitos é uma das várias causas da imunossupressão encontrada em indivíduos diabéticos (OTTON *et al.*, 2004). Além da redução em número, a responsividade de linfócitos é diminuída nesses indivíduos (JUNG, KAMYIAMA, AGUI, 1999; OTTON *et al.*, 2002). A falta de insulina leva a uma capacidade proliferativa de linfócitos T e B reduzida (OTTON *et al.*, 2004). Observou-se também que a exposição de células T a espécies reativas de oxigênio resulta na supressão da proliferação induzida por mitógenos e a expressão de IL-2 (PAHLAVANI, HARRIS, 1998). A própria hiperglicemia também se soma ao quadro, reduzindo tanto a proliferação quanto a produção de algumas interleucinas (OTTON *et al.*, 2002). Assim, além dos linfócitos apresentarem uma maior taxa de morte celular, os que sobrevivem não respondem adequadamente a estímulos de proliferação, podendo levar a prejuízos na resposta imunitária.

No intuito de diminuir o risco de doenças cardiovasculares, tanto em indivíduos diabéticos quanto não-diabéticos, vários estudos vêm sendo realizados na busca por substâncias capazes de reduzir a concentração de colesterol sanguíneo. Além de fármacos convencionais, muitos indivíduos aderem ao uso dos chamados alimentos nutracêuticos, capazes de proporcionar benefícios à saúde, como a prevenção ou o tratamento de doenças. Inclui-se nessa categoria a lecitina de soja, a qual se sabe ter um papel importante na redução de hiperlipidemias (LEBLANC *et al.*, 1998; MASTELLONE *et al.*, 2000; POLICHETTI *et al.*, 2000).

## 1.2 LECITINA DE SOJA

Muitas são as indicações para a utilização da lecitina de soja. Dentre elas a de contribuir para a redução de peso, melhorar a absorção de lipídios e reduzir o colesterol plasmático. Além de estar presente na soja, pode ser encontrada em vários alimentos, tanto de origem vegetal quanto animal, como por exemplo, no amendoim e no fígado (ZEIZEL; 1988; HARWOOD, 1994). O consumo de produtos alimentícios industrializados também leva a uma ingestão de pequenas quantidades de lecitina, uma vez que esta é adicionada nesses produtos como emulsificante (RADOMSKA, DOBRUCKI, 2000; MANCONI *et al.*, 2003). Assim, ela faz parte da dieta de grande parte da população.

O principal constituinte da lecitina de soja é a fosfatidilcolina - PC (HARWOOD, 1994) e essa classe de fosfolipídios é mais abundante nas membranas celulares e nas lipoproteínas (VAN MEER, 1989), participando de vários processos biológicos. Ela é composta por dois ácidos graxos esterificados a um glicerol-3-fosfato e uma extremidade polar, a colina (figura 1).

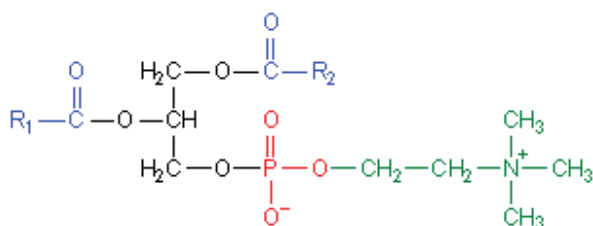


Figura 1 - Representação estrutural da molécula de fosfatidilcolina. Em azul, ácidos graxos; em preto, glicerol; em vermelho, grupo fosfato; e em verde a colina.

Os ácidos graxos esterificados ao glicerol dos fosfolipídios podem variar. Na fosfatidilcolina presente na lecitina de soja, o ácido graxo na posição 1 do

glicerol é saturado, ou seja, apresentam apenas ligações simples na cadeia de hidrocarbonetos, e o ácido graxo esterificado na posição 2 é insaturado, com a presença de duplas-ligações, representado principalmente pelo ácido linoléico (MOUSSA *et al.*, 2000a).

São vários os mecanismos pelos quais a lecitina de soja reduz o colesterol. Em dietas enriquecidas com lecitina de soja, a absorção de colesterol é reduzida devido a maior secreção deste na bile. A fosfatidilcolina também promove um efluxo de colesterol das células, participando da interação da partícula de HDL com a membrana celular. Finalmente, a lecitina estimula a captação de HDL pelo fígado, o que posteriormente aumenta a secreção de bile (MASTELLONE *et al.*, 2000). Esses efeitos fazem da lecitina de soja uma forma adicional promissora de combater dislipidemias.

Assim, embora os lipídios constituam uma proporção significativa dos requerimentos energéticos, essa não é sua única função. Como demonstrado acima, tanto fosfolipídios quanto outras classes de lipídios são importantes fontes de alterações no metabolismo. Como exemplo, pode-se citar ainda a forte relação entre infecções e deficiências nutricionais e evidencia-se um papel importante dos ácidos graxos, colesterol e fosfolipídios na atividade de células do sistema imunitário. Vários estudos mostram que manipulações da dieta de lipídios afetam a capacidade linfoproliferativa, a síntese de citocinas e a capacidade fagocitária de macrófagos (DE PABLO, CIENFUEGOS 2000).

As alterações na funcionalidade das células ocorrem porque os lipídios são incorporados nas membranas celulares (CLAMP *et al.*, 1997; DE PABLO, CIENFUEGOS, 2000), principalmente em determinados *rafts* de membrana, microdomínios que funcionam como plataforma para iniciar a cascata de ativação celular e que apresentam importantes funções na ativação de células T e B (YAQOOB, 2003). A dieta tem um papel importante porque as células são capazes de sintetizar apenas os ácidos graxos não essenciais, porém, precisam incorporar ácidos graxos essenciais, como o linoléico e o  $\alpha$ -linolênico, a partir dos lipídios plasmáticos (JOHNSTON, MARSHALL, 1984; JOHNSTON, 1985) e que são

apenas adquiridos com a alimentação. Além da incorporação à membrana, os ácidos graxos podem modular a resposta imunitária pela ligação direta a receptores acoplados a família G e que tem como ligantes ácidos carboxílicos de cadeia longa e estão expressos em vários tecidos, incluindo leucócitos (BROWN, JUPE, BRISCOE, 2005). Além disso, esses ácidos graxos e seus metabólitos podem ativar receptores nucleares da família PPAR (BISHOP- BAILEY, WRAY, 2003). A isoforma PPAR- $\alpha$  é predominante em células T e B, porém, quando essas células são ativadas, ocorre um aumento na expressão de PPAR- $\gamma$  (CLARK, 2002; YAQOUB, 2003). Esses receptores estão envolvidos no metabolismo de lipídios e glicose e apresentam um papel muito importante nas respostas imunitárias (ZHANG, YOUNG, 2002).

Os linfócitos que recirculam pelo sistema linfático são diretamente influenciados pela disponibilidade de lipídios (JEFFERY *et al.*, 1998). Vários estudos mostram que ácidos graxos insaturados são capazes de modular a proliferação de linfócitos T (BRENNER, BERNASCONI, GARDA, 2000). Um estudo feito por NISHIYAMA *et al.* (2000) demonstrou que a adição de fosfatidilcolina *in vitro* é capaz de reduzir a proliferação de células B e T e que esse efeito não depende apenas da cadeia de ácido graxo, mas sim da molécula de fosfolipídio completa. Outro fator determinante é a sub-população dos linfócitos. GUIMARÃES *et al.* (1995) demonstraram que a incorporação dos lipídios da dieta é diferente no fígado e entre os órgãos linfóides (baço, timo e linfonodo), e com isso, a composição de ácidos graxos nesses tecidos é modificada pelo tipo de lipídio administrado. Um estudo comparativo com ratos suplementados com ácidos graxos insaturados mostra uma diferença significativa na supressão de linfócitos do baço e de linfócitos do timo, sendo que a proliferação do último foi menor (YAQOUB, NEWSHOLME, CALDER, 1994).

Mudanças na composição de ácidos graxos na membrana das células resultam em modificação da fluidez e permeabilidade assim como da cinética de proteínas integrais e receptores (BRENNER, BERNASCONI, GARDA, 2000). A ligação de citocinas a seus receptores, por exemplo, pode desse modo ficar alterada (STUBBS, SMITH, 1984; GRIMBLE, TAPPIA, 1995). Além disso, os

fosfolipídios da membrana são importante fonte de moléculas sinalizadoras. Entre elas estão os eicosanóides, mediadores lipídicos derivados do ácido araquidônico e que participam do processo inflamatório (KELLEY, 2001) e imunitário (CALDER, BEVAN, NEWSHOLD, 1992; CALDER, 1998; BAZINETA, *et al.*, 2004) e segundos mensageiros intracelulares, como o inositol-3-fosfato (IP<sub>3</sub>) e diacilglicerol (DAG).

Numa suplementação da dieta com lecitina de soja, esta passa pelos processos de digestão e absorção, sofrendo hidrólise e dessa forma, pode formar outros lipídios. Entretanto, o aumento da sua disponibilidade na dieta favorece não só a sua re-síntese após a absorção, mas também aumenta o suprimento de seus precursores e metabólitos, como a colina e o ácido fosfatídico, favorecendo sua formação em todos os tecidos. Foi demonstrado que dietas deficientes em colina diminuem a imunocompetência em ratos (COURRÈGES *et al.*, 2003) e sabe-se que essa molécula é precursora para a síntese de outros substratos (BUCHMAN *et al.*, 1992), tais como o fator de agregação plaquetária (PAF), a esfingomiéline e a acetilcolina. Com isso evidencia-se a importância dos metabólitos da fosfatidilcolina na resposta imunológica.

O PAF é um mediador de respostas inflamatórias sintetizado por diversos tipos celulares e é capaz de ativar células do sistema imunitário (GRANGER; KUBES, 1994). Sua síntese é estreitamente regulada e sua atividade biológica ocorre em concentrações muito reduzidas (nM) (MARATHE *et al.*, 2002). Quando ocorre um desbalanço oxidativo e um aumento de radicais livres, a oxidação de moléculas de PC, contidas nas lipoproteínas, pode gerar fosfolipídios que mimetizam a ação do PAF (MARATHE *et al.* 2001), chamados de moléculas PAF-*like*, capazes de estimular resposta inflamatória (MARATHE *et al.*, 2000) e promover a ativação, inibição ou mesmo citotoxicidade de células T quando em grandes concentrações (FEI *et al.*, 2003).

Quando re-sintetizada e incorporada à membrana, a fosfatidilcolina se torna fonte de várias moléculas de sinalização intracelular, dependendo da família de fosfolipases ativadas (figura 2).

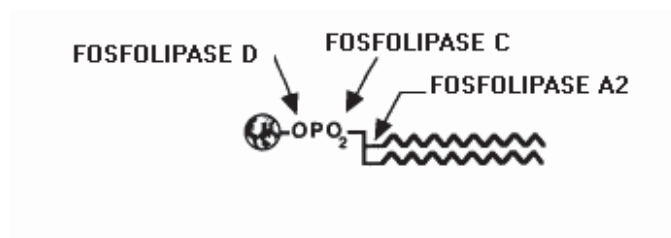


Figura 2: Representação esquemática do local de ação das fosfolipases.

A fosfolipase A<sub>2</sub> gera lisofosfatidilcolina e um ácido graxo, como o ácido linoléico, que pode ser posteriormente convertido a araquidônico por ação enzimática, ou o próprio ácido araquidônico, precursor dos eicosanóides. Esses mediadores lipídicos podem agir de três diferentes maneiras. Primeiramente como mediadores parácrinos, quando são secretados, atingem células-alvo e modulam a atividade de células vizinhas. Podem agir também como ligantes intracelulares, no qual o alvo são receptores da família PPAR (receptor ativado por proliferador de peroxissoma). Finalmente, atuam como segundos mensageiros intrácrinos, onde modulam a atividade de moléculas de sinalização, como quinases, por um mecanismo ainda desconhecido. Além do ácido graxo, a fosfolipase A<sub>2</sub> gera uma molécula de lisofosfatidilcolina, a qual tem a capacidade de iniciar e modular respostas imunológicas por atrair e ativar diretamente linfócitos B e T, macrófagos e influenciar na sua interação com outros tipos celulares (GRALER, GOETZL, 2002). Quando a fosfolipase C é ativada, gera DAG e fosfocolina. O DAG é necessário para a ativação de algumas isoformas de PKC (proteína quinase C), as quais regulam uma grande variedade de eventos biológicos (THEBAULT, OCHOA-GARAY, 2003). Por outro lado, a fosfolipase D atua na cabeça polar da molécula, gerando colina e ácido fosfatídico (DE PABLO, 2000; CUI; HOUWELING, 2002). Através dessas moléculas, formadas durante a transmissão de sinal, pode-se inibir ou ativar vias de sinalização intracelular, alterar o metabolismo celular, a expressão gênica, a função da célula e levar a divisão ou mesmo a morte da célula (JEFFERY *et al.*, 1996; DE PABLO, 2000).

A modulação na síntese de citocinas é um dos mecanismos responsáveis pela modificação na resposta de linfócitos frente a diferentes dietas de lipídios.



Linfócitos Th1 e Th2 expressam diferentes receptores de superfície, utilizam diferentes segundos mensageiros para sua ativação e estimulam a expressão de diferentes mRNAs de interleucinas (MOREL, ORIS, 1998; SMITH, 2003) e por isso essas duas sub-populações de linfócitos Th respondem de maneiras diferentes frente aos lipídios da dieta. Sabe-se que a síntese de INF- $\gamma$ , produzida pelos linfócitos Th1 (linfócitos T auxiliares –1) é finamente regulada devido ao seu papel crítico na resposta inflamatória. Outra citocina importante liberada pelos linfócitos Th1 (LTh1) ativados é a IL-2, que leva a expansão clonal de células T e influenciam na função de várias outras células. Já os linfócitos Th2 produzem IL-4 e IL-10 entre outras, as quais estão envolvidas na supressão da resposta inflamatória mediada pelos LTh1 e no controle das respostas mediadas por anticorpos (MOREL, ORISS, 1998). Dependendo do ácido graxo utilizado, da duração da dieta e a espécie de animal estudado vão ser observadas diferentes respostas de produção de citocinas e de seus receptores pelos linfócitos (CHANG, ARSENIJEVIC, PECHERE, 1992; TAPPIA, GRIMBLE, 1994; BLOK, KATAN, MEER, 1996). O mecanismo envolvido ainda não está bem esclarecido, mas é possível que ocorra uma regulação em nível transcripcional (ROBINSON, URAKAZE, HUANG, 1996).

O uso da lecitina de soja por indivíduos diabéticos pode ser um importante adjuvante no controle da dislipidemia e das complicações a longo prazo freqüentes nesses indivíduos. Entretanto, como descrito acima, a suplementação da dieta com lipídios acarreta alterações nas funções de algumas células, entre elas os linfócitos T e B. A disponibilidade de lipídios plasmáticos leva a mudanças na composição de ácidos graxos das membranas e à modulação da síntese de citocinas, os quais são fatores determinantes da atividade dessas células. Indivíduos diabéticos já apresentam um quadro de imunodepressão decorrente da própria patologia, entretanto, não há relatos na literatura sobre as conseqüências da suplementação com lecitina de soja sobre a função de linfócitos.

## 2 OBJETIVOS

Avaliar os efeitos da suplementação com lecitina de soja sobre a funcionalidade de linfócitos B e T de diferentes sub-populações (baço, timo e linfonodo) em ratos diabéticos e os possíveis mecanismos envolvidos nas alterações da funcionalidade dessas células. Para isso, pretende-se observar:

- 1) Capacidade de proliferação e atividade das desidrogenases mitocondriais de linfócitos T e B do baço, timo e linfonodo frente aos mitógenos Concanavalina A e LPS, respectivamente;
- 2) Produção de interleucinas IL-2, INF- $\gamma$ , IL-4 e IL-10;
- 3) Composição de ácidos graxos das membranas dos linfócitos dos diferentes órgãos linfóides.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS:

#### 3.1 ANIMAIS:

Ratos machos da linhagem Wistar pesando 200+/-20g foram obtidos do Biotério da Universidade Federal do Paraná, onde receberam água e ração *ad libitum* (composta por 52% de carboidratos, 21% de proteínas e 4% de lipídios da NUVILAB CR1, Nuvital Nutrientes Ltda.). Esses animais foram mantidos sob temperatura controlada e ciclo claro / escuro de 12:12 horas. Para cada experimento, 12 animais foram separados em 4 grupos: controle (C); controle suplementado (S); diabéticos (D) e diabéticos suplementados (DS). Os procedimentos utilizados estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) – Protocolo no. 93 do CEEA - UFPR.

#### 3.3 INDUÇÃO DE DIABETES

Os ratos do grupo diabéticos foram deixados em jejum por 12 horas e, após anestesia com éter, 60mg/Kg de estreptozotocina dissolvida em tampão citrato (ácido cítrico 0,35%; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,06%) foi administrada pela veia peniana. Após a injeção, os ratos ainda foram mantidos por 1 hora sem água e ração. Os animais do grupo controle receberam tratamento similar, porém apenas o veículo foi administrado. Para monitorar a glicemia dos ratos, por volta do décimo dia de suplementação, a concentração de glicose plasmática dos animais foi determinada por kits comerciais (Labtest). Para tal, os animais foram submetidos a anestesia por éter e em seguida a uma punção cardíaca para a retirada de uma pequena alíquota de sangue. A glicemia dos animais também foi avaliada ao final dos 21 dias de suplementação. Foram considerados diabéticos os animais cuja concentração de glicose foi superior a 200 mg/dL em ambas as análises.

### 3.2 SUPLEMENTAÇÃO:

Os grupos suplementados receberam por via oral, com o auxílio de uma seringa, 2g/Kg de lecitina de soja (Herbarium), diariamente, durante 21 dias. O peso dos animais foi monitorado a cada 2 dias. Nos animais diabéticos, a suplementação foi iniciada 2 dias após a indução da diabetes.

### 3.4 SACRIFÍCIO DOS ANIMAIS

Os procedimentos experimentais foram todos realizados no período da manhã. Ao término das três semanas de suplementação, os animais foram decapitados. O sangue foi recolhido para as determinações séricas e os órgãos linfóides – baço, timo e linfonodo mesentérico - foram retirados e acondicionados em tubos com PBS (NaCl 0,8%; KCl 0,02%;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,012% e  $\text{NaHPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  0,229%) estéril.

### 3.5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

#### 3.5.1 Determinações séricas

A glicose, triacilgliceróis, colesterol total e colesterol HDL foram determinados pelos kits GLICOSE PAP, TRIGLICÉRIDES GPO-ANA, COLESTEROL e COLESTEROL HDL da Labtest, conforme especificações do fabricante. A concentração de LDL colesterol foi obtida pela subtração do HDL colesterol do colesterol total (colesterol total – HDL colesterol). Já a concentração de VLDL foi obtida pela divisão dos valores de triacilglicerol por 5.

### 3.5.2 Proliferação de linfócitos

Os tecidos linfóides foram macerados com o auxílio de malha de ferro e as células liberadas foram centrifugadas a 1200 rpm (centrífuga Eppendorf modelo 5810R) por 8 minutos. O sobrenadante foi descartado e uma nova lavagem das células com PBS foi realizada. As células então foram novamente centrifugadas.

As células do baço foram ressuspensas em uma solução hemolítica (tris[hidroximetil aminometano]-tris-base 0,206%; cloreto de amônio 0,77%), onde foram deixadas durante 30 minutos em banho-maria a 37°C. Após esse período foram novamente centrifugadas e ressuspensas em PBS. Essas células passaram então para placas de Petri onde permaneceram por 30 minutos para que os macrófagos residentes ficassem aderidos, e fossem retirados. Após esse período, foram novamente recolhidas em tubos, centrifugadas e ressuspensas em meio de cultura RPMI 1640 com 10% de soro fetal bovino e 0,1% de antibiótico (100 U/mL de penicilina, 100 mg/mL de estreptomicina). As células do timo e linfonodo foram diretamente ressuspensas em meio de cultura.

Em seguida, 100uL de células numa concentração de  $3 \cdot 10^6$  células/ml foram adicionadas em placas de 96 escavações. As células de cada tecido receberam 100uL de uma solução de Concanavalina A, mitógeno que ativa células T (LICASTRO, DAVIS, MORINI, 1993) numa concentração final de 5 ug/ml ou 100uL de LPS 10ug/ml, mitógeno para linfócitos B (ANTAL-SZALMAS, 2000) ou ainda apenas 100uL de meio de cultura (grupo não estimulado). Essas células foram cultivadas por 66 horas, tempo de cultivo este determinado por experimentos-piloto.

A proliferação foi avaliada por citometria de fluxo (FACS Calibur Becton Dickinson, CA, USA). Para isso, o conteúdo de cada escavação foi diluído em mais 400uL de PBS em tubos plásticos. Foi utilizado o software CELLQUEST e os parâmetros selecionados foram ajustados para garantir a detecção dos linfócitos. Em seguida foram contados o número de eventos em 30 segundos, em fluxo médio (WANG; ZHENG, 2002).

### 3.5.3 Metabolismo de enzimas mitocondriais:

Outro parâmetro avaliado foi o metabolismo de enzimas mitocôndrias segundo o Método do MTT (*3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyltetrazolium bromide*) (MOSMANN,1983). Realizado o cultivo celular, as células foram centrifugadas e o sobrenadante descartado. O MTT (5mg/ml de PBS) foi diluído em meio RPMI com soro fetal bovino e adicionado às células na concentração de 500 ug/ml e incubado por 3 horas. Após esse período, as células foram novamente centrifugadas, o sobrenadante descartado e 100uL de dimetilsulfóxido (DMSO) foram adicionados. A absorbância obtida foi mensurada por leitores de microplaca no comprimento de onda de 550nm.

### 3.5.3 Produção de interleucinas:

A produção de citocinas foi avaliada a partir do meio de cultura onde as células foram cultivadas. Para tal, foram utilizadas placas de 24 poços, os quais receberam 400 ul de células ( $3 \times 10^6$ /ml) e 400ul do mitógeno Concanavalina A (ConA) ou simplesmente meio de cultura. Após 66 horas a placa foi centrifugada e o sobrenadante recolhido. A partir do meio de cultura, foram analisadas a produção das interleucinas IL-2, IL-4, IL-10 e INF- $\gamma$  utilizando-se kits da Biosource, segundo as instruções do fabricante.

### 3.5.4 Determinação da composição de ácidos graxos da membrana celular (MARTINS *et al.*, 2002):

Para a análise da composição de ácidos graxos da membrana por HPLC, foram feitos os seguintes procedimentos:

a) Extração lipídica:  $5 \cdot 10^6$  células de cada tecido foram recolhidas e centrifugadas. O meio foi retirado e então foram adicionados 500uL de metanol. Em seguida foi adicionado 1 ml de clorofórmio e 400uL de PBS. Os tubos foram agitados em vórtex e centrifugados a 1500 rpm por 1 minuto. Formando-se uma solução bifásica, a fase superior (hidrofílica) passou por mais duas extrações adicionando-se mais 500ul de metanol, 500ul de clorofórmio e 400 ul de água. Os extratos clorofórmicos resultantes receberam 1 ml de solução de Folch (FOLCH, 1957) (3 clorofórmio/ 48 metanol/ 47 água – v/v/v) e foram agitados em vórtex e centrifugados rapidamente para melhor separação das fases. A fase superior foi descartada, e a fase orgânica evaporada através de fluxo de nitrogênio.

b) saponificação: o extrato lipídico foi tratado com 2 ml de NaOH 0,5M em metanol 90% para promover a hidrólise alcalina. Os tubos foram homogeneizados e deixados em banho-maria a 37°C sob agitação por 2 horas. Após esse período os tubos foram resfriados e a solução foi neutralizada com 2 ml de HCl 1M. Em seguida foi adicionado 2 ml de hexano para extração dos ácidos graxos. A extração é repetida e novamente o extrato lipídico é obtido após secagem com nitrogênio.

c) Derivatização com bromometil-metóxi-coumarina (BrMMC) para a formação de um complexo fluorescente. Para isso, foram preparadas duas soluções separadamente. A primeira (solução A) foi feita com 10 mg de BrMMC dissolvidos em 10 ml de acetonitrila num frasco âmbar. A solução B foi feita com 26,5 mg de 18-crown-6 e 100 mg de carbonato de potássio dissolvidos em 5 ml de acetonitrila. Essa solução B foi sonicada por 30 minutos e outros 5 ml são

adicionados. O sobrenadante é utilizado. A amostra lipídica que passou pela saponificação foi restituída com 200ul de acetonitrila/clorofórmio (1:1), agitada em vórtex e evaporada. Os ácidos graxos concentrados no tubo foram ressuspensos com 100uL de acetonitrila. Dessa solução, transferiu-se uma alíquota de 50 uL para *vials* com redutores de volume e 10ul das soluções A e B. Após homogeneização e incubação em 60° em banho seco por 15 minutos, os *vials* foram resfriados a temperatura ambiente e mantidos a 1° C até o momento da injeção no equipamento.

d) HPLC - *High performance liquid chromatography*: O equipamento utilizado possui um sistema com duas bombas, auto-injetor e detector de fluorescência. A coluna analítica utilizada possui as determinadas características: coluna C-8, de fase reversa, com 25cm x 4,6mm x 5µm (comprimento x diâmetro interno x diâmetro das partículas).

Os seguintes padrões de ácidos graxos foram utilizados: ácido láurico (C12:0), ácido mirístico (C14:0), ácido palmítico (C16:0), ácido palmitoléico (C16:1), ácido esteárico (C18:0), ácido oléico (C18:1), ácido linoléico (C18:2), ácido linolênico (C18:3), ácido araquidônico (C20:4), ácido eicosapentaenóico (C20:5) e ácido docosaheptaenóico (C22:6). Foi construída uma curva de calibração para cada padrão com injeções de volumes crescentes de cada ácido graxo até a obtenção das curvas. Finalmente a mistura dos 11 ácidos graxos-padrão derivatizados foi injetada, ajustando-se o fluxo e gradiente de eluição. Foi utilizado um gradiente de eluição linear, com fase móvel composta por acetonitrila e água. A composição inicial foi de 77% de acetonitrila e a composição final de 90%. Os compostos foram detectados fluorimetricamente, com excitação a 325 nm e emissão a 398nm.



#### 4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M. de, no mínimo, 3 preparações, cada uma proveniente de animais diferentes. As comparações entre grupos foram realizadas empregando-se o teste t ou *one-way* ANOVA de acordo com as análises realizadas. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DA RAÇÃO

A análise da composição lipídica demonstrou que os principais ácidos graxos presentes na ração dos animais são o ácido linoléico, o qual corresponde a  $55,49 \pm 0,24\%$ , e o ácido oléico, correspondendo a  $21,03 \pm 0,25 \%$  do total de ácidos graxos presentes. Somados a outros ácidos graxos, tais como o linolênico ( $5,24 \pm 0,035$ ) observa-se que  $82,41 \pm 0,18 \%$  do total são ácidos graxos insaturados. A fração de ácidos graxos saturados é composta principalmente pelos ácidos palmítico ( $14,14 \pm 0,06\%$ ) e ácido esteárico ( $2,25 \pm 0,07 \%$ ).

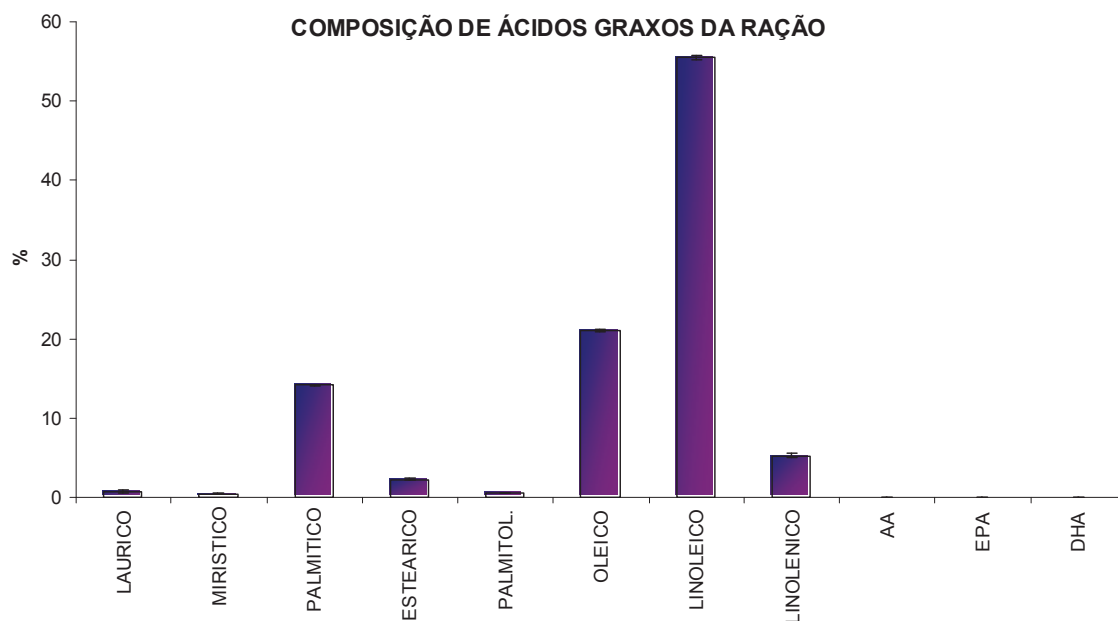


Figura 3: Composição relativa de ácidos graxos da ração consumida pelos animais, expressa em média da porcentagem  $\pm$  EPM de 2 experimentos diferentes. Foram analisados os ácidos: LAU: láurico; MIR: mirístico; PALM: palmítico; ESTEA: esteárico; PALMITOL: palmitoléico; OLE: oléico; LINO: linoléico; Linolênico; AA: araquidônico; EPA: eicosapentaenólico; DHA: docosahexaenólico.

## 5.2 COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DA LECITINA DE SOJA:

O perfil de ácidos graxos encontrado na ração é semelhante ao da lecitina de soja. O ácido graxo presente em maior concentração é o ácido linoléico, perfazendo um total de  $62,94 \pm 4,69$ . O ácido oléico corresponde a  $13,01 \pm 0,62$  % dos ácidos graxos. Ácidos graxos insaturados somam  $85,43 \pm 5,29$  % do total de ácidos graxos. Não foi observada diferença estatística entre a composição de ácidos graxos da ração e da lecitina de soja.

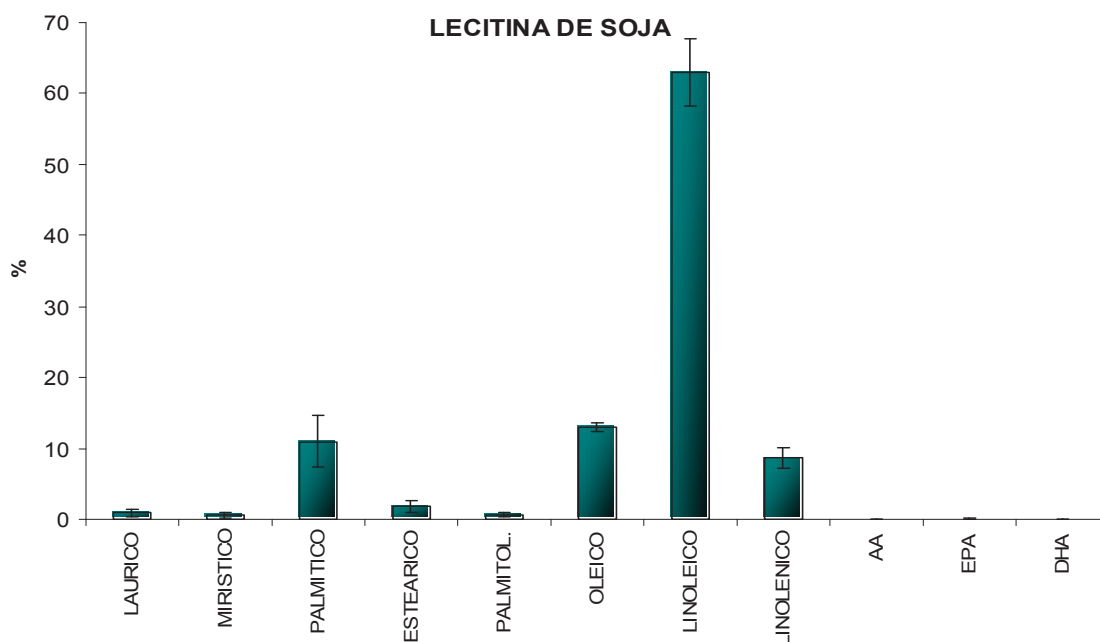


Figura 4: Composição relativa de ácidos graxos da lecitina de soja suplementada aos animais. Dados expressos como média da porcentagem  $\pm$  EPM de 2 experimentos diferentes. Foram analisados os ácidos: LAU: láurico; MIR: mirístico; PALM: palmítico; ESTEA: esteárico; PALMITOL: palmitoléico; OLE: oléico; LINO: linoléico; Linolênico; AA: araquidônico; EPA: eicosapentaenóico; DHA: docosahexaenóico. \* = diferença estatística em relação ao grupo C.

### 5.3 PESO DOS RATOS

O acompanhamento do ganho de massa corporal dos animais está descrito no gráfico abaixo:

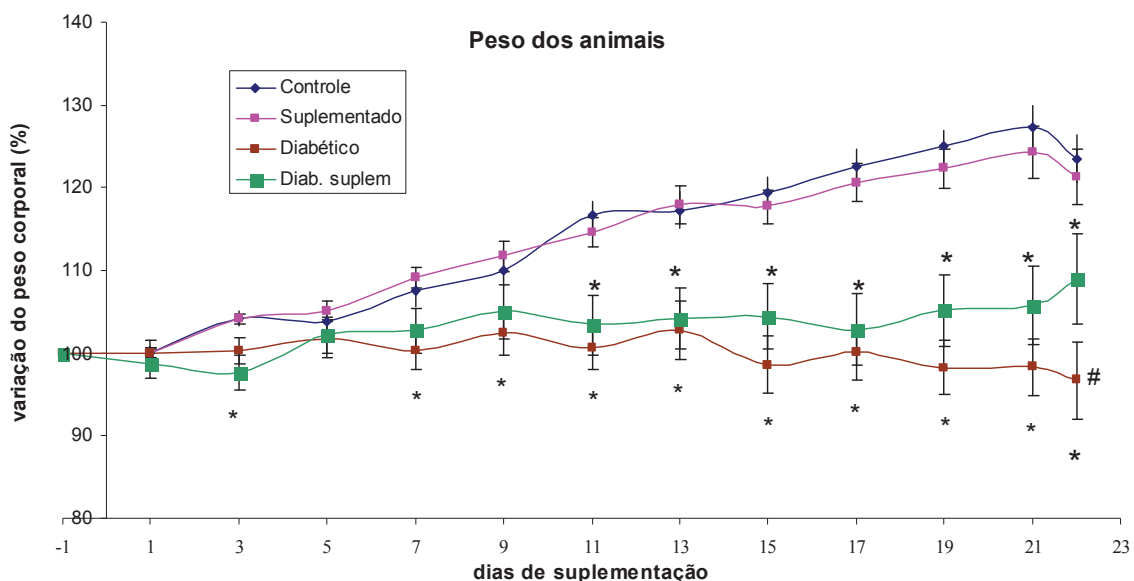


Figura 5: Resultados da variação do peso corporal dos animais dos grupos CONTROLE, SUPLEMENTADO, DIABÉTICO e DIABÉTICO SUPLEMENTADO durante os 21 dias de suplementação. Os dados estão expressos em porcentagem da média  $\pm$  EPM. Para os animais dos grupos C e S, os dados estão expressos em relação ao peso apresentado no primeiro dia de suplementação. O tempo -1 refere-se ao dia de indução de diabetes nos grupos D e DS e o peso dos animais diabéticos foram expressos em relação ao peso nesta data. O 22º dia refere-se ao dia da morte dos animais. \*= diferença estatística em relação a C e S; #= diferença estatística em relação a D (n para todos os grupos  $\geq 9$  e  $p < 0,05$ ).

Os animais dos grupos controle e suplementado apresentaram um aumento de massa corporal, de  $23,49 \pm 2,90\%$  e  $21,36 \pm 3,34\%$ , respectivamente, não havendo diferença entre esses grupos. Os animais do grupo diabético e diabético suplementado apresentaram uma variação do peso corporal muito inferior a dos animais não diabéticos. Essa redução no ganho de peso é marcante nos animais diabéticos, sendo que após os 21 dias de suplementação o animal, ao invés de aumentar sua massa corporal, acaba reduzindo seu peso em aproximadamente 4%. A suplementação com lecitina de soja torna essa redução

de peso menos pronunciada. Embora inferior ao ganho de massa dos animais controle, ao final dos 21 dias esses animais apresentaram um crescimento em torno de 9%.

#### 5.4 METABOLISMO DAS DESIDROGENASES MITOCONDRIAIS:

##### 5.4.1 Células T

A ativação de células T foi feita através do cultivo com ConA. Estão descritos a seguir os resultados obtidos para cada grupo em cada órgão linfóide.

##### 5.4.1.1 Baço

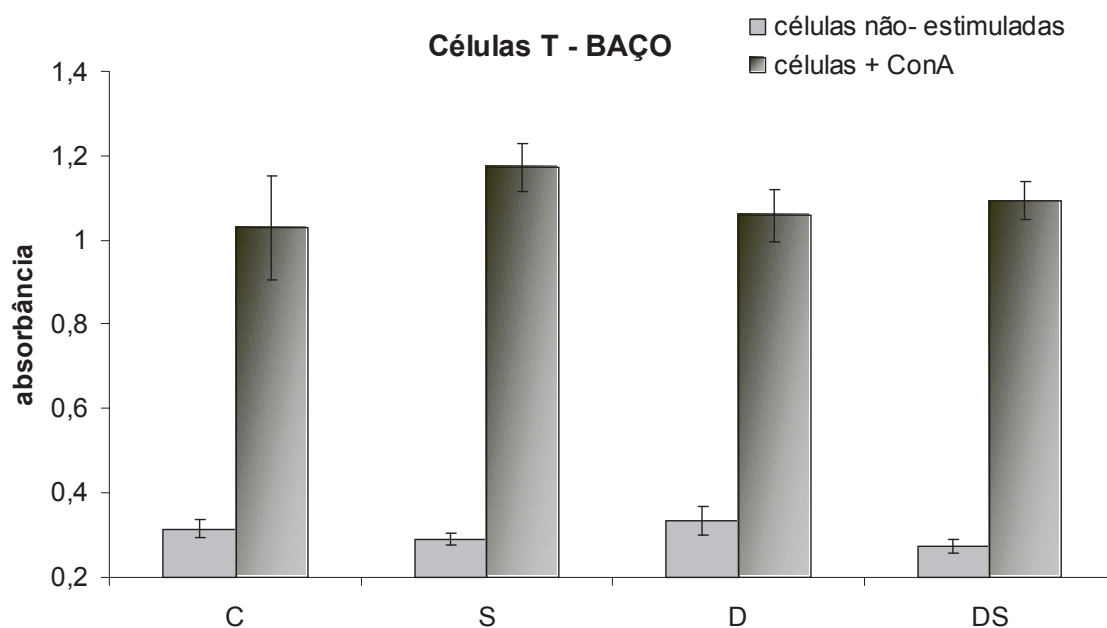


Figura 6: Resultados das absorvâncias obtidas pelo ensaio do MTT após 66 horas de cultivo celular de linfócitos T do baço dos grupos C; S; D e DS. Resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM de no mínimo 3 experimentos diferentes, sendo que a primeira coluna de cada grupo corresponde à absorvância das células em condições basais (sem estímulo mitogênico) e a segunda coluna corresponde a absorvância das células do grupo estimulado por ConA.

As células de baço que não receberam ConA apresentaram absorvâncias similares. Os grupo controle e suplementado apresentaram valores de  $0,315 \pm 0,02$  e  $0,291 \pm 0,014$ , respectivamente. O grupo diabético apresentou uma absorvância de  $0,334 \pm 0,03$  e o grupo diabético suplementado apresentou um valor de  $0,274 \pm 0,02$ . A estimulação por ConA resulta num aumento significativo da absorvância para  $1,030 \pm 0,12$  no grupo controle + ConA;  $1,174 \pm 0,06$  no grupo suplementado + ConA;  $1,058 \pm 0,06$  no grupo diabético+ ConA e  $1,094 \pm 0,04$  no grupo diabético suplementado + ConA, não havendo diferença entre os grupos estimulados.

#### 5.4.1.2 Timo

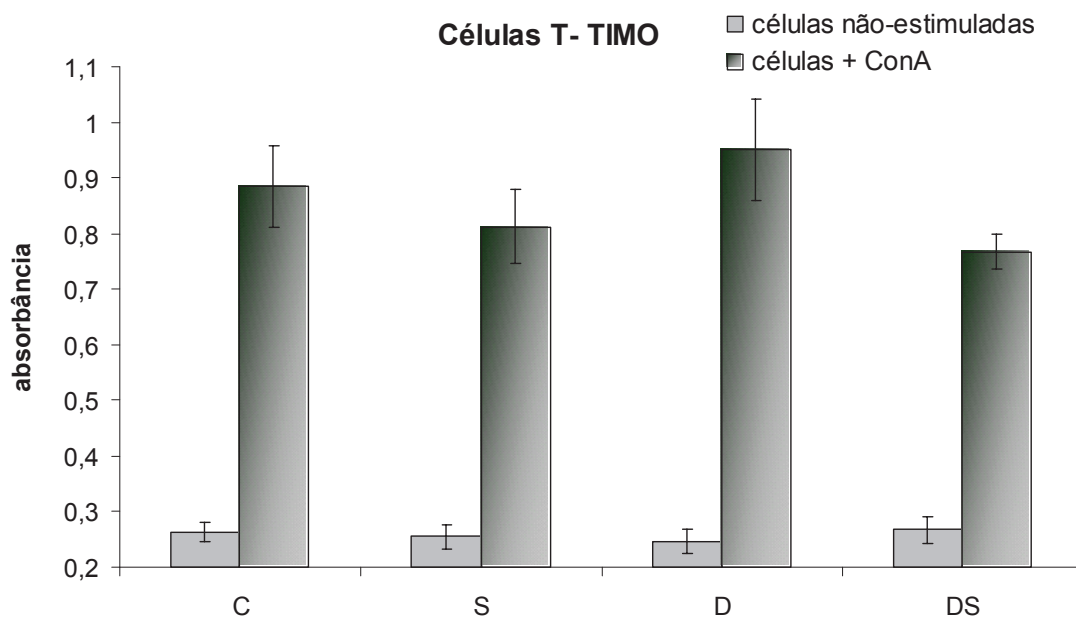


Figura 7: Resultados das absorvâncias obtidas pelo ensaio do MTT após 66 horas de cultivo celular de linfócitos T do timo dos grupos C; S; D; e DS. Resultados foram expressos como média  $\pm$  erro da amostra de 5 experimentos diferentes, sendo que a primeira coluna de cada grupo corresponde à absorvância das células em condições basais (sem estímulo mitogênico) e a segunda coluna corresponde a absorvância das células do grupo estimulado por ConA..

Não houve diferença entre as absorvâncias das células do timo não estimuladas por ConA. Os resultados foram: a) grupo C:  $0,264 \pm 0,02$ ; b) grupo S:  $0,255 \pm 0,02$ ; grupo D:  $0,247 \pm 0,02$  e d) grupo DS:  $0,267 \pm 0,02$ . A estimulação por ConA aumenta significativamente a conversão do MTT, atingindo os valores de absorvância  $0,885 \pm 0,07$  e  $0,813 \pm 0,07$  nos grupos C + ConA e S + ConA. Os grupo D+ConA e DS + ConA obtiveram as absorvâncias de  $0,952 \pm 0,09$  e  $0,767 \pm 0,03$ , respectivamente e não é observada diferença entre os grupos estimulados por ConA.

#### 5.4.1.3 Linfonodo mesentérico

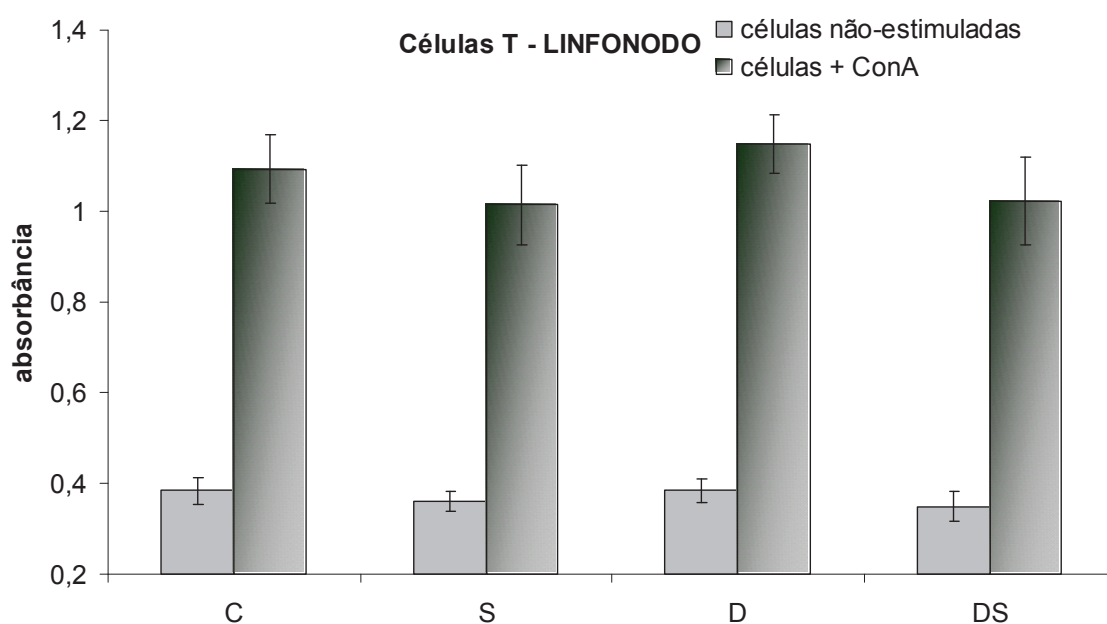


Figura 8: Resultados das absorvâncias obtidas pelo ensaio do MTT após 66 horas de cultivo celular de linfócitos T do linfonodo mesentérico dos grupos C; S; D e DS. Resultados foram expressos como média  $\pm$  erro da amostra de 7 experimentos diferentes, sendo que a primeira coluna de cada grupo corresponde à absorvância das células em condições basais (sem estímulo mitogênico) e a segunda coluna corresponde a absorvância das células do grupo estimulado por ConA.

Nos linfócitos do linfonodo mesentérico também não foram observadas alterações na conversão do MTT devido ao estado diabético ou ao tratamento com

a lecitina de soja. Foi observado apenas aumento da absorbância nas células que receberam a ConA, sem diferença estatística entre esses grupos.

#### 5.4.2 Células B

A partir do mesmo *pool* de células, uma porção destas foi estimulada por LPS, mitógeno que ativa células B. Os resultados de cada grupo, em cada órgão linfóide, estão descritos abaixo:

##### 5.4.2.1 Baço

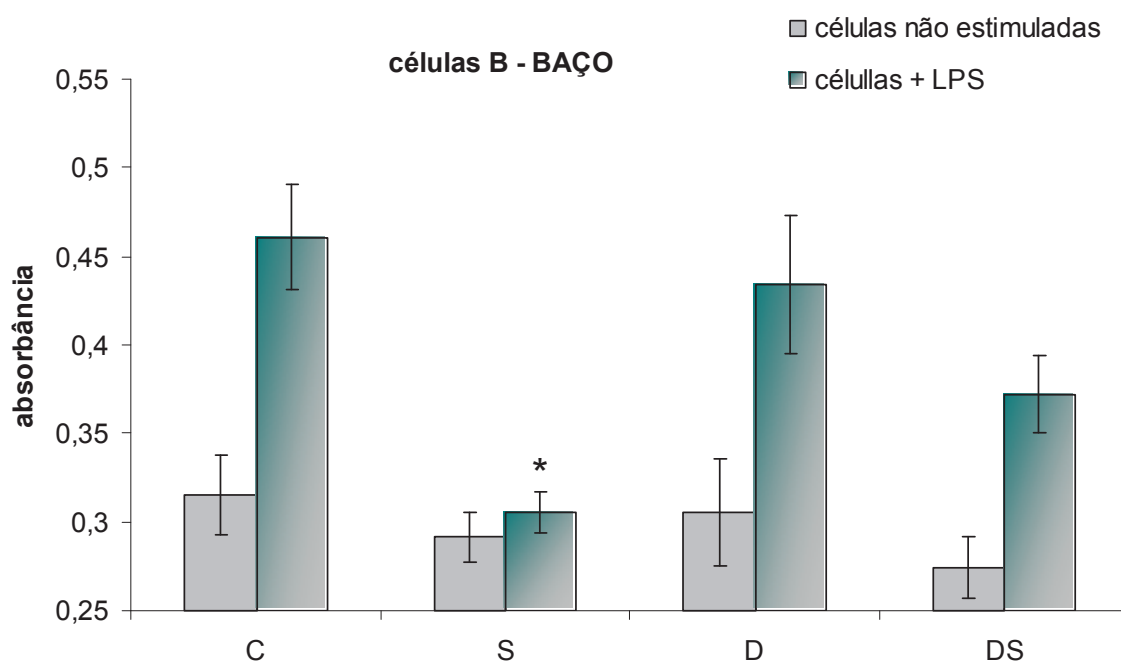


Figura 9: Resultados das absorbâncias obtidas pelo ensaio do MTT após 66 horas de cultivo celular de linfócitos B do baço dos grupos C; S; D e DS. Resultados foram expressos como média  $\pm$  erro da amostra de 3 experimentos diferentes, sendo que a primeira coluna de cada grupo corresponde à absorbância das células em condições basais (sem estímulo mitogênico) e a segunda coluna corresponde a absorbância das células do grupo estimulado por LPS.



A suplementação dos animais inibiu significativamente a conversão do MTT nas células dos animais do grupo S, sendo que a adição de LPS não alterou o metabolismo dessas células. Os demais grupos apresentaram um aumento na conversão do MTT em resposta ao LPS. No grupo controle a absorvância passou de  $0,315 \pm 0,02$  para  $0,460 \pm 0,03$  na presença de LPS. No grupo diabético, a absorvância passa de  $0,306 \pm 0,03$  no grupo D para  $0,434 \pm 0,04$  no D + LPS e finalmente no grupo diabético suplementado a absorvância basal é de  $0,274 \pm 0,02$  e a adição de LPS eleva essa absorvância para  $0,373 \pm 0,02$ .

#### 5.4.2.2 Timo

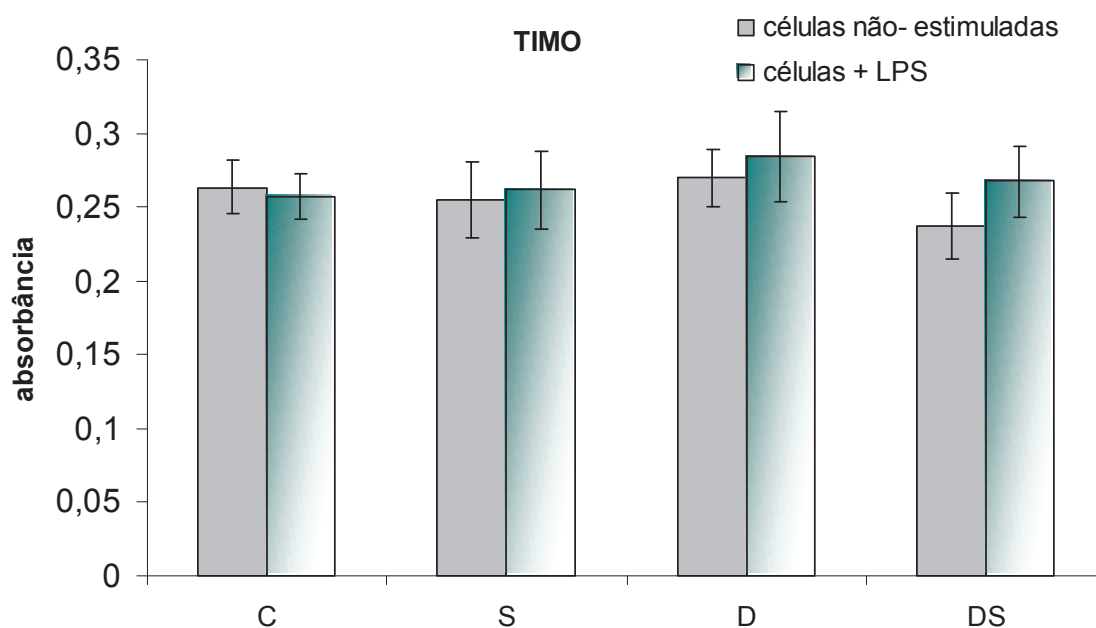


Figura 10: Resultados das absorvâncias obtidas pelo ensaio do MTT após 66 horas de cultivo celular de células do timo dos grupos C; S; D e DS. Resultados foram expressos como média  $\pm$  erro da amostra de 3 experimentos diferentes, sendo que a primeira coluna de cada grupo corresponde à absorvância das células em condições basais (sem estímulo mitogênico) e a segunda coluna corresponde a absorvância das células do grupo estimulado por LPS.

A adição de LPS não causou nenhum efeito sobre a proliferação de linfócitos de células do timo devido a pequena quantidade de células B nesse órgão. A absorbância resultante dessas células foi, em média, 0,250.

#### 5.4.2.3 Linfonodo mesentérico

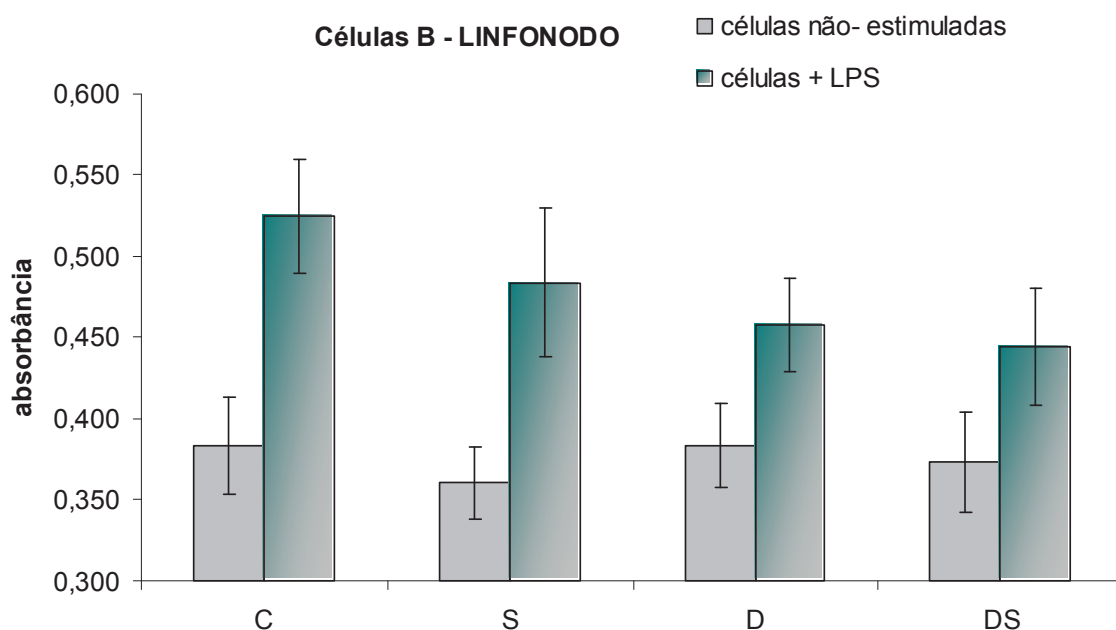


Figura 11: Resultados das absorbâncias obtidas pelo ensaio do MTT após 66 horas de cultivo celular de linfócitos B do linfonodo mesentérico dos grupos C; S; D e DS. Resultados foram expressos como média  $\pm$  erro da amostra de 4 experimentos diferentes, sendo que a primeira coluna de cada grupo corresponde à absorbância das células em condições basais (sem estímulo mitogênico) e a segunda coluna corresponde a absorbância das células do grupo estimulado por LPS.

A estimulação por LPS só foi capaz de causar um aumento significativo na conversão do MTT nas células de linfonodo mesentérico dos animais não diabéticos. As células do grupo C apresentaram uma absorbância de  $0,383 \pm 0,03$  e as do grupo C+LPS apresentaram o valor de  $0,525 \pm 0,04$ . Não houve diferença estatística entre os quatro grupos estimulados e não estimulados.

## 5.5 PROLIFERAÇÃO CELULAR

A concentração de células, avaliada através da contagem do número de células durante 30 segundos, foi o método utilizado para avaliar a proliferação celular (WANG, ZENG, 2002). As contagens obtida após o cultivo celular por 66 horas com concanavalina A ou com LPS, para cada grupo e para cada órgão linfóide, estão descritos a seguir.

### 5.5.1 Células T

#### 5.5.1.1 Baço

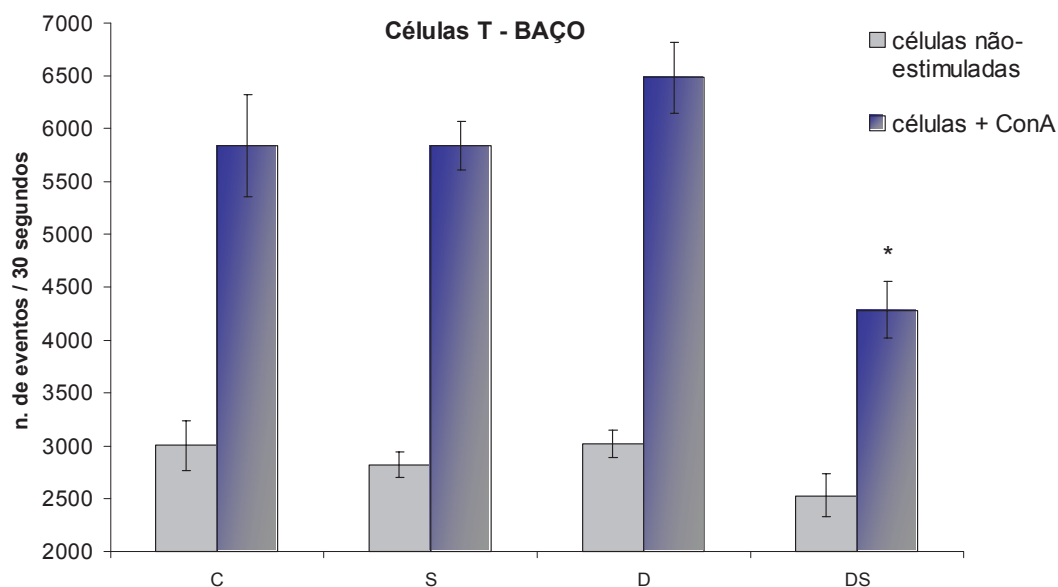


Figura 12: Resultados de proliferação de linfócitos T do baço dos animais dos grupos C, S, D, e DS avaliada por citometria de fluxo através da contagem do número de células (nº de eventos) em 30 segundos, em fluxo médio (35µl/min). Dados foram expressos como média ± erro da amostra de no mínimo 6 experimentos diferentes, sendo que a primeira coluna de cada grupo corresponde ao número de células em condições basais (sem estímulo mitogênico) e a segunda coluna corresponde ao número de células do grupo estimulado por ConA. \*= diferença estatística em relação aos demais grupos estimulados por ConA ( $p < 0,05$ ).

A contagem do número de células por citometria de fluxo demonstrou que após o cultivo de  $3,0 \times 10^5$  células por 66 horas e na ausência de estimulação pela ConA, a contagem do número de eventos em 30 segundos fica próxima a 3000. Nos grupos que receberam o mitógeno, a contagem do número de eventos foi significativamente maior do que a do respectivo grupo sem ConA, demonstrando a ocorrência de proliferação celular. No grupo C+ConA, a contagem do número de eventos foi de  $5839,82 \pm 480,04$ . Uma contagem semelhante foi obtida nos grupos S+ConA, a qual foi de  $5838,75 \pm 232,40$  e no grupo D +ConA ( $6480,29 \pm 333,56$ ). Já o grupo DS+ConA apresentou uma contagem significativamente menor que os outros 3 grupos tratados com ConA, a qual foi de  $4284,59 \pm 265,77$ .

### 5. 5.1.2 Timo

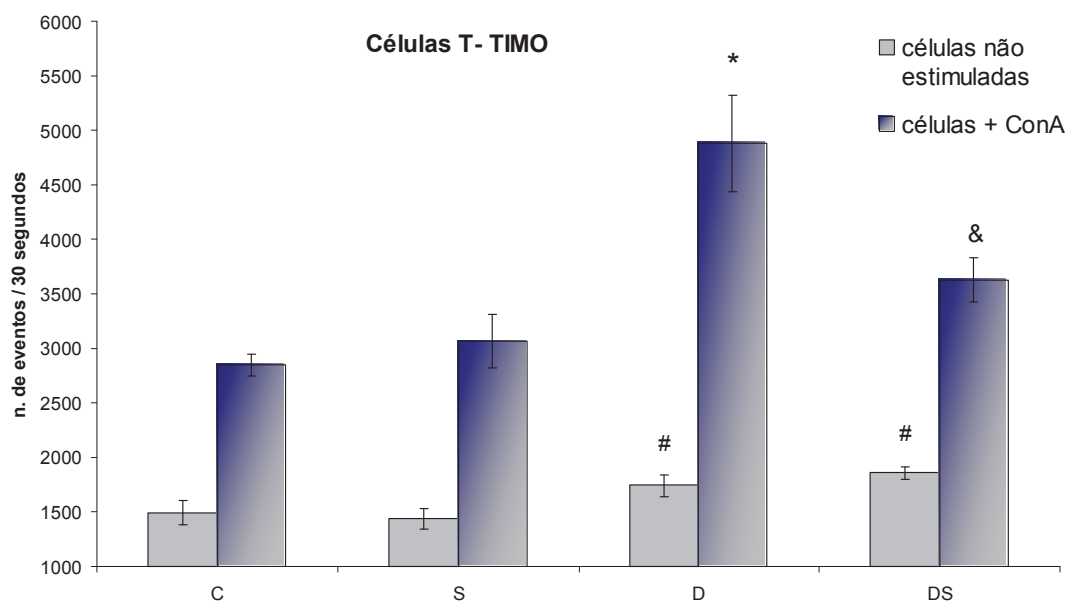


Figura 13: Resultados de proliferação de linfócitos T do timo dos animais dos grupos C, S, D e DS avaliada por citometria de fluxo através da contagem do número de células (nº de eventos) em 30 segundos, em fluxo médio (35ul/min). Dados foram expressos como média  $\pm$  erro da amostra de no mínimo 5 experimentos diferentes, sendo que a primeira coluna de cada grupo corresponde ao número de células em condições basais (sem estímulo mitogênico) e a segunda coluna corresponde ao número de células do grupo estimulado por ConA. # = diferença estatística em relação aos grupos C e S em condições basais; \* = diferença estatística em relação aos grupos C e S estimulados; & = diferença estatística em relação ao grupo diabético estimulado por ConA ( $p < 0,05$ ).

O cultivo de células do timo por 66 horas demonstrou uma contagem basal (sem ConA) das células dos animais não diabéticos em torno de 1470 eventos em 30 segundos. Por outro lado, a contagem basal de células dos grupos dos animais diabéticos foi superior, em torno de 1800, indicando a proliferação dessas células. A adição de ConA aumentou de maneira significativa o número de células. Os grupos C+ConA e S+ ConA apresentaram, respectivamente,  $2847,50 \pm 100,54$  e  $3064,69 \pm 240,40$  células em 30 segundos, sendo esses valores estatisticamente semelhantes. A proliferação de células T do timo dos animais diabéticos ( $4878,95 \pm 444,94$ ) foi superior a todos os grupos. A proliferação das células do grupo diabético suplementado foi significativamente menor que a do grupo diabético não-tratado.

### 5.5.1.3 Linfonodo mesentérico

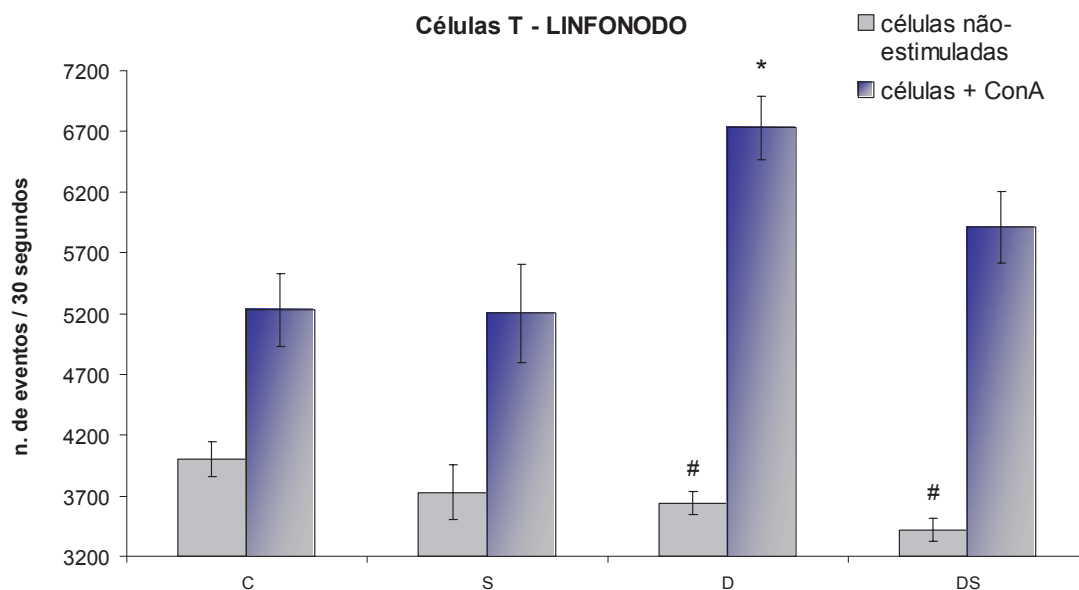


Figura 14: Resultados de proliferação de linfócitos T do linfonodo mesentérico dos animais dos grupos C, S, D e DS, avaliada por citometria de fluxo através da contagem do número de células (nº de eventos) em 30 segundos, em fluxo médio (35ul/min). Dados foram expressos como média  $\pm$  erro da amostra de no mínimo 3 experimentos diferentes, sendo que a primeira coluna de cada grupo corresponde ao número de células em condições basais (sem estímulo mitogênico) e a segunda coluna corresponde ao número de células do grupo estimulado por ConA. \*= diferença estatística em relação ao grupo C estimulado por ConA; #=diferença estatística em relação ao grupo C não estimulado. ( $p < 0,05$ ).

O cultivo de  $3 \times 10^5$  células por 66 horas, na ausência de ConA, levou a uma contagem de aproximadamente 3800 eventos em 30 segundos no caso de células do linfonodo. A adição de ConA e a consequente proliferação de linfócitos T levou a uma contagem de  $5229,43 \pm 304,40$  células em 30 segundos no grupo C+ConA. O grupo S+ConA apresentou um valor similar,  $5200,91 \pm 409,42$  eventos/30segundos. A proliferação celular do grupo D+ConA ( $6794,64 \pm 269,87$ ) foi superior a de todos os grupos.

## 5.5.2 Células B

### 5.5.2.1 Baço

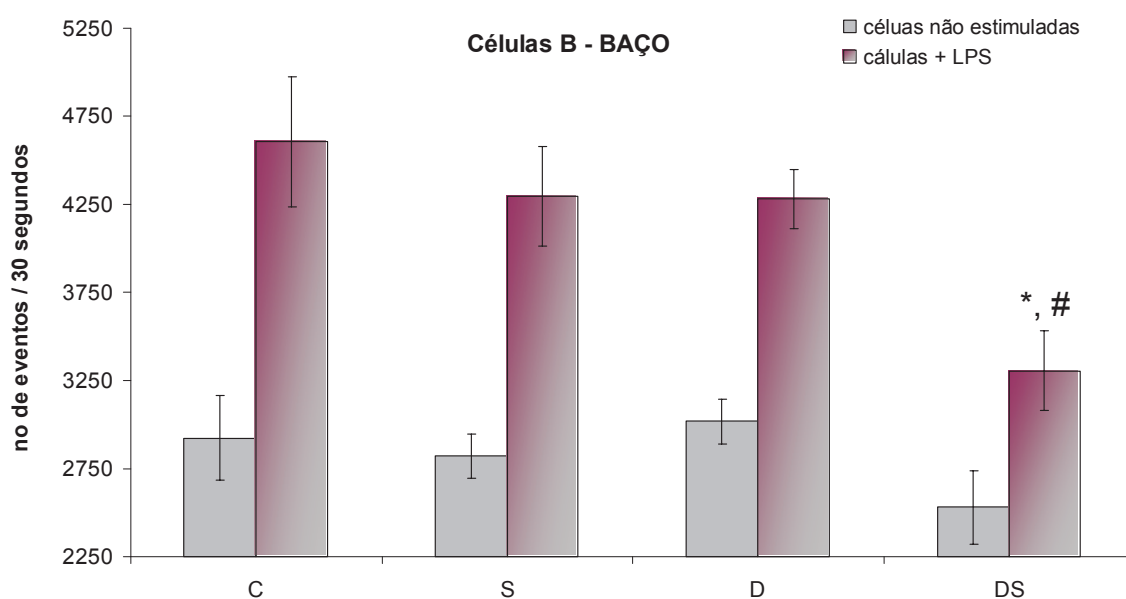


Figura 15: Resultados de proliferação de linfócitos B do baço dos animais dos grupos C, S, D e DS, avaliada por citometria de fluxo através da contagem do número de células (nº de eventos) em 30 segundos, em fluxo médio (35ul/min). Dados foram expressos como média  $\pm$  erro da amostra de no mínimo 4 experimentos diferentes, sendo que a primeira coluna de cada grupo corresponde ao número de células em condições basais (sem estímulo mitogênico) e a segunda coluna corresponde ao número de células do grupo estimulado por LPS. \* = diferença estatística em relação aos demais grupos estimulados por LPS ( $p < 0,05$ ).

Quando estimuladas com LPS, a proliferação das células B resulta num aumento significativo do número de células. Os grupos não estimulados apresentaram contagens próximas a 3000 eventos em 30 segundos. Na presença de LPS, essa contagem passou para  $4605,71 \pm 370,84$  no grupo C+LPS. Os grupos S+LPS e D+LPS apresentaram contagens de  $4295,89 \pm 281,41$  e  $4282,5 \pm 167,99$  eventos em 30 segundos, ambos os resultados sendo semelhantes ao do grupo C+LPS. Já o grupo DS+LPS apresentou uma contagem de  $3305,89 \pm 228,58$  células, significativamente menor a dos demais grupos estimulados.

Embora o número de células do grupo S seja semelhante aos dos grupo C e D, análises de citometria de fluxo demonstram um posicionamento diferente das células desse grupo no gráfico de FSC x SSC. A figura 16 demonstra o posicionamento das células do grupo C estimuladas por LPS e a figura 17 demonstra o posicionamento das células do grupo S.

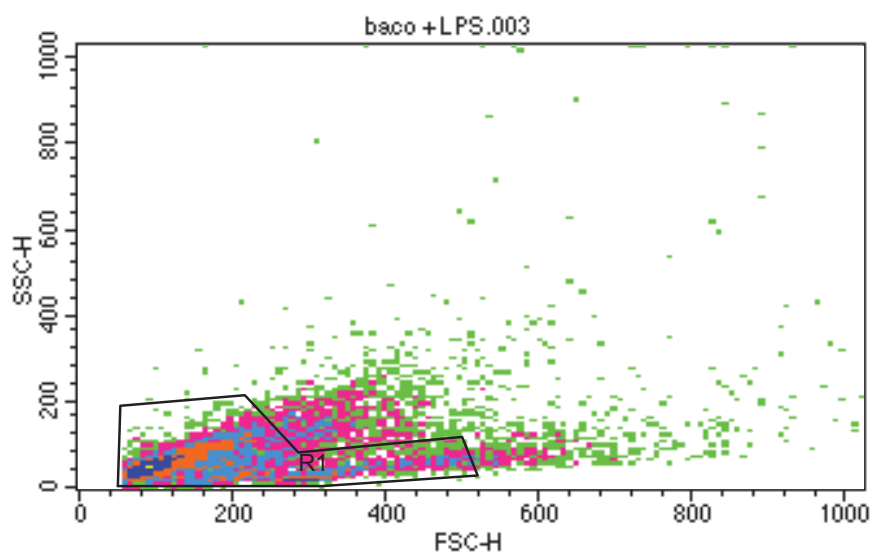


Figura 16: Gráfico de FSC x SSC que mostra o posicionamento das células no grupo C avaliadas após 66 horas de cultivo. A região delimitada- R1- (*gate*) corresponde ao local de maior concentração das células B não ativadas, demarcada através de células que não receberam nenhum mitógeno. Quando ativadas pelo LPS essas células se deslocam dessa região. Cada ponto corresponde a uma célula e as cores diferentes correspondem a concentrações diferentes de células (em ordem decrescente: azul escuro> vermelho> azul claro> rosa> verde).

A ativação das células pelo LPS causa um deslocamento das células para uma região de células maiores e com núcleo mais condensado, característica observada em células com propriedades linfoblásticas, isto é, ativadas e com capacidade proliferativa. A proporção de células que se deslocam para o lado direito e superior do gráfico é significativamente maior no grupo S que nas células do grupo controle.

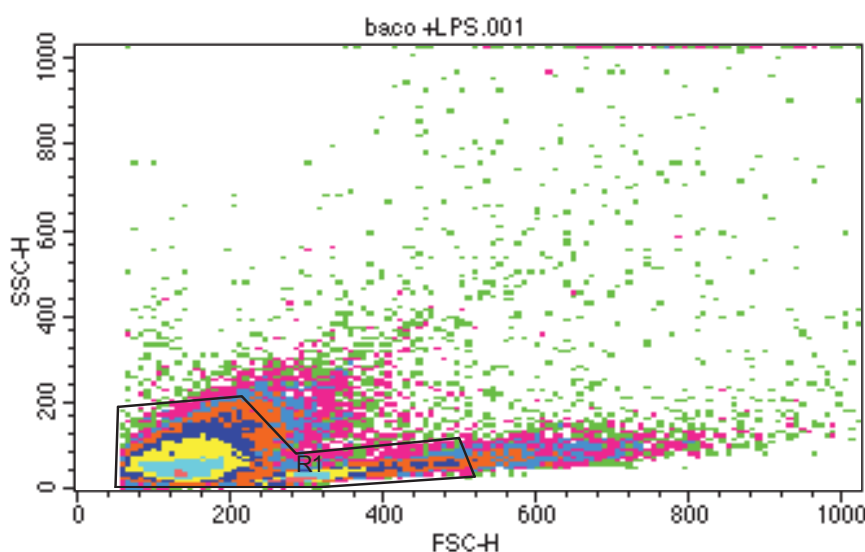


Figura 17: Gráfico de FSC x SSC que mostra o posicionamento das células no grupo S avaliadas após 66 horas de cultivo. A região delimitada- R1- (*gate*) corresponde ao local de maior concentração das células B não ativadas, demarcada através de células que não receberam nenhum mitógeno. Quando ativadas pelo LPS essas células se deslocam dessa região. Cada ponto corresponde a uma célula e as cores diferentes correspondem a concentrações diferentes de células (em ordem decrescente: azul escuro> vermelho> azul claro> rosa> verde).

Embora o número de células após 66 horas de cultivo tenha sido semelhante, no grupo suplementado a proporção de células que apresentam essa característica é maior que no grupo controle. Isto indica que a suplementação ativou a proliferação das células B do baço, que em 66 horas de cultivo não foi refletido em aumento do número de células, porém, num tempo de cultivo celular maior, esse aumento seria verificado. Experimentos prévios em nosso laboratório realmente demonstraram que o pico de proliferação celular para as células do baço, frente ao estímulo do LPS, ocorre em 72 horas de cultivo, como demonstrado na fig 18.



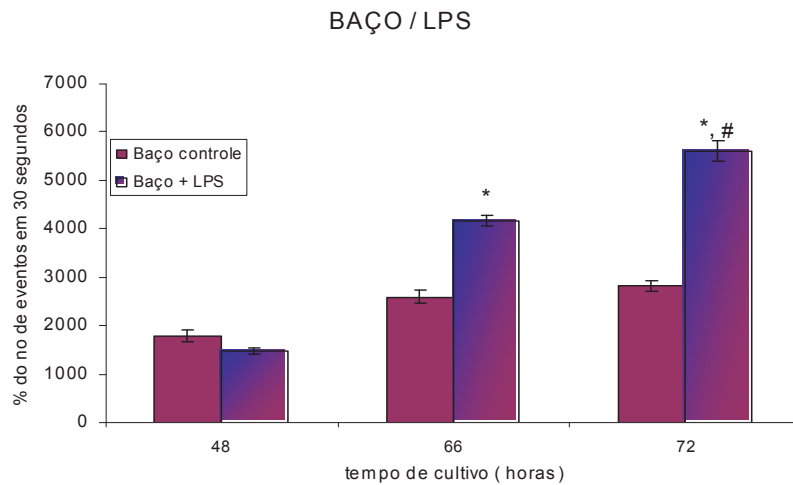


Figura 18: Gráfico de proliferação de células B do baço em 48, 66 e 72 horas de cultivo celular. Foram plaqueadas  $3 \times 10^5$  células e estas foram ou não estimuladas com LPS. \*=diferença estatística em relação ao grupo não estimulado respectivo, #= diferença estatística entre os grupos estimulados.

### 5.5.2.2 Timo

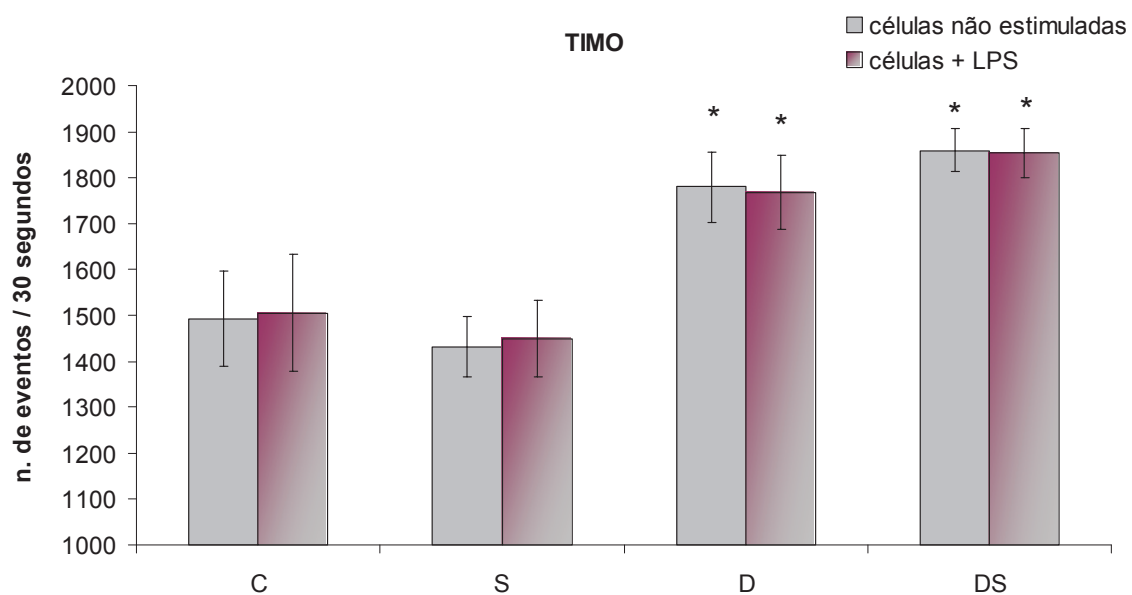


Figura 19: Resultados de proliferação de linfócitos B do timo dos animais dos grupos C, S, D e DS, avaliada por citometria de fluxo através da contagem do número de células (nº de eventos) em 30 segundos, em fluxo médio (35ul/min). Dados foram expressos como média  $\pm$  erro da amostra de no mínimo 4 experimentos diferentes, sendo que a primeira coluna de cada grupo corresponde ao número de células em condições basais (sem estímulo mitogênico) e a segunda coluna corresponde ao número de células do grupo estimulado por LPS. \* = diferença estatística em relação aos grupos C e S ( $p < 0,05$ ).

A adição de LPS às células do timo não causou proliferação celular, uma vez que não houve diferença entre os grupos que receberam ou não LPS. Observa-se que o número de células nos grupos diabéticos é superior a dos grupos não-diabéticos, independente da adição de LPS.

### 5.5.2.3 Linfonodo mesentérico

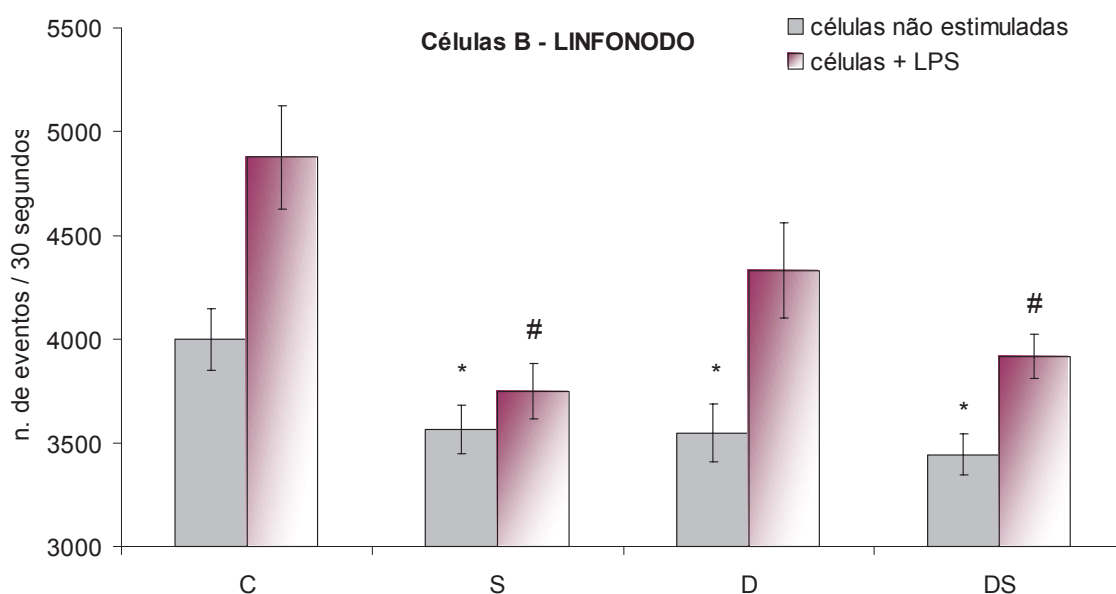


Figura 20: Resultados de proliferação de linfócitos B do linfonodo mesentérico dos animais dos grupos C, S, D e, avaliada por citometria de fluxo através da contagem do número de células (nº de eventos) em 30 segundos, em fluxo médio (35ul/min). Dados foram expressos como média  $\pm$  erro da amostra de no mínimo 4 experimentos diferentes, sendo que a primeira coluna de cada grupo corresponde ao número de células em condições basais (sem estímulo mitogênico) e a segunda coluna corresponde ao número de células do grupo estimulado por LPS. \*= diferença estatística em relação ao grupo C não estimulado; # = diferença estatística em relação ao grupo C estimulado por LPS ( $p < 0,05$ ).

A avaliação por citometria de fluxo demonstrou que após 66 horas de cultivo, a contagem do número das células extraídas do linfonodo do grupo C era de aproximadamente 4000 eventos. Os demais grupos apresentaram uma redução no número basal de células. A adição de LPS não causou proliferação celular no grupo S. O número de células do grupo C+LPS foi de  $4878,50 \pm 249,39$

e no grupo D + LPS foi de  $4328,57 \pm 229,19$ . A proliferação celular dos grupos suplementados foi reduzida em relação ao grupo C estimulado. O grupo S + LPS apresentou uma contagem de  $3750,94 \pm 134,31$ , valor esse estatisticamente igual ao do seu respectivo grupo sem LPS e o grupo DS + LPS apresentou uma contagem de células de  $3917,42 \pm 106,69$ .

### 5.5.3 Comparação entre proliferação celular e MTT

#### 5.5.3.1 Células T

A tabela abaixo resume as alterações observadas nas células quanto a proliferação celular e metabolismo do MTT.

	Número de células	Ensaio do MTT	Metabolismo
<b>Baço</b>	C=S=D>DS	C=S=D=DS	DS ↑
<b>Timo</b>	C=S<<D>DS	C=S=D=DS	D ↓ DS ↑ x D
<b>Linfo</b>	C=S<<D=DS	C=S=D=DS	D ↓

Tabela 1: Resumo das alterações na proliferação celular e metabolismo do MTT das células T dos órgãos baço, timo e linfonodo mesentérico. Representa-se o mesmo número de células ou uma conversão semelhante do MTT pelo símbolo “ = ”. Em grupos onde observa-se um menor número de células ou uma menor conversão do sal do MTT, o sinal gráfico que o antecede é “ > ” e maior número ou maior absorbância é representado por “ < ”. As flechas na última coluna representam um aumento ou redução do metabolismo celular.

### 5.5.3.2 Células B

O mesmo estudo comparativo foi feito para células B, representado abaixo. Os resultados obtidos do timo não foram incluídos na tabela devido ao pequeno número de células B neste órgão.

	<b>Número de Células</b>	<b>Ensaio do MTT</b>	<b>Metabolismo</b>
<b>Baço</b>	C=S=D>DS	C>S<D>DS	S ↓
<b>Linfonodo</b>	C>S<D=DS	C=S=D=DS	S ↑

Tabela 2: Resumo das alterações na proliferação celular e metabolismo do MTT das células BT dos órgãos baço e linfonodo mesentérico. Representa-se o mesmo número de células ou uma conversão semelhante do MTT pelo símbolo “ = ”. Em grupos onde observa-se um menor número de células ou uma menor conversão do sal do MTT, o sinal gráfico que o antecede é “ > ” e maior número ou maior absorvância é representado por “ < ”. As flechas na última coluna representam um aumento ou redução do metabolismo celular.

## 5.6 PRODUÇÃO DE INTERLEUCINAS

A partir do sobrenadante das culturas estimuladas por ConA, foram dosadas as interleucinas 2, 4, 10 e INF- $\gamma$ . Os resultados estão descritos a seguir.

## 5.6.1 IL- 2

### 5.6.1.1 BAÇO

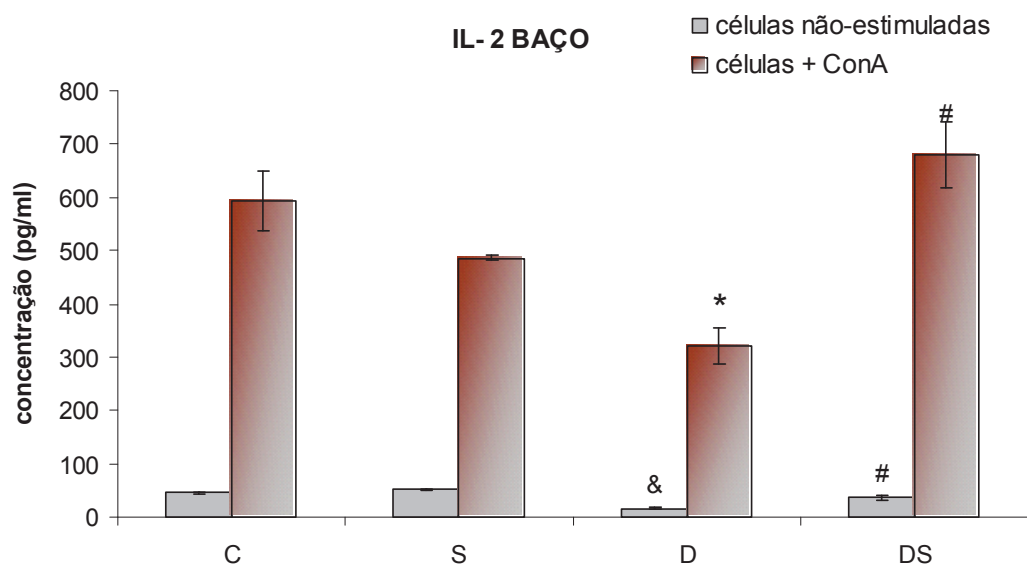


Figura 21: Concentração de interleucina-2 avaliada a partir do meio de cultura onde os linfócitos do baço foram cultivados por 66 horas. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM de no mínimo 3 experimentos diferentes, sendo que a primeira coluna de cada grupo corresponde à concentração de IL-2 produzida em condições basais (sem estímulo pela ConA) e a segunda coluna corresponde à concentração de IL-2 produzida pelas células estimuladas por ConA. \*= diferença estatística em relação ao grupo C estimulado por ConA, &= diferença estatística em relação ao grupo C em condições basais; # = diferença estatística em relação ao grupos D ( $p < 0,05$ ).

Quando não estimuladas, as células do baço dos grupos C, S e DS apresentaram uma produção similar de IL-2. e observa-se uma redução na produção basal de IL-2 pelas células dos animais diabéticos. A estimulação por ConA aumenta radicalmente essa produção. A concentração de IL-2 presente no meio de cultura das células dos grupos C+ConA e S+ConA foi  $593,27 \pm 56,27$  pg/ml e  $486,24 \pm 5,54$  pg/ml, respectivamente. Um quantidade menor foi produzida pelas células do grupo D+ConA, a qual foi de apenas  $321,77 \pm 33,32$  pg/ml. A suplementação dos animais diabéticos causou um aumento significativo na produção da IL-2 ( $679,81 \pm 60,66$  pg/ml), elevando sua concentração final a valores similares ao do grupo C+ConA.

## 5.6.1.2 TIMO

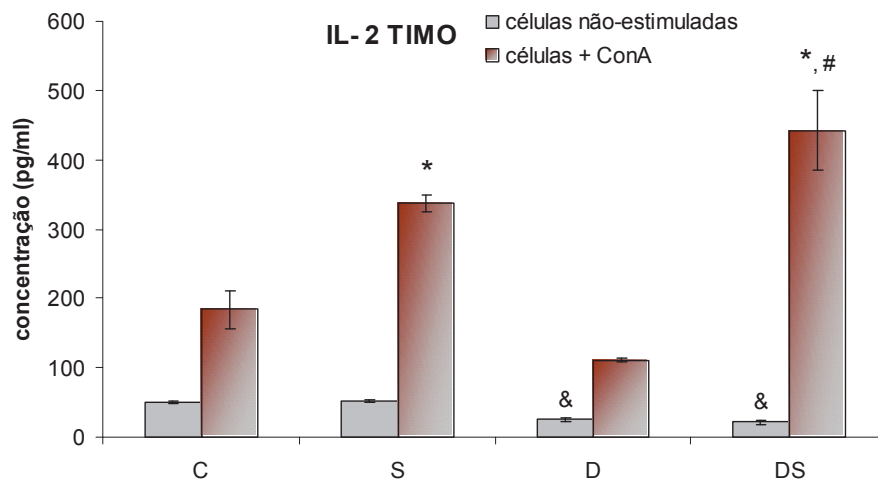


Gráfico 22: Concentração de interleucina-2 dosada a partir do meio de cultura onde os linfócitos do timo foram cultivados por 66 horas. Resultados expressos como média ± EPM de no mínimo 3 experimentos diferentes, sendo que a primeira coluna de cada grupo corresponde à concentração de IL-2 produzida em condições basais (sem estímulo pela ConA) e a segunda coluna corresponde à concentração de IL-2 produzida pelas células estimuladas por ConA. \*= diferença estatística em relação ao grupo C estimulado por ConA. &= diferença estatística em relação ao grupo C em condições basais; # = diferença estatística em relação aos grupos D estimulado por ConA (p<0,05).

Os timócitos dos animais diabéticos também apresentaram uma redução na produção basal de IL-2. Quando estimuladas pela ConA, a produção em todos os grupos aumenta, porém em proporções diferentes. No grupo C+ConA, a concentração produzida de IL-2 foi de  $184,08 \pm 21,07$  pg/ml. O grupo S+ConA produziu uma quantidade significativamente maior em relação ao grupo C+ConA, sendo ela de  $336,38 \pm 12,10$  pg/ml. O grupo D+ConA teve uma produção inferior ( $111,29 \pm 3,82$ pg/ml). Por outro lado, as células do grupo DS+ConA produziram  $442,16 \pm 57,09$  pg/ml de IL-2, valor significativamente maior que dos outros grupos.

### 5.6.1.3 LINFONODO MESENTÉRICO

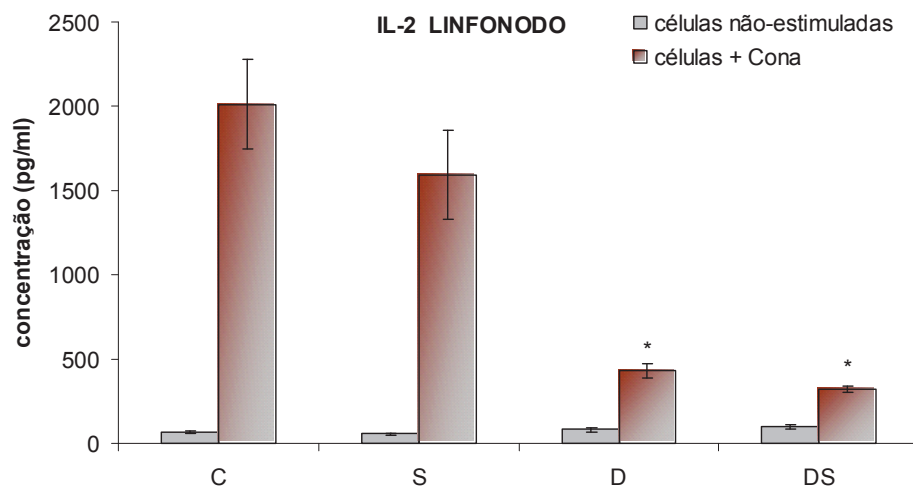


Figura 23: Concentração de interleucina-2 dosada a partir do meio de cultura onde os linfócitos do linfonodo mesentérico foram cultivados por 66 horas. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM de no mínimo 3 experimentos diferentes, sendo que a primeira coluna de cada grupo corresponde à concentração de IL-2 produzida em condições basais (sem estímulo pela ConA) e a segunda coluna corresponde à concentração de IL-2 produzida pelas células estimuladas por ConA. \*= diferença estatística em relação ao grupo C estimulado por ConA ( $p < 0,05$ ).

Quanto ao linfonodo mesentérico, a produção basal de IL-2 pelas células foi semelhante entre os grupos. Quando estimuladas por ConA, a produção de IL-2 aumenta, porém nos animais diabéticos essa produção é muito inferior à produção das células dos grupos não-diabéticos. As células dos grupos C+ConA e S+ConA produziram, respectivamente,  $2011,34 \pm 323,69$  pg/ml e  $1970,57 \pm 184,80$  pg/ml de IL-2. Já nas células dos grupos D+ConA e DS+ConA, a produção foi de apenas  $400,31 \pm 46,72$  e  $321,05 \pm 18,85$  pg/ml.

## 5.6.2 INF- $\gamma$

### 5.6.2.1 BAÇO

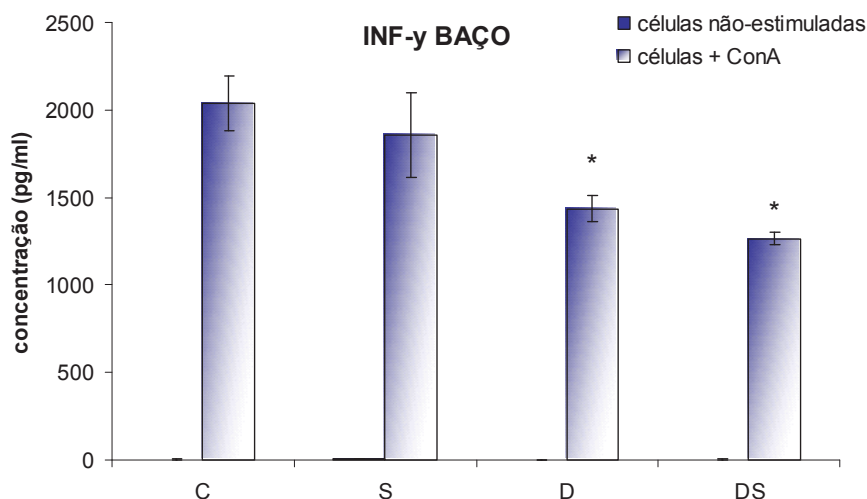


Figura 24: Concentração de INF- $\gamma$  dosada a partir do meio de cultura onde os linfócitos do baço foram cultivados por 66 horas. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM de no mínimo 3 experimentos, sendo que a primeira coluna de cada grupo corresponde à concentração de INF- $\gamma$  produzida em condições basais (sem estímulo pela ConA) e a segunda coluna corresponde à concentração de INF- $\gamma$  produzida pelas células estimuladas por ConA. \*= diferença estatística em relação ao grupo C estimulado por ConA ( $p < 0,05$ ).

A produção de INF- $\gamma$  pelas células do baço aumentou significativamente em decorrência da estimulação por ConA. A produção que era muito pequena, quase indetectável, pelas células quiescentes, passou para  $2037,65 \pm 160,47$  pg/ml no grupo C+ConA e  $1857,55 \pm 243,00$  pg/ml no grupo S+ConA. Já as células dos animais diabéticos estimulados apresentaram uma produção inferior de INF- $\gamma$ , sendo ela de  $1437,86 \pm 77,00$  pg/ml e  $1265,32 \pm 35,83$  pg/ml nos grupos D+ConA e DS+ConA.



## 5.6.2.2 TIMO

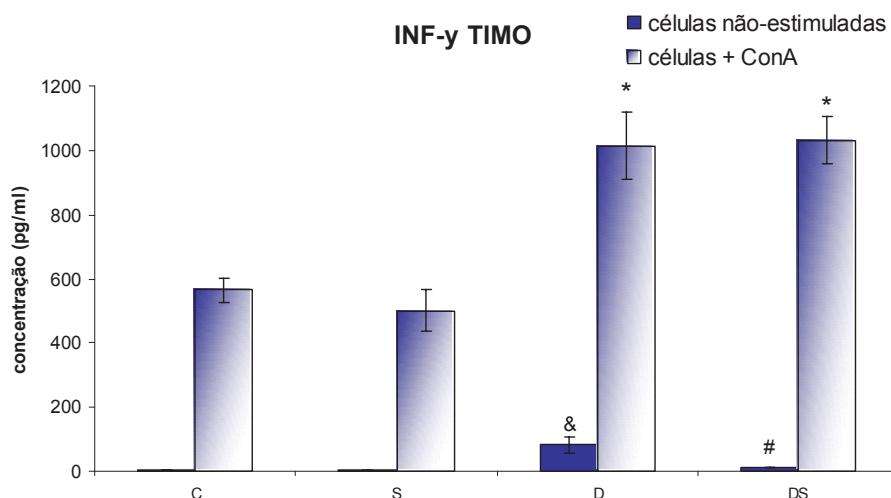


Figura 25: Concentração de INF- $\gamma$  dosada a partir do meio de cultura onde os linfócitos do timo foram cultivados por 66 horas. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM de no mínimo 3 experimentos diferentes, sendo que a primeira coluna de cada grupo corresponde à concentração de INF- $\gamma$  produzida em condições basais (sem estímulo pela ConA) e a segunda coluna corresponde à concentração de INF- $\gamma$  produzida pelas células estimuladas por ConA. \* = diferença estatística em relação ao grupo C estimulado por ConA; & = diferença estatística em relação ao grupo C em condições basais, # = diferença estatística em relação ao grupo D em condições basais ( $p < 0,05$ ).

As células quiescentes do timo, dos 4 grupos analisados, apresentaram uma produção muito pequena de INF- $\gamma$ . As células dos animais diabéticos apresentam uma produção superior que os demais grupos em condições basais. A estimulação por ConA elevou esses valores para  $565,20 \pm 38,78$  pg/ml no grupo C+ConA;  $501,51 \pm 63,33$  pg/ml no S+ConA;  $1014,34 \pm 103,25$  pg/ml no grupo D+ConA e  $1031,25 \pm 74,21$  pg/ml no DS+ConA, demonstrando assim o aumento na produção de INF- $\gamma$  pelas células dos grupos diabéticos.

### 5.6.2.3 LINFONODO MESENTÉRICO

As células não estimuladas do linfonodo mesentérico apresentaram uma produção mínima de INF- $\gamma$ , em torno de 11 pg/ml e entre as quais não existe diferença estatística. A adição de ConA fez com que a produção aumentasse para  $1799,11 \pm 210,76$  pg/ml no grupo C+ConA;  $2003,06 \pm 126,55$  pg/ml no S+ConA;  $2641,83 \pm 398,03$  pg/ml no grupo D+ConA e  $2200,93 \pm 159,08$  pg/ml no DS+ConA. Não foi observada diferença estatística entre os grupos estimulados (fig. 26).

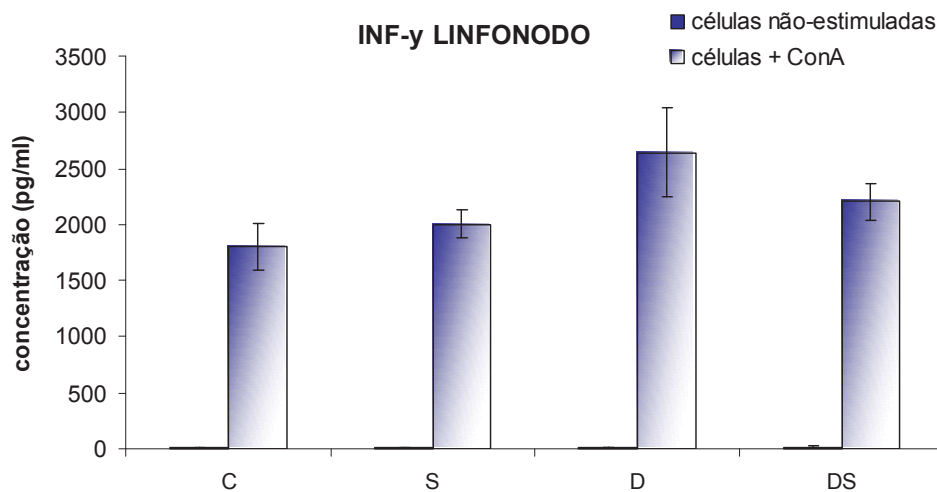


Figura 26: Concentração de INF- $\gamma$  dosada a partir do meio de cultura onde os linfócitos do linfonodo mesentérico foram cultivados por 66 horas. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM de no mínimo 3 experimentos diferentes, sendo que a primeira coluna de cada grupo corresponde à concentração de INF- $\gamma$  produzida em condições basais (sem estímulo pela ConA) e a segunda coluna corresponde à concentração de INF- $\gamma$  produzida pelas células estimuladas por ConA.

### 5.6.3 IL-4

#### 5.6.3.1 BAÇO

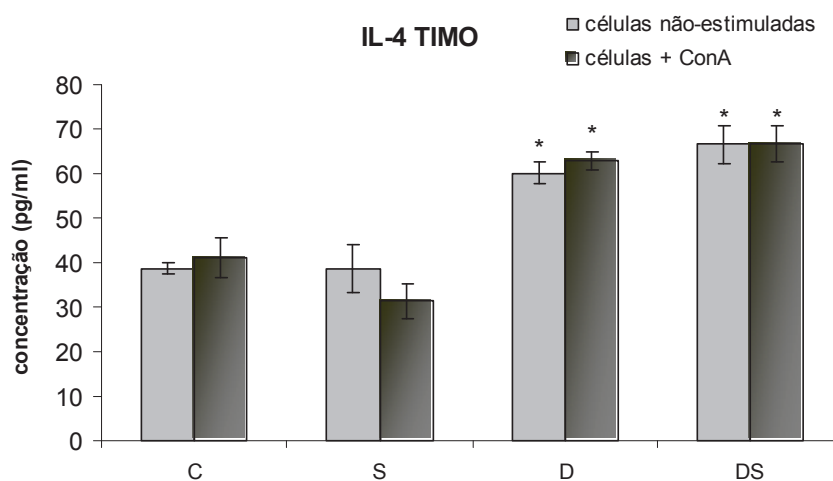


Figura 27: Concentração de IL - 4 dosada a partir do meio de cultura onde os linfócitos do baço foram cultivados por 66 horas. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM de no mínimo 3 experimentos diferentes, sendo que a primeira coluna de cada grupo representa a concentração de IL-4 produzida pelas células em condições basais (não-estimuladas por ConA) e a segunda coluna representa a concentração de IL-4 produzida pelas células estimuladas por ConA. \*= diferença estatística em relação ao grupo C estimulado por ConA. ( $p < 0,05$ ).

Observa-se que a produção de IL-4 pelas células do baço não é dependente da estimulação por ConA e não foi modulada pela suplementação da dieta com lecitina de soja. O que é evidente é a alteração causada pelo estado diabético na produção dessa interleucina. As células dos grupos não diabéticos produziram por volta de 38 pg/ml de IL-4. Já as células dos grupos diabéticos (D, D+ConA, DS e DS+ConA) produziram em média 64 pg/ml.

### 5.6.3.2 TIMO

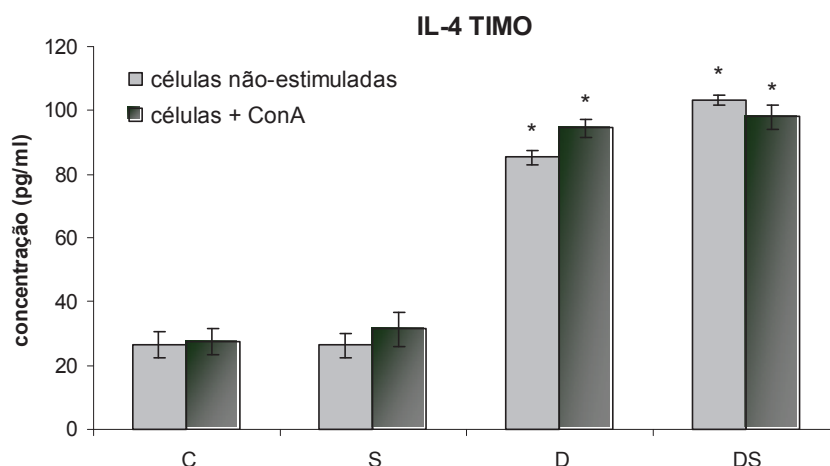


Figura 28: Concentração de IL-4 dosada a partir do meio de cultura onde os linfócitos do timo foram cultivados por 66 horas. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM de no mínimo 3 experimentos diferentes, sendo que a primeira coluna de cada grupo representa a concentração de IL-4 produzida pelas células em condições basais (não-estimuladas por ConA) e a segunda coluna representa a concentração de IL-4 produzida pelas células estimuladas por ConA. \*= diferença estatística em relação ao grupo C estimulado por ConA. ( $p < 0,05$ ).

As células do timo dos grupos diabéticos apresentaram uma produção muito maior de IL-4 que as células dos grupos controle. Tanto a estimulação por ConA como a suplementação com lecitina de soja não alteraram a produção dessa interleucina, porém o estado diabético reflete um aumento nessa produção. Enquanto as células dos grupos não diabéticos produziram, em média 28 pg/ml de IL-4, as células de animais diabéticos produziram por volta de 95 pg/ml.

### 5.6.3.3 LINFONODO MESENTÉRICO

Assim como no aconteceu com as células dos órgãos anteriores, a produção de IL-4 pelas células do linfonodo mesentérico foi superior nos grupos diabéticos. Enquanto os grupos C e S produziram  $27,52 \pm 3,76$  e  $25,69 \pm 2,25$  pg/ml, respectivamente, os grupos D e DS produziram  $53,30 \pm 8,98$  e  $61,06 \pm$

5,34pg/ml. A estimulação por ConA ou a suplementação não alteraram o padrão de produção de IL-4 (fig. 29).

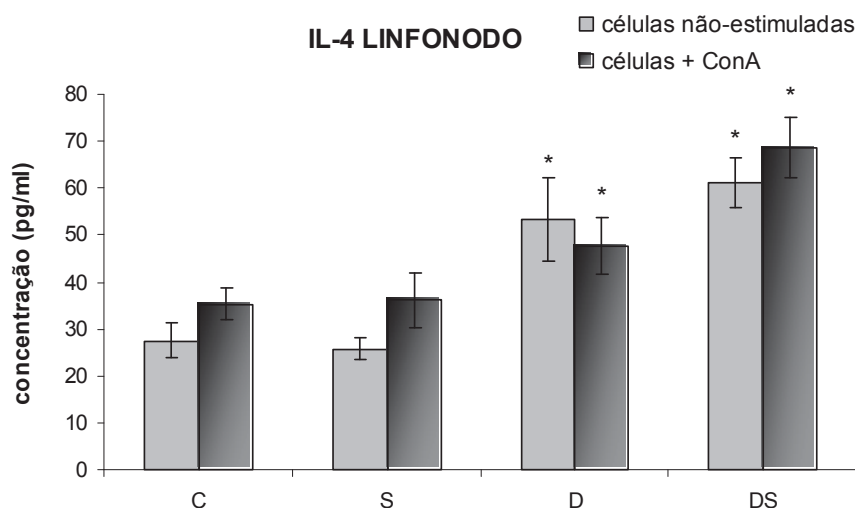


Figura 29: Concentração de IL - 4 dosada a partir do meio de cultura onde os linfócitos do linfonodo mesentérico foram cultivados por 66 horas. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM de no mínimo 3 experimentos diferentes, sendo que a primeira coluna de cada grupo representa a concentração de IL-4 produzida pelas células em condições basais (não-estimuladas por ConA) e a segunda coluna representa a concentração de IL-4 produzida pelas células estimuladas por ConA.\*= diferença estatística em relação aos grupos C e S ( $p < 0,05$ ).

#### 5.6.4 IL-10

##### 5.6.4.1 BAÇO

Diferente do que ocorre com a IL-4, a produção de IL-10 foi alterada pelo cultivo com ConA. As células do baço do grupo C produziram  $882,09 \pm 50,91$  pg/ml de IL-4 e esse valor aumentou para  $1328,37 \pm 52,35$  no grupo C+ConA. Os grupos S ( $499,28 \pm 183,08$  pg/ml) e S+ConA ( $1387,11 \pm 226,99$  pg/ml) produziram uma quantidade similar de IL-10 quando comparados aos grupos C e C+ConA, respectivamente. O grupo D+ConA apresentou um aumento acentuado na

concentração de IL-10, o qual passou de  $665,93 \pm 77,55$  pg/ml no grupo D para  $2298,84 \pm 41,98$  pg/ml. De maneira semelhante, as células do grupo DS produziram  $664,63 \pm 70,53$  pg/ml e quando estimuladas essas células produziram  $2298,84 \pm 41,98$  pg/ml. Observa-se então um aumento da produção dessa interleucina pelos animais diabéticos ( fig.30).

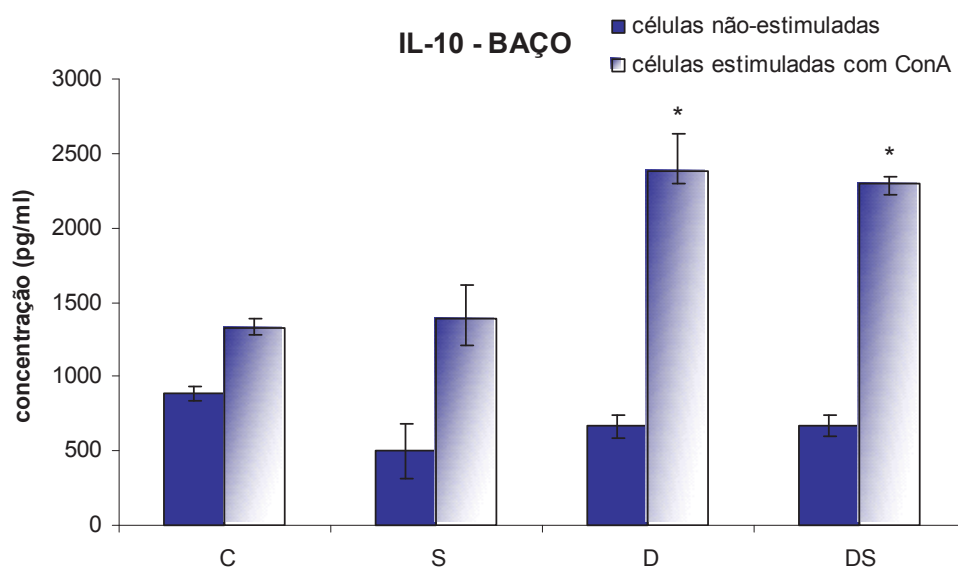


Figura 30: Concentração de IL- 10 dosada a partir do meio de cultura onde os linfócitos do baço foram cultivados por 66 horas. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM de no mínimo 3 experimentos diferentes, sendo que a primeira coluna de cada grupo representa a concentração de IL-10 produzida pelas células em condições basais (não-estimuladas por ConA) e a segunda coluna representa a concentração de IL-10 produzida pelas células estimuladas por ConA.\*= diferença estatística em relação ao grupo C estimulado por ConA. ( $p < 0,05$ ).

## 5.6.4.2 TIMO

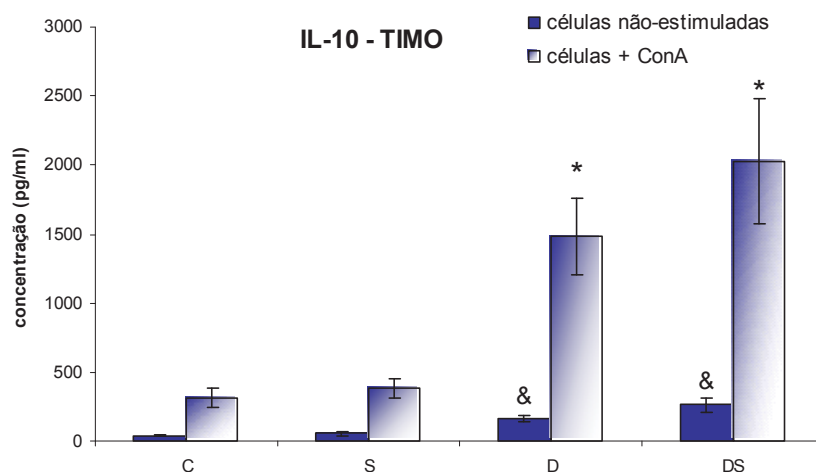


Figura 31: Concentração de IL-10 dosada a partir do meio de cultura onde os linfócitos do timo foram cultivados por 66 horas. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM de no mínimo 3 experimentos diferentes, sendo que a primeira coluna de cada grupo representa a concentração de IL-10 produzida pelas células em condições basais (não-estimuladas por ConA) e a segunda coluna representa a concentração de IL-10 produzida pelas células estimuladas por ConA. \*= diferença estatística em relação ao grupo C estimulado por ConA; &= diferença estatística em relação ao grupo C em condições basais ( $p < 0,05$ ).

Quanto ao timo, observa-se que nos grupos diabéticos a produção basal de IL-10 é superior que a produção das células dos animais não-diabéticos. A estimulação por ConA aumenta a produção de IL-10, sendo esse aumento muito maior também nas células dos animais diabéticos. A produção de IL-10 passou de  $161,80 \pm 23,23$  pg/ml do grupo D para  $1481,45 \pm 276,77$  pg/ml no grupo D+ConA. O mesmo ocorre com células do grupo diabético suplementado, no qual a concentração de IL-10 aumenta de  $264,89 \pm 51,25$  pg/ml no grupo DS para  $2027,56 \pm 451,79$  pg/ml no grupo DS+ConA.

## 5.6.4.3 LINFONODO MESENTÉRICO

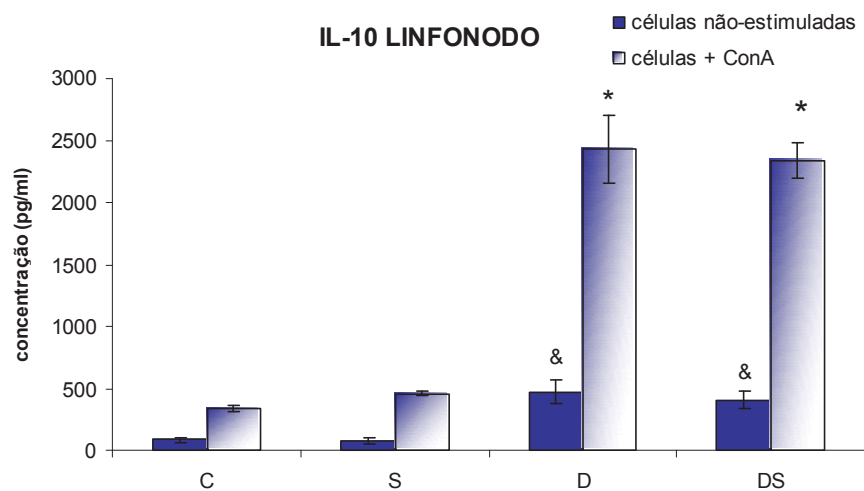


Figura 32: Concentração de IL-10 dosada a partir do meio de cultura onde os linfócitos do linfonodo mesentérico foram cultivados por 66 horas. Resultados expressos como média  $\pm$  EPM de no mínimo 3 experimentos diferentes, sendo que a primeira coluna de cada grupo representa a concentração de IL-10 produzida pelas células em condições basais (não-estimuladas por ConA) e a segunda coluna representa a concentração de IL-10 produzida pelas células estimuladas por ConA. \* = diferença estatística em relação ao grupo C estimulado por ConA, & = diferença estatística em relação ao grupo C em condições basais ( $p < 0,05$ ).

Um resultado similar é observado no linfonodo mesentérico, sendo que a produção basal de IL-10 é superior que a produção das células dos animais não-diabéticos. Os grupos C+ConA e S+ConA apresentaram um leve aumento na produção de IL-10 em relação a seus respectivos grupos não estimulados. Por outro lado, a adição de ConA fez com que a produção de IL-10 aumentasse de  $472,82 \pm 96,12$  pg/ml no grupo D para  $2433,50 \pm 272,46$  pg/ml no grupo D+ConA e de  $361,10 \pm 56,95$  pg/ml no grupo DS para  $2335,73 \pm 138,32$  pg/ml no grupo DS+ConA.



## 5.7 RAZÃO DE CITOCINAS PRODUZIDAS POR CÉLULAS TH1 E TH2

Após a análise da produção de cada citocina independentemente, foi observado de uma maneira conjunta a produção dessas interleucinas por células Th1 e Th2 a fim de demonstrar qual é o padrão de resposta imunitário para o qual os animais estariam direcionados. A tabela abaixo demonstra a concentração de citocinas produzidas por células Th1 e Th2 dos 4 grupos experimentais após estímulo por ConA. A partir desses valores obtém-se uma razão Th1/Th2.

		<b>C</b>	<b>S</b>	<b>D</b>	<b>DS</b>
<b>BAÇO</b>	Th1	2630,92 ± 140,99	2343,80 ± 296,15	1697,36 ± 51,06	1945,13 ± 28,55
	Th2	1367,02 ± 62,80	1761,10 ± 370,60	2673,51 ± 320,88	2365,52 ± 37,88
	<b>Th1/Th2</b>	<b>1,93 ± 0,12</b>	<b>1,40 ± 0,13</b>	<b>0,65 ± 0,05*</b>	<b>0,82 ± 0,01*, #</b>
<b>TIMO</b>	Th1	787,61 ± 21,94	837,90 ± 53,55	1098,75 ± 98,15	1473,41 ± 38,74
	Th2	251,60 ± 8,07	252,65 ± 18,20	1491,59 ± 145,51	1422,14 ± 118,28
	<b>Th1/Th2</b>	<b>3,13 ± 0,02</b>	<b>3,33 ± 0,15</b>	<b>0,77 ± 0,12*</b>	<b>1,06 ± 0,11*, #</b>
<b>LINFO-NODO</b>	Th1	3810,45 ± 89,46	3973,63 ± 33,91	2276,49 ± 8,32	2559,11 ± 39,01
	Th2	335,897 ± 20,470	482,64 ± 12,64	2659 ± 61,91	2462,29 ± 31,13
	<b>Th1/Th2</b>	<b>11,57 ± 1,00</b>	<b>8,25 ± 0,17*</b>	<b>0,86 ± 0,02*</b>	<b>1,04 ± 0,01*, #</b>

Tabela 3 Produção de citocinas por células Th1 ou Th2 dos grupos C, S, D e DS após estímulo por Cona. Os valores estão expressos, em pg/ml, como média ± EPM de pelo menos 3 experimentos. A produção de citocinas por células Th1 foi determinada pela soma da concentração de IL-2 e INF- $\gamma$  e o componente Th2 foi determinado pela soma das concentrações de IL-4 e IL-10. \* = diferença estatística em relação ao grupo C; # = diferença estatística em relação ao grupo D ( $p < 0,05$ ).

A partir desses resultados pôde-se observar que a resposta dos animais diabéticos é voltada para o estímulo de linfócitos Th2. A suplementação de animais não diabéticos não alterou esse perfil. Entretanto, nos animais diabéticos, observa-se um aumento da resposta Th1 quando estes são suplementados.

## 5.8 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

A análise da composição de ácidos graxos do soro e dos diferentes órgãos linfóides estão demonstrados a seguir.

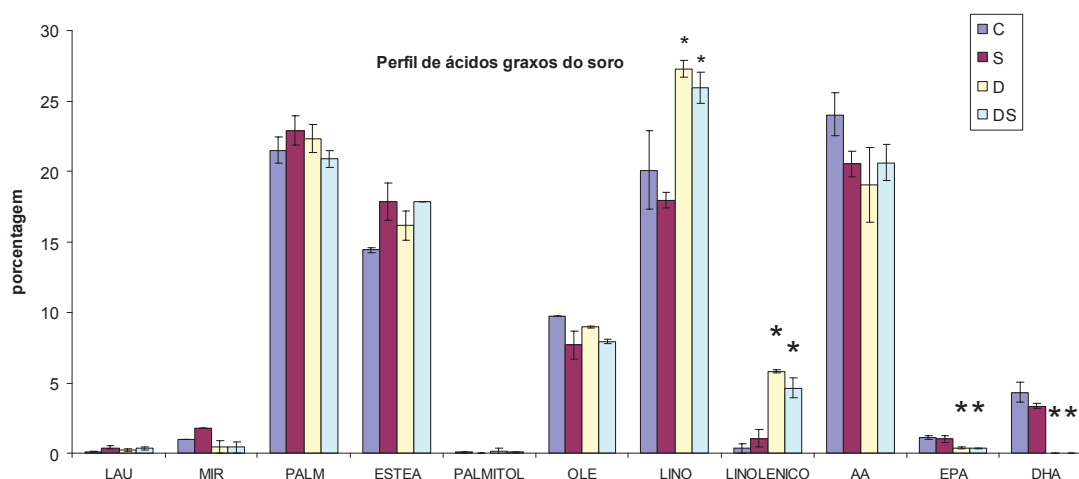


Figura 33: Composição de ácidos graxos do soro dos animais dos grupos C, S, D e DS. Os dados estão expressos como porcentagem em relação ao total de ácidos graxos. Foram analisados os ácidos: LAU: láurico; MIR: mirístico; PALM: palmítico; ESTEA: esteárico; PALMITOL: palmitoléico; OLE: oléico; LINO: linoléico; Linolênico; AA: araquidônico; EPA: eicosapentaenóico; DHA: docosaexaenóico. \* = diferença estatística em relação ao grupo C.

Observa-se que o estado diabético reflete alterações na composição de ácidos graxos do soro. A concentração de ácido linoléico e linolênico é significativamente superior nesses animais enquanto que a concentração de EPA e DHA é diminuída. Por outro lado, nenhuma alteração é observada na composição de ácidos graxos das membranas dos linfócitos. Mesmo entre os linfócitos de origens diferentes não foram observadas diferenças estatísticas quanto ao perfil de ácidos graxos. A figura 34 demonstra a composição média de ácidos graxos desses linfócitos.

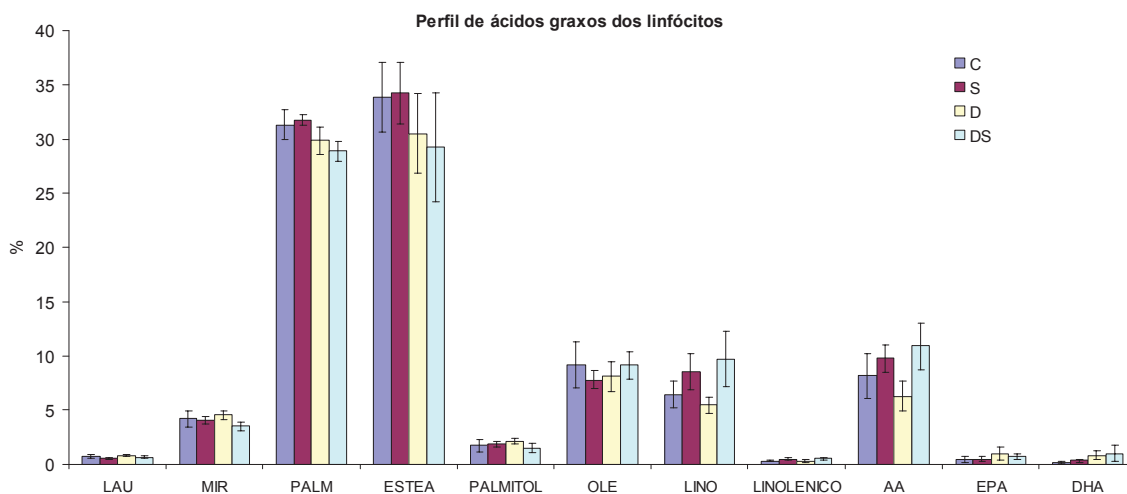


Figura 34: Composição de ácidos graxos das membranas dos linfócitos (representativo dos 3 órgãos linfóides) dos animais dos grupos C,S, D e DS. Os dados estão expressos como  $MEDIA \pm EPM$  da porcentagem em relação ao total de ácidos graxos. Foram analisados os ácidos: LAU: láurico; MIR: mirístico; PALM: palmítico; ESTEA: esteárico; PALMITOL: palmitoléico; OLE: oléico; LINO: linoléico; Linolênico; AA: araquidônico; EPA: eicosapentaenóico; DHA: docosahexaenóico.

## 5.9 DETERMINAÇÕES BIOQUÍMICAS

Pelos resultados de glicose observa-se que os grupos D e DS se mantiveram diabéticos até o 21º dia de tratamento. Enquanto os animais dos grupos C e S apresentaram valores de glicemia de  $121,17 \pm 12,41$  mg/dl e  $128,30 \pm 11,97$  mg/dl, respectivamente, os animais dos grupos D e DS apresentaram glicemias superiores à 300mg/dl. A suplementação dos animais não altera a glicemia dos animais controle, porém reduziu a glicemia dos animais diabéticos. Outro parâmetro elevado nos animais diabéticos é a concentração de triacilgliceróis, o qual não foi alterado significativamente pela suplementação. Já a concentração de HDL foi significativamente menor que dos animais não diabéticos e nos animais diabéticos suplementados a concentração de HDL não é estatisticamente diferente do animal controle, demonstrado uma tendência de elevação. As dosagens de colesterol total e colesterol VLDL foram similares entre todos os grupos.

A tabela abaixo demonstra o resultado das determinações bioquímicas dos animais.

	<b>C</b>	<b>S</b>	<b>D</b>	<b>DS</b>
<b>GLICOSE</b>	121,17 ± 12,41 n=7	128,30 ± 11,97 n=7	409,48 ± 24,63 * n=5	329,01 ± 23,44 * # n=5
<b>TRIACIL-GLICEROL</b>	73,94 ± 6,71 n=8	60,92 ± 8,31 n=8	120,17 ± 16,28 * n=8	137,67 ± 15,67 * n=7
<b>COLESTEROL TOTAL</b>	62,69 ± 4,77 n=6	70,48 ± 0,83 n=9	60,20 ± 2,56 n=11	64,73 ± 3,86 n=12
<b>COLESTEROL HDL</b>	44,81 ± 2,81 n=4	40,91 ± 2,05 n=4	35,78 ± 1,34 * n=10	36,82 ± 2,96 n=10
<b>COLESTEROL LDL</b>	24,70 ± 5,06 n=5	28,74 ± 3,57 n=5	26,66 ± 3,04 n=11	27,09 ± 3,81 n=11
<b>COLESTEROL VLDL</b>	14,79 ± 1,25 n=8	12,18 ± 1,55 n=8	24,03 ± 2,94 n=8	25,79 ± 2,85 n=7

Tabela 4 Resultados das determinações bioquímicas realizados após 21 dias de suplementação dos animais com lecitina de soja. Os dados foram expressos como média ± EPM. Grupo C: grupo Controle; S: Grupo Suplementado; D: Diabético e DS: diabético suplementado. \*= diferença estatística em relação à (C); # = diferença estatística em relação a D.

## 6 DISCUSSÃO

A suplementação da dieta com lecitina de soja é capaz de reduzir a concentração plasmática de colesterol LDL e aumentar a concentração de HDL (MASTELLONE *et al.*, 2000). Esse efeito hipolipidemiante poderia ser útil para a população diabética, cuja dislipidemia está relacionada com complicações cardiovasculares. Entretanto, a adição de lecitina de soja na dieta afeta não só o metabolismo de lipídios, mas pode também trazer alterações em diferentes sistemas do organismo, uma vez que esses lipídios são incorporados às membranas celulares. A funcionalidade das células do sistema imunitário dependem de mudanças na composição lipídica da dieta pela alteração na proporção de diferentes tipos de ácidos graxos, principalmente os ácidos graxos poliinsaturados – PUFA (*polyunsaturated fatty acids*) (CALDER, 2001). Experimentos *in vitro* demonstraram um efeito inibitório da fosfatidilcolina, principal componente da lecitina de soja, sobre a produção de citocinas e capacidade proliferativa de linfócitos (NISHIYAMA *et al.*, 2000). Nos indivíduos diabéticos, as células do sistema imunitário apresentam um comprometimento de suas funções (OTTON *et al.*, 2002; YAMASHIRO *et al.*, 2005) e a suplementação com lecitina de soja sobre as células desses indivíduos poderia modular a atividade dessas células. Baseando-se nesses efeitos *in vitro* da fosfatidilcolina e sabendo-se que os lipídios da dieta são incorporados às membranas dos linfócitos, nosso estudo avaliou a atividade de linfócitos T e B obtidos de animais diabéticos suplementados com lecitina de soja.

Estudos prévios em nosso laboratório demonstraram alterações dose dependentes na função de macrófagos peritoneais e linfócitos do linfonodo mesentérico de animais suplementados com lecitina de soja por apenas 7 dias (MIRANDA, 2005). Apesar dos poucos relatos de suplementação com lecitina de soja na literatura, diferentes estudos utilizaram suplementações de 2 a 8 semanas (LEBLANC *et al.*, 2003; NAVDER, LIEBER, 2002) e as doses normalmente empregadas variaram de 2% (ZINN, 1989) a 20% (LEBLANC *et al.*, 2003) do total da dieta. A dose de 2 g/Kg utilizada nos nossos experimentos corresponde, em média, a um acréscimo de 2% de lipídio ao total da dieta. O tempo de

suplementação de 21 dias e dosagem foram estipulados a fim de se caracterizar um tratamento de curta duração, porém superior a sete dias, e numa dose relativamente baixa. O uso da estreptozotocina como agente diabetogênico não reverte a instalação do quadro de diabetes, como acontece usualmente em experimentos com aloxana. A estreptozotocina é captada pelo transportador de glicose GLUT-2 presente nas células  $\beta$ -pancreáticas e causa alquilação do DNA. Seu metabolismo no interior da célula pancreática gera espécies reativas de oxigênio, o que, em sinergismo com a alquilação, leva a clivagem irreversível do DNA, depleção de ATP e conseqüente inibição da síntese e secreção de insulina (SZKUDELSKI, 2001). Os animais desenvolvem a diabetes do tipo I ou insulino-dependente. A suplementação da dieta desses animais com lecitina de soja não alterou o perfil de ácidos graxos da dieta, uma vez que tanto a lecitina quanto a ração apresentam as mesmas proporções de ácidos graxos, com predomínio de ácido linoléico, seguido de ácido oléico, palmítico, linolênico, esteárico, láurico, palmitoléico, mirístico, e quantidades não-detectadas de ácidos araquidônico, eicosapentaenóico e docosapentaenóico (figs. 3 e 4). Entretanto, a suplementação altera a quantidade de lipídios fornecidos e a classe de lipídios a qual esses ácidos graxos estão esterificados. Na ração, esses ácidos graxos encontram-se esterificados principalmente nas moléculas de glicerol, formando triacilgliceróis. Na lecitina de soja, esses ácidos graxos estão esterificados principalmente em glicerofosfolina.

Ao final do período de suplementação, foi avaliada a atividade metabólica de linfócitos B e T, provenientes dos órgãos linfóides primário (timo) e secundários (baço e linfonodo mesentérico), através da redução do MTT pelas desidrogenases mitocondriais (MOSMANN, 1983). Essas enzimas estão envolvidas na oxidação de Acetil-CoA pelo ciclo de Krebs, e conseqüentemente, refletem o metabolismo energético da célula. Além disso, o ensaio do MTT é utilizado como marcador de viabilidade celular (BERNAS; DOBRUCKI, 2002). Considerando essas informações em conjunto, é possível inferir que o número de células possa interferir neste ensaio (SCUDIERO *et. al.*, 1988; BERNAS, DOBRUCKI, 2002). Assim, embora o mesmo número inicial de células tenha sido empregado para

todos os grupos, em todos os ensaios, o número de células após 66 horas de cultivo foi avaliado em paralelo, por citometria de fluxo. Ou seja, por apresentarem diferenças na capacidade proliferativa (comparação entre os grupos), procedeu-se a associação entre a capacidade de redução do MTT e número de células para se determinar o real estado metabólico da célula. Foram observadas alterações significativas de proliferação e metabolismo em decorrência do estado diabético e pela suplementação. Particularmente nos ensaios de proliferação e de redução do MTT, modificações no metabolismo e número de células não foram observadas quando LPS foi adicionado aos linfócitos do timo devido ao pequeno número de células B presentes nesse órgão (figs. 10 e 19).

A suplementação causou um efeito inibitório sobre a proliferação de linfócitos T de animais diabéticos, observado principalmente nas células do baço e timo (figs 12 e 13). Embora os valores de absorbância no ensaio do MTT tenham sido similares entre todos os grupos (figs. 6, 7 e 8), houve variação no número de células e, com isso, conclui-se que o metabolismo dessas células também foi alterado (tabelas 1 e 2). Células que tiveram uma proliferação elevada, como timo (fig. 13) e linfonodo (fig. 14) dos animais diabéticos, o metabolismo celular após as 66 horas de cultivo está reduzido, uma vez que um número maior de células gerou a mesma concentração de cristais de formazan. Por outro lado, grupos que tiveram uma proliferação inferior (grupo DS do baço) apresentaram um metabolismo dessas enzimas mais elevado. No caso de linfócitos B, foi observado um efeito estimulatório da lecitina sobre a proliferação de células do baço (fig. 17), acompanhada de uma redução na produção do formazan (MTT reduzido) (fig. 9) e inibitório sobre a proliferação de células do linfonodo (fig. 20), porém com uma conversão do MTT semelhante a do grupo controle (fig. 11), demonstrando uma atividade metabólica superior nessas células. Embora possa parecer contraditório, a ativação da proliferação celular não é acompanhada necessariamente por um aumento da conversão do MTT, uma vez que a síntese de DNA e proliferação são eventos independentes da atividade das desidrogenases mitocondriais (GERLIER, THOMASSET, 1986; WANG, ZENG, 2002). Além disso, o ensaio do MTT foi realizado com 66 horas de cultivo e divisão celular é um evento prévio. Como o

MTT é um marcador de viabilidade celular, as células presentes no momento da análise poderiam estar inviáveis, o que só poderia ser confirmado com o auxílio de técnicas adicionais. Com esses dados, pode-se concluir que as alterações observadas quanto à conversão do MTT podem estar relacionadas a modificações no metabolismo tanto quanto alterações na viabilidade celular.

Como mencionado anteriormente, os efeitos da lecitina sobre a proliferação celular foram observados através da citometria de fluxo. Esta técnica permite uma contagem direta do número de células quando estas passam por um feixe de luz, não havendo interferências devido ao estado metabólico (WANG, ZENG, 2002). Além do número de células, é também possível avaliar alterações morfológicas que se refletem como alteração de tamanho e densidade das células (SHAPIRO *et. al.*, 1984; MACEY, 1994). Esses dados em conjunto possibilitam análises mais completas do estado de ativação das células. No grupo S do baço estimulado por LPS, a contagem do número de células foi similar ao grupo C após 66 horas de cultivo (fig. 15), porém foram observadas alterações morfológicas características de ativação celular (fig 17). Essas alterações corroboram com experimentos prévios que demonstram que o pico de proliferação de células B do baço só ocorre após 72 horas de cultivo (fig. 18), demonstrando o efeito estimulatório da suplementação sobre essas células. Assim, em animais não diabéticos a lecitina é capaz de estimular a proliferação de linfócitos B do baço, entretanto, causa efeitos contrários sobre linfócitos B do linfonodo. Em animais diabéticos foram observados apenas efeitos inibitórios da lecitina. Tanto as células T e B do baço apresentaram redução na capacidade proliferativa. As células T do timo e linfonodo dos animais diabéticos apresentaram um aumento na proliferação celular, a qual foi revertida pela suplementação (figs. 7 e 8). No baço, a proliferação dos grupos C, S e D foram semelhantes entre si, mas reduzida no grupo DS (fig. 6).

Um mecanismo pelo qual a lecitina poderia estar alterando a proliferação celular seria pela modulação na síntese de interleucinas. O que se pôde observar é que a produção de interleucinas sofre alterações, tanto pelo estado diabético como pela suplementação da dieta com lecitina de soja. Nos nossos



experimentos, a dosagem de interleucinas revelou um “switch” do balanço Th1/Th2 em favor do Th2 nos três órgãos linfóides dos animais diabéticos (tabela 3). Os animais diabéticos apresentaram uma redução na produção basal de IL-2 e uma produção inferior a dos outros grupos quando essas células foram estimuladas (figs. 21, 22 e 23). Observa-se também uma redução da produção de INF- $\gamma$  pelo baço (fig. 24). Paralelamente houve um aumento significativo na produção de IL-4 e IL-10 pelas células do baço, timo e linfonodo (figs 27 a 32). Esses dados corroboram com autores que indicam que uma das causas da susceptibilidade dos diabéticos a infecções tais como *Mycobacterium tuberculosis* (YAMASHIRO *et al.*, 2005) e *Candida albicans* (MENCACCI *et al.*, 1993), é a redução da produção de citocinas por células Th1 e um aumento pelas células Th2. Mesmo com o aumento da proliferação de linfócitos T do timo e linfonodo, a síntese de IL-2 está prejudicada pelo estado diabético. Embora esses autores não expliquem o porquê desta inibição dos linfócitos Th1, ela pode estar envolvida com diversos fatores. Além da expressão diferenciada de certos genes na ausência da insulina, sinais externos à célula dos animais diabéticos também podem estar modificados. Por exemplo, a alteração hormonal que ocorre nesses indivíduos exerce importantes efeitos no sistema imunitário. Sabe-se que hormônios e citocinas agem tanto no sistema imunitário quanto no sistema endócrino (BESEDOVSKY, del REY, 1996; IGAZ *et al.*, 2000). Indivíduos com diabetes não-controlada apresentam uma regulação do eixo hipotálamo-hipófise alterada, o que culmina, entre outras alterações, numa hipersecreção de glicocorticóides (CHAN *et al.*, 2003). Ao mesmo tempo em que os glicocorticóides inibem a produção de interleucinas pelos linfócitos Th1, eles agem como um potente estimulador da produção de IL-4, interleucina esta que estimula a produção das demais interleucinas por células Th2 (IL-10, IL-5, IL-6, IL-13 etc) (ELENKOV, CHROUSOS, 1999; SMITH, 2003). Esse aumento na síntese de interleucinas 4 e 10 não refletiu em aumento na proliferação dos linfócitos B dos animais diabéticos. De fato, essas interleucinas apresentam um papel mais importante na diferenciação dessas células em plasmócitos e na conversão de isotipo das cadeias pesadas das

imunoglobulinas secretadas do que um papel de proliferação celular (BANCHEREAU, 1995; JALINEK, 2000).

Nos animais diabéticos, o aumento da proliferação de linfócitos T do timo e linfonodo (figs. 13 e 14), acompanhados de um aumento na síntese de INF- $\gamma$  (figs. 25 e 26) podem ser conseqüências do uso da estreptozotocina. Sabe-se que essa droga, dependendo da dose administrada, é capaz de levar ao desenvolvimento de um quadro de diabetes através da ativação de uma resposta auto-imune contra as células  $\beta$ -pancreáticas, envolvendo estimulação de células T (MCEVOY *et al.*, 1987; BUYUKDEVIRIM, 1994; HEROLD *et al.*, 1997; SZKUDELSKI, 2001). Experimentos feitos por OTTON *et al.*, 2002, que mostram que a proliferação de linfócitos de animais diabéticos é reduzida, foram realizados utilizando-se a aloxana, outra droga com efeito diabetogênico, mas que não envolve uma resposta imunitária contra as células  $\beta$ -pancreáticas. Da mesma maneira que ocorreu nos nossos estudos, já foi demonstrado um aumento na produção de INF- $\gamma$  coincidindo com o desenvolvimento da hiperglicemia em animais tratados com doses menores de estreptozotocina (HEROLD *et al.*, 1996; MABLEY *et al.*, 2002), indicando uma correlação dessa interleucina com o desenvolvimento da diabetes. O INF- $\gamma$  é um potente ativador de macrófagos e de maneira bidirecional, os macrófagos ativados estimulam células Th1, como aconteceu no timo e linfonodo. Esse aumento na proliferação de células T e na síntese de INF- $\gamma$  não ocorreu no baço, órgão de onde foram retiradas células aderentes - na sua maioria macrófagos (LOH, HUDSON, 1979; THORVALDSON *et al.*, 2005) - para o cultivo celular, demonstrando um papel importante dessas células no estímulo de proliferação das células do timo e linfonodo. Experimentos feitos por THORVALDSON, HOLSTAD, SANDLER, 2003 sugerem que as células do baço apresentam as mesmas características que as células dos infiltrados do pâncreas dos animais tratados com estreptozotocina. Esses autores observaram um efeito protetor contra o estabelecimento da diabetes por estreptozotocina pela remoção das células aderentes do baço (THORVALDSON *et al.*, 2005). Esses dados em conjunto indicam um possível efeito estimulante da estreptozotocina sobre células T, dependente da participação dos macrófagos. Além disso, com a

baixa produção de IL-2 em cultura (*ex vivo*) pelas células dos animais diabéticos, a proliferação elevada dessas mesmas células poderia ser explicada por uma ativação prévia, *in vivo*. No timo de animais diabéticos, a contagem do número de células, mesmo na ausência de um mitógeno, foi superior que nos grupos controle (fig. 13). Esse mesmo padrão é observado na fig. 19, a qual demonstra que as células do timo de animais diabéticos apresentaram uma pequena proliferação celular, independente do LPS adicionado a essas células.

A suplementação com lecitina de soja não alterou o padrão de citocinas das células Th2, indicando que esse subgrupo de células T não sofreu interferências por essa dieta. Trabalhos *in vitro* já haviam demonstrado que adição de PC não altera a produção de citocinas por células Th2, mas é capaz de modular a capacidade de síntese por células Th1 (NISHIYAMA *et al.*, 2000). Adicionalmente, trabalhos utilizando PUFA demonstram também uma modulação na síntese de IL-2, porém a produção de INF- $\gamma$  não foi alterada pela adição desses ácidos graxos insaturados em cultura (ZEYDA *et al.*, 2003). *In vivo*, a suplementação alterou a produção de IL-2. Houve aumento significativo na produção dessa interleucina no baço e timo de animais diabéticos suplementados. Embora a concentração dessa interleucina tenha aumentado, a razão de citocinas Th1/Th2 nesses órgãos não foi alterada, assim como a proliferação celular não foi aumentada. Por outro lado, no linfonodo, a suplementação não alterou significativamente a produção de IL-2, porém observou-se uma redução na razão Th1/Th2 nos grupos de animais suplementados e um aumento na razão no grupo de animais diabéticos suplementados em relação ao grupo diabético. Nesse mesmo órgão não foram observadas alterações de proliferação das células dos animais suplementados em relação ao respectivo grupo não suplementado. O aumento na concentração de uma interleucina não reflete necessariamente o quadro de ativação celular, sendo necessário observar também a proporção entre as citocinas produzidas por células Th1 e Th2. Além disso, possivelmente a cascata de sinalização intracelular ativada pela ligação de IL-2 a seu receptor esteja sob modulação pela suplementação, resultando na proliferação reduzida de células T observada nos nossos experimentos.

A modulação da cascata de ativação do receptor de IL-2 não é o único mecanismo de regulação que poderia estar sendo influenciado pela lecitina. Quando linfócitos são ativados inicia-se uma complexa cascata de sinalização intracelular, envolvendo diversos segundos mensageiros, proteínas adaptadoras e fatores nucleares que ativam a proliferação celular, síntese de interleucinas, imunoglobulinas e receptores específicos (TRANTAFILOU, TRIANTAFILOU, 2002; ZEYDA *et al.*, 2003; WEIL, ISRAEL, 2004). A adição de lecitina na dieta poderia fornecer substratos, tais como DAG, ácidos graxos livres, ácido fosfatídico, lisofosfatidilcolina etc. (CUI, HOUWELING, 2002) para apenas determinados ramos dessa complexa cascata ou mesmo bloquear ou ativar determinadas enzimas. Quando a célula é ativada, uma onda curta e transiente de geração de DAG ocorre a partir do fosfatidilinositol. Em seguida, uma nova onda e mais prolongada ocorre pela hidrólise de PC através de isoformas de PLC específicas para PC ou através da ativação de PLD e fosfolipases (ISACOV, 1993; REID *et al.*, 1997; CUI, HOUWELING, 2002), levando a uma ativação prolongada da PKC, evento essencial para certas vias de sinalização, entre elas proliferação celular, seja ela ativada pelo complexo TCR/CD3 (REID *et al.*, 1997) ou pelo IL-2R (LU, MORLEY, DURKIN, 1999). De maneira oposta, foram observados efeitos anti-proliferativos nas células B pela geração de DAG a partir de PC (MORENO-GARCIA *et al.*, 2005). O DAG formado a partir de PC, em condições fisiológicas normais, é preferencialmente composto por ácidos graxos saturados (CUI, HOUWELING, 2002), principal tipo de ácido graxo presente nos *rafts* de membrana (WAKELAN, HARNETT, 1998). A geração de DAG contendo ácidos graxos insaturados resulta em metabólitos com uma capacidade de sinalização inferior, ou seja, não ativariam de maneira significativa a PKC (WAKELAN, HARNETT, 1998). Embora a suplementação, nessa dose e tempo de administração, não tenha causado diferenças significativas na composição de ácidos graxos da membrana (fig. 34), alterações na composição desses microdomínios, com um aumento na proporção de ácidos graxos poliinsaturados, poderiam levar um aumento na concentração de DAG contendo ácidos graxos insaturados, com uma atividade reduzida e com isso, apresentar efeitos

antiproliferativos em linfócitos T, porém estimulatórios em linfócitos B. Além disso, a ativação de células Th1 é dependente desses microdomínios, enquanto que a ativação de células Th2 parece ser independente dessas estruturas (YAQOOB, 2003). Assim, células Th2 não respondem a pequenas alterações em microdomínios da membrana e, por isso, as células Th2 não foram alteradas pela suplementação. Entretanto, as células Th1 tiveram a síntese de citocinas modulada, sugerindo alterações na composição de ácidos graxos desses microdomínios.

Entre os diversos substratos formados a partir da PC estão os ácidos graxos insaturados de cadeia longa. A lecitina de soja é rica em fosfatidilcolina esterificada ao ácido linoléico e dietas ricas neste ácido graxo alteram de maneira dose-dependente a proliferação de linfócitos (CALDER, COSTAROSA, CURI, 1995; PETERSON, THIES, CALDER, 1999; MOUSSA *et al.*, 2000b). Estudos *in vitro* têm demonstrado que ácidos graxos poliinsaturados bloqueiam a ativação de JNK e a ativação de NF-AT, resultando em efeitos anti-proliferativos, porém não bloqueiam a atividade do fator NF- $\kappa$ B, importante para a expressão de IL-2 e seu receptor (ZEYDA *et al.*, 2003). A ativação do complexo do receptor IL-2 (IL2R), assim como as vias ativadas pelo receptor TCR/CD3, pode sofrer alterações tanto pelo estado diabético como pela suplementação com lipídios (LU, MORLEY, DURKIN, 1999; ELLERY, NICHOLLS, 2002), fazendo com que a proliferação celular esteja inibida mesmo com o aumento de IL-2. Ácidos graxos livres, como os ácidos linoléico, araquidônico e metabólitos como o ácido 15d-PGJ<sub>2</sub>, principal metabólito da prostaglandina PGD<sub>2</sub>, podem ainda ativar diretamente receptores intracelulares família PPAR (WAHLI, 2002; BISHOP-BAILEY, WRAY, 2003). De maneira geral, a ativação de PPAR resulta num efeito anti-inflamatório/anti-proliferativo (YAQOOB, 2003) e poderia estar contribuindo para os efeitos inibitórios da suplementação sobre a proliferação celular.

Um evento que ocorre paralelamente a ativação de PLC é a ativação de FLA<sub>2</sub>, fosfolipase que libera ácidos araquidônico das membranas, principalmente a partir de moléculas de fosfatidilcolina (ROSHAK *et al.*, 2000; BURGERMEISTER, ENDL, SCHEUER, 2003). Uma das vias metabólicas que segue o ácido linoléico é

a sua conversão em ácido araquidônico pela ação de alongases e  $\Delta 5$  e  $\Delta 6$  desaturases (KELLEY, 2001). Eicosanóides derivados desse ácido graxo, especialmente  $PGE_2$ , apresentam efeitos principalmente inibitórios sobre a proliferação de linfócitos T (CALDER, GRIMBLE, 2002; HARRIS *et al.*, 2002), porém pode apresentar efeitos estimulatórios sobre as células B (HARRIS *et al.*, 2002), sendo um dos mecanismos possíveis que levou a um aumento na proliferação de células B do baço de animais suplementados. Sabe-se que a expressão da enzima ciclooxigenase (COX) é elevada em diversas células dos animais diabéticos, entre elas os macrófagos (FANG, JAING, TOMLINSON, 1997; LI, CHEN, QUILLEY, 2005; LO, 2005), aumentando a produção de prostanoídes. Isso explicaria o efeito inibitório da suplementação principalmente nas células dos animais diabéticos. Além disso, ausência de insulina acarreta em distúrbios na sinalização intracelular. Isso porque a ativação da cascata de sinalização da insulina leva à fosforilação de IRS (*insulin receptor substrate*). Uma via ativada pela fosforilação de IRS é a ativação de proliferação mediada por Ras (WANG *et al.*, 1993; OTTON, MENDONÇA, CURI, 2002), a qual ativa MAPKs da família ERK. Um bloqueio nessa via das ERKs, aliado ao bloqueio causado pelos ácidos graxos poliinsaturados sobre NF-AT, podem ser os responsáveis pelos efeitos inibitórios da lecitina de soja sobre os linfócitos de animais diabéticos.

As células dos animais diabéticos apresentam um desbalanço oxidativo, com um aumento na concentração de moléculas oxidantes. Este quadro, aliado a uma suplementação rica em ácidos graxos poliinsaturados, pode favorecer a peroxidação lipídica das membranas, sendo essa mais uma possível causa de alteração de funcionalidade celular. A oxidação de moléculas de fosfatidilcolina, pode gerar mais um ligante do receptor PPAR- $\gamma$ , chamado de azPC. Foi demonstrado seu efeito na indução de  $COX_2$ , geração de eicosanóides (ZHANG, YOUNG, 2002), os quais, como já descrito, podem apresentar um efeito inibitório sobre a proliferação celular. Por outro lado, outra molécula gerada a partir da oxidação da fosfatidilcolina, chamada de PAF-*like*, induz a produção de IL-12 e outras interleucinas pró-inflamatórias como a IL-2 (FEI *et al.*, 2003). Assim,

existem metabólitos anti e pró-inflamatórios sendo formado a partir da PC devido ao stress oxidativo.

A análise da composição de ácidos graxos do soro revelou um aumento na proporção de ácido linoléico e araquidônico e uma redução na concentração de EPA e DHA (fig. 33). BRENNER, BERNASCONI, GARDA, 2000 haviam demonstrado que a atividade das desaturases  $\Delta$ -5 e  $\Delta$ -6 está inibida no fígado de ratos diabéticos, uma vez que essas enzimas são moduladas pela insulina. Quando atuam sobre o ácido  $\alpha$ -linolênico (18:3), as desaturases geram o ácido eicosapentaenóico - EPA (20:5) e docosahexaenóico - DHA (22:6). A partir do ácido linoléico (18:2), geram principalmente ácido araquidônico (20:4). A inibição dessas enzimas nos animais diabéticos gerou um aumento na concentração dos ácidos graxos precursores no fígado, refletido pelo aumento desses ácidos graxos no perfil do soro e uma redução na concentração de EPA e DHA. A suplementação da dieta não alterou esse perfil de ácidos graxos e não também não houve alterações nas membranas dos linfócitos em decorrência do estado diabético ou devido a suplementação (fig. 34). Embora o tempo de suplementação e a pequena dose utilizada possam ter sido insuficientes para gerar alterações visíveis na totalidade da membrana, microdomínios associados a receptores e enzimas que iniciam a cascata de sinalização intracelular são sensíveis a pequenas alterações na composição, modulando a função celular. A ausência de alterações nas concentrações séricas de lipídios (tabela 4) e na composição de ácidos graxos do soro dos animais suplementados (fig. 33) em relação aos seus respectivos grupos não suplementados suporta a idéia de que as mudanças na funcionalidade das células é decorrente de uma incorporação ou ativação de receptores específicos nos linfócitos e não por alterações na sua concentração plasmática. O aumento na concentração de HDL colesterol, citado por MASTELLONE *et al.*(2000), não foi observado em nosso modelo experimental, uma vez que a espécie animal utilizada, dose e tempo de suplementação da dieta com lecitina de soja não foram os mesmos. Isso ressalta que alterações na funcionalidade dos linfócitos são independentes da concentração plasmática de lipídios. Observa-se também a importância da sub-população de linfócitos



analisada. Linfócitos provindos de órgãos linfóides diferentes apresentam características próprias e são alterados de maneiras diferentes pela suplementação. As diferenças se iniciam pela disponibilidade de lipídios para cada órgão, o que depende não só da quantidade, mas também do tempo de suplementação e que são características essenciais para determinar se a suplementação terá efeitos inibitórios, ativadores ou será inócua para os linfócitos (PETERSON, THIES, CALDER, 1999; KELLEY, 2001.) Além disso, a incorporação de ácidos graxos é diferente entre os órgãos linfóides (GUIMARÃES *et al.* 1995). Mesmo que recebam a mesma concentração de lipídios, a captação de ácidos graxos pelas células é diferente. Foi demonstrada ainda uma expressão diferenciada entre diversos órgãos de certos receptores ligados a proteína G, cujos ligantes são lipídios, tais como a família dos receptores GPR40. Esses receptores, expressos em linfócitos, regulam respostas tissulares às concentrações locais ou sistêmicas de lipídios (BROWN, JUPE, BRISCOE, 2005). Além disso, linfócitos presentes no mesmo órgão, porém comprometidos com diferentes ramos da resposta imunitária, apresentam comportamentos diferentes. Linfócitos T e B e mais que isso, linfócitos Th1 e Th2 apresentam uma expressão gênica diferenciada (THORVALDSON *et al.*, 2005) e sofrem diferentes interferências pela suplementação.

De maneira geral, pode-se concluir que a lecitina de soja suplementada na dieta é capaz de alterar a funcionalidade de linfócitos. Embora tenha ocorrido um aumento de proliferação de linfócitos B nos animais suplementados, a lecitina de soja, nesta dosagem e período de suplementação, apresentou preferencialmente um caráter inibitório sobre células T e B. Além de alterar a proliferação celular, a suplementação modula a produção de interleucinas dos linfócitos Th1, demonstrando que são vários os mecanismos e vias de sinalização alterados pela suplementação. Esse efeito inibitório foi marcante principalmente nos animais diabéticos. Embora esse efeito seja indesejado quanto à prevenção de infecções, a suplementação da dieta com lecitina de soja resultou em sinais clínicos laboratoriais mais brandos de diabetes mellitus, evidenciado pela glicemia de jejum dos animais diabéticos suplementados, a qual foi inferior a dos animais



diabéticos e pela perda de peso dos animais diabéticos, que é muito mais pronunciada que a dos animais diabéticos suplementados. Alguns autores citam um efeito cito-protetor da lecitina de soja sobre as células do pâncreas, reduzindo os efeitos tóxicos da estreptozotocina (LEE, PARK, 2000; LEE *et al.*, 2003), porém não se conhece o efeito da lecitina sobre o tecido pancreático já lesado. No caso da diabetes do tipo I, onde a ativação de certos clones de linfócitos é prejudicial ao organismo, o efeito inibitório da lecitina de soja sobre a proliferação celular também poderia ser um mecanismo capaz de retardar o desenvolvimento do quadro de diabetes.

## 7 CONCLUSÃO

A suplementação de animais diabéticos com lecitina de soja modula a funcionalidade de linfócitos T e B e essas alterações podem ser diferentes dependendo da sub-população de linfócitos analisada (esplenócitos, timócitos ou linfócitos do linfonodo mesentérico). Nos animais diabéticos, foi observado principalmente um efeito inibitório da lecitina sobre a proliferação celular, porém efeitos contrários foram observados em alguns parâmetros em indivíduos normais, ressaltando a importância do estado fisiopatológico do organismo na modulação feita pela fosfatidilcolina sobre o sistema imunitário. Os mecanismos envolvidos ainda não estão elucidados, porém, é possível que alterações em microdomínios de membrana e produção de moléculas bioativas derivadas de lipídios possam estar envolvidos. Embora a lecitina tenha sido capaz de modular a síntese de citocinas dos linfócitos Th1, esse mecanismo não parece estar relacionado com a inibição da proliferação dos linfócitos, uma vez que houve um acréscimo na produção de citocinas pró-inflamatórias, porém as células não foram capazes de responder a esse estímulo. Animais diabéticos, que já apresentam um comprometimento da imunidade celular, poderiam agravar o seu estado de imunodeficiência pelo consumo de lecitina de soja.

## 8 REFERENCIAS

ANTAL-SZALMAS,P. Evaluation of CD14 in host defence. **Eur. J. Clin. Invest.**, 30(2): 167-179, 2000.

BANCHEREAU,J. Converging and diverging properties of humam interleukin-4 and interlukin-10. **Behring Inst Mitt.** 96: 58-77, 1995.

BAZINETA, R.P.; DOUGLAS, H.; MCMILLAN, E.G; WILKIE, B.N.; CUNNANE, S.C. Dietary 18:3-3 influences immune function and tissue fatty acid response to antigens and adjuvant. *Immunology Letters*, v.95, p. 85-90, 2004.

BERNAS, T.; DOBRUSCKI, J. Mitochondrial and Nonmitochondrial Reduction of MTT: Interaction of MTT With TMRE, JC-1, and NAO Mitochondrial Fluorescent Probes. **Cytometry** 47:236–242, 2002.

BESEDOVSKY, H.O.; del REY, A. Immune-neuro-endocrine interactions: facts and hypotheses. **Endocr. Rev.** 17(1): 64-102, 1996.

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

BIONDI-ZOCCAI, G.G.L.; ABBATE, A.A.; LIUZZO, G.; BIASUCCI, L.M. Atherotrombosis, Inflammation and Diabetes. **Journal of the American College of Cardiology**, v.41, n.7, p. 1071-1077, 2003.

BISHOP – BAILEY, D.; WRAY,J. Peroxisome proliferator-activated receptors: a critical review on endogenous pathways for ligand generation. **Prostaglandins & other Lipid Mediators**, 71: 1–22, 2003.

BLOK, W.L, KATAN, M.B, MEER, J.W.M. Modulation of inflammation and cytokine production by dietary (n-3) fatty acids. **J. Nutr.**v.126, p. 1515–1533, 1996.

BRENNER, R.R.; BERNASCONI, A.M.; GARDA, H.A. Effect of experimental diabetes on the fatty acid composition, molecular species of phosphatidylcholine and physical properties of hepatic microsomal membranes. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids.** v..63, n.3, p. 167-176, 2000.

BROWN, W. V.; Lipoprotein disorders in diabetes mellitus. **Med Clin North Am,** v. 78, n1, p. 143-161, 1994.

BROWN, A.J.; JUPE, S.; BRISCOE, C.P. A Family of Fatty Acid Binding Receptors. **DNA and Cell Biology,** 24(1): 54-61, 2005.

BUCHMAN, A. L.; DUBIN, M.; JENDEN, D.; MOUKARZEL, A.; ROCH, M. H.; RICE, K.; GORNBEIN, J.; AMENT, M. E.; ECKHERT, C.D. Lecithin increases plasma free choline and decreases hepatic steatosis in long-term total parenteral nutrition patients. **Gastroenterology,** v. 102, n4, p. 1363-1370, 1992.

BURGERMEISTER, E.; ENDL, J.; SCHEUER, W.V. Activation of cytosolic phospholipase A<sub>2</sub> in human T-lymphocytes involves inhibitor- $\kappa$ B and mitogen-activated protein kinases. **European journal of Pharmacology,** 466: 169 – 180, 2003.

BUYUKDEVIRIM, A.S. Islet pathology in streptozotocin-induced auto-immune diabetic mice: new insights into clinical practice. **Diabetes Metabolism,** 20(2): 87 - 94, 1994.

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

CALDER P. C. Fat Chance in Immunomodulation. **Immunology today**, v. 19, n. 6, p. 244-247, 1998.

CALDER, P.C.; COSTAROSA, L.F.B.P; CURI, R. Effects of feeding lipids of different fatty acids composition upon rat lymphocyte proliferation. **Life Science**, 56: 455 – 463, 1995.

CALDER, P.C. Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and immunity. **Lipids**, 36 (9): 1007-1024, 2001.

CALDER, P.C.; GRIMBLE, R.F. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. **European Journal of Clinical Nutrition**, 3: S14 – S 19, 2002.

CHAN, O.; INOUYE, K.; RIDDEL, MIC.; VRANIC, M.; MATTHEWS, S.G. Diabetes and the hypothalamo-pituitary-adrenal (HPA) axis. **Minerva Endocrinology**, 28(2): 87-102, 2003.

CHANG, H.R.; ARSENIJEVIC, D.; PECHERE, J.C. Dietary supplementation factor. **Immunol. Lett.** v.34, p.13–18, 1992.

CLAMP,A.G.; LADHA,S.; CLARK,D.C.; GRIMBLE,R.F.; LUND,E.K. The influence of dietary lipids on the composition and membrane fluidity of rat hepatocyte plasma membrane. **Lipids**, v.32, p.179-184, 1997.

CLARK, R.B. The role of PPARs in inflammation and immunity. **Leukocyte Biology**, 71: 388-400, 2002.

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

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

DE PABLO M. A. Immune cell functions, lipids and host natural resistance. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 29, p. 323-328, 2000.

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

ELENKOV, I.J.; CHROUSOS, G.P., Stress hormones, Th1/Th2 patterns, pro/anti-inflammatory cytokines and susceptibility to disease. **Trends Endocrinol Metabolism**, 10 (9): 359 – 368, 1999.

ELLERY, J.; NICHOLLS, P. Alternate signalling pathways from the interleukin-2 receptor. **Cytokine & Growth Factor Reviews**: 13: 27–40, 2002.

EASTMAN,S.; MARKHOLST,H.;WILSON,D.; LEMMARK,A. Leukocytosis at the onset of diabetes in crosses of inbred BB rats. **Diabetes research and clinical practice**, v.12, p.113-123, 1991.

FANG,C.; JAING,Z.; TOMLINSON,D.R. Expression of constitutive cyclooxygenase (COX-1) in rats with streptozotocin-induced diabetes; effects of treatment with evening primrose oil or an aldose reductase inhibitor on COX-1 RNA levels. **Prostaglandin Leukot Essent Fatty Acids**, 56 (2): 157 – 163, 1997.

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

FLESCHER, E.; LEDBETTER, J. A.; SCHIEVEN, G. L.; VELA-ROCH, N.; FOSSUM, D.; DANG, H.; OGAWA, N.; TALAL, N. Longitudinal exposure of human T lymphocytes to weak oxidative stress suppresses transmembrane and nuclear signal transduction. **J. Immunol.**, v. 153, p. 4880–4889, 1994.

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

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

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

GERLIER, D., THOMASSET, N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. **J. Immunol. Methods**, 94 (57):1– 2), 1986.

GUIMARÃES, A.R.; KUGA, E.; GLAUZ, E.; RAUCZ, K. Composition of fatty acids in the liver and lymphoid organs of rats fed fatty acid-rich diets. **Biochem Mol. Biol Int.**, 36(2): 45-61, 1995.

GRALER, M.H.; GOETZL, E.J. Lysophospholipids and their G protein-coupled receptors in inflammation and immunity. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1582, p.168– 174, 2002

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

GRIMBLE, R.F., TAPPIA, P.S. The modulatory influence of unsaturated fatty acid on the biology of tumour necrosis factor. **Biochem. Soc. Trans.** v.287, p.282–286, 1995.

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

HARRIS, S.G.; PADILLA, J.; KOUMAS, L.; RAY, D.; PHIPPS, R. Prostaglandins as modulators of immunity, **Trends in Immunology**, 23 (3); 2002.

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

HEROLD, K.C.; VEZYS, V.; SUN, Q.; VIKTORA, D.; SEUNG, E.; REINER, S.; BROWN, D.R. Regulation of cytokine production during development of autoimmune diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin. **Journal of Immunology**, 156: 3521 – 3527, 1996.

HEROLD, K.C.; BAUMANN, E.; VEZYS, V.; BUCKINGHAM, F. Expression and immune response to islet antigens following treatment with low doses of streptozotocin in H-2d mice. **Journal of Autoimmunology**, 10(1): 17 - 25, 1997.



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

IGAZ, P.; FALUS, A. ; GLAUZ, E.; RAUCZ. K. Cytokines in diseases of the endocrine system. **Cell Biology International**, 24 (10): 663-668, 2000.

ISACOV, N. Activation of murine lymphocytes by exogenous Phosphatidylethanolamine - and phosphatidylcholine-specific phospholipase C. **Cell Immunol.** 152(1): 72-81, 1993.

JALINEK, D.F. Regulation of B lymphocyte differentiation. **Ann Allergy Asthma Immunol.** 84(4): 375-385, 2000.

JEFFERY, N.M., YAQOUB, P., NEWSHOLME, E.A., CALDER P.C. The effects of olive oil upon rat serum lipid levels and lymphocyte functions appear to be due to oleic acid. **Ann. Nutr. Metab.**, v.40, p.71-80,1996.

JEFFERY, N.M., SANDERSON,P.; NEWSHOLME, E.A., CALDER P.C. Characteristics of lipid and lymphocytes collected from the lymph of rats fed a low fat diet or high fat diets rich in n-6 or n-3 polyunsaturated fatty acids. **Nutr. Res.**, v.18, p.299-308, 1998.

JOHNSTON, P.V. & MARSHALL, L.A..Dietary fat, prostaglandins and the immune response. **Prog. Food Nutr. Sci.**, New York, v.8, p.3-25, 1984.

JOHNSTON, P.V. Dietary fat, eicosanoids and immunity. **Adv. Lipid Res.**, New York, 1985.

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

KANEL,R.; MILLS, P.J; DIMSDALE,J.E. Short-term hyperglycemia induces lymphopenia and lymphocyte subset redistribution. **Life Sciences**, v.69, p.255-262, 2001.

KELLEY, D.S. Modulation of human immune and inflammatory responses by dietary fatty acids. **Nutrition**: 17: 669-673, 2001.

KUYVENHOVEN,J.P.;MEINDERS,A.E. Oxidative stress and diabetes mellitus – Pathogenesis of long-term complications. **European Journal of Internal Medicine**. v.10, p. 9-19,1999.

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

LEBLANCK, M.J.; BRUNET, S.; BOUCHARD, G.; LAMIREAU, T.; YOUSEF, I.M.; GAVINO, V.; LEVY, E.; TUCHWEBER, B. Effects of dietary soybean lecithin on plasma lipid transport and hepatic cholesterol metabolism in rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 14: 40 – 48, 2003.

LEE, S.H.; PARK, I.S. Effects of soybean diet on the b cells in the streptozotocin treated rats for induction of diabetes. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 47: 1–13, 2000.

LEE, S.H.; HAN, Y.M.; MIN, B.H.; PARK, I.S. Cytoprotective Effects of Polyenoylphosphatidylcholine (PPC) on  $\beta$ -cells during diabetic induction by

Streptozotocin. **The Journal of Histochemistry & Cytochemistry**, 51 (8): 1005–1015, 2003

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

LI,J.; CHEN, Y.J.; QUILLEY, J. Effect of tempol on renal cyclooxygenase expression and activity in experimental diabetes in the rat. **J Pharmacol Exp Ther**, 314 (2): 818 – 824, 2005.

LICASTRO,F. DAVIS, L.J.; MORINI, M.C. Lectins and superantigens: membrane interaction of these compounds with T lymphocytes affect immune responses. **Int. J. Biochem**, 25(6): 845-852, 1993.

LIPINSKI, B. Pathophysiology of oxidative stress in diabetes mellitus. **Journal of Diabets and its complications**. v. 15, p. 203-210, 2001.

LO,C.J. Upregulation of cyclooxygenase-II gene and PGE2 production of peritoneal macrophages in diabetic rats. **Journal of Surgical Research**, 125: 121–127, 2005.

LOH, L.; HUDSON, J.B. Interaction of murine cytomegalovirus with separated populations of spleen cells. **Infect. Immun.**, 26: 853 – 860, 1979.

LU,Y.; MORLEY, P.; DURKIN, J.P. Signalling Events Mediating the Activation of Protein Kinase C by Interleukin-2 in Cytotoxic T Cells. **Cell. Signal.**, 11 (4): 275 - 285, 1999.

MABLEY, J.G.; PACHER, P.; SOUTHAN, G.J.; SALZMAN, A.I.; SZABO, C. nicotine reduces the incidence of type I diabetes in mice. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, 300: 846 – 881, 2002.

MACEY, M.G. Flow cytometry - clinical applications. **Blackwell Scientific Publications**, 310, 1994.

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

MARATHE,G.K.; HARRISON,K.A.; MURPHY R.C.; PRESCOTT,S.M.; ZIMMERMAN,G.A; MCINTYRE,T.M. Bioactive phospholip oxidation products. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 28, n.12, p. 1762–1770, 2000.

MARATHE,G.K.; PRESCOTT,S.M.; ZIMMERMAN,G.A.; MCINTYRE,T.M. Oxidized LDL contains inflammatory PAF-like phospholipids. **Trends Cardiovascular Medicine**, v.11, p. 139-142, 2001.

MARATHE,G.K.;ZIMMERMAN,G.; PRESCOTT,S.M A.; MCINTYRE,T.M. Activation of vascular cells by PAF-like lipids in oxidized LDL. **Vascular Pharmacology**, v.38, p. 193-200, 2002.

MARTINS,E.F.; TORRES,R.P.; MALUF,L.M.P.; MANCINI FILHO,J.; NISHIYAMA,A.; PERES,C.M.; MIYASAKA,C.K. Análise qualitativa e quantitativa de ácidos graxos por cromatografia. In: CURI,R.; POMPÉIA,C.; MIYASAKA,C.K.; PROCOPIO,J. **Entendendo a gordura - os ácidos graxos**. Manole: São Paulo, 2002.

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

MCEVOY, R.C; THOMAS, N.M.; HELLERSTROM, C.; GINSBERG-FELLNER, F.; MORAN, T.M. Multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes in the mouse: further evidence for involvement of an anti-B cell cytotoxic cellular auto-immune response. **Diabetology**, 30 (4): 232 - 238, 1987.

MENCACCI, A., ROMANI,L.; MOSCI, P.; CENCI, E.; TONNETTI, I. VECCHIARELLI,A. BISTONI, F. Low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice. II. Susceptibility to *Candida albicans* infection correlates with the induction of a biased Th2-like antifungal response. **Cellular Immunology**, 150: 36-46, 1993.

MIRANDA, D.T.S.Z. **Suplementação da dieta de ratos diabéticos com lecitina de soja: efeitos sobre funções de células do sistema imunitário e sobre concentrações plasmáticas de lipídios.** Curitiba, 2005. 69 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

MOREL,P.A.; ORISS,T.B. Crossregulation between Th1 and Th2 cells. **Crit Rev Immunol.** v. 18, n. 4, p. 275-303, 1998.

MORENO-GARCIA, M.E.; LÓPEZ-BOJÓRQUES, L.N.; ZENTELLA, A.; HUMPHRIES, L.A.; RAWLINGS, D.J.; SANTOS-ARGUMEDO, L. CD38 Signaling Regulates B Lymphocyte Activation via a Phospholipase C (PLC)- $\gamma$ 2-Independent,

Protein Kinase C, Phosphatidylcholine-PLC, and Phospholipase D-Dependent Signaling Cascade. **The Journal of Immunology**, 174: 2687-2695, 2005.

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

MOUSSA, M.; TKACZUK, J.; RAGAB, J.; GARCIA, J.; ABBAL, M.; OHAYON, E. GHISOLFI, J.; THOUVENOT, J.P. Relationship between the fatty acid composition of rat lymphocytes and immune functions. **British Journal of Nutrition**, 83: 327 – 333, 2000b.

MOUSSA, M.; LE BOUCHER, J.; GARCIA, J.; TKACZUK, J.; RAGAB, J.; DUTOT, G.; OHAYON, E.; GHISOLFI, J.; THOUVENOT, J.P. In vivo effects of oliveoil-based lipid emulsion on lymphocyte activation in rats. **Clinical Nutrition**, v.19, n.1, p. 49-54, 2000a.

NATHAN, D. M.; MEIGS, J.; SINGER, D. E. The epidemiology of cardiovascular disease in type 2 diabetes mellitus: how sweet it is...or is it? **Lancet**, v. 350, p. S14-19, 1997.

NAVDER, K.P.; LIEBER, C.S. Dilinoleoylphosphatidylcholine Is Responsible for the Beneficial Effects of Polyenyolphosphatidylcholine on Ethanol-Induced Mitochondrial Injury in Rats. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 291 (4): 1109-1112, 2002.

NISHIYAMA, A.; CAVAGLIERI, C.R.; CURI, R.; CALDER, P.C. Arachidonic acid-containing phosphatidylcholine inhibits lymphocyte proliferation and decreases interleukin-2 and interferon- $\gamma$  production from concanavalin A –stimulated rat lymphocytes. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1487: 50-60, 2000.

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

OTTON,R.; MENDONÇA, J.R.; CURI, R. Diabetes causes marked changes in lymphocyte metabolism. **Journal of Endocrinology**, 174: 55-61, 2002.

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

OTTON,R.;SORIANO,F.G.;VERLENGIA,R.;CURI,R. Diabetes induces apoptosis in lymphocytes. **Journal of Endocrinology**. v.182, p. 145-156, 2004.

PAHLAVANI, M.A.; HARRIS,M.D. Effect of in vitro generation of oxygen free radicals on t cell function in young and old rats. **Free radical Biology and Medicine**, v.25, n.8, p. 903-913, 1998.

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

PETERSON, L.D.; THIES, F.; CALDER, P.C. Dose-dependent effects of dietary  $\gamma$ -linoleic acid on rat spleen lymphocyte. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, 61(1): 19-24, 1999.

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

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

RAMASAMY,R.; VANNUCCI, S.J.; DU,S.S.; HEROLD,K.; YAN,S.F.; SCHIMIDT, A.M. Advanced glycation end products and RAGE: a common thread in aging, diabetes, neurodegeneration, and inflammation. **Glycobiology**, 15(7): 16R–28R, 2005.

RASHID, S.; WATANABE, T.; SAKAUE, T.; LEWIS, G.F. Mechanisms of HDL lowering in insulin resistant, hypertriglyceridemia states: the combined effect of HDL triglyceride enrichment and elevated hepatic lipase activity. **Clinical Biochemistry**, v. 36, p. 421-429, 2003.

REID, P.A.; GARDNER,S.D.; WILLIAMS, D.M.; HARNETT,M.M. The antigen receptors on mature and immature T lymphocytes are coupled to phosphatidylcholine-specific phospholipase D activation. **Immunology**, 90(2):250-256, 1997.

ROBINSON, D.R.; URAKAZE, M.; HUANG, R. Dietary marine lipids suppress continuous expression of interleukin-1 gene expression. **Lipids**. v. 31, p. S23–31, 1996.

ROSHAK, A.K.; STEVENSON, E.A.; EISCHMAN, C.; MARSHALL, L.A. Human  $Ca^{2+}$ -independent phospholipase  $A_2$  mediates lymphocyte proliferation. **J. Biol Chem.**, 275: 35692 – 35698, 2000.

SCHIMIDT,A.M.; YAN, S.D.; YAN, S.F.; STERN, D.M. The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. **J. Clin. Invest.** 108:949–955, 2001.



SCUDIERO, D.A., SHOEMAKER, R.H.; PAUL, K.D.; MONKS, A.; TIERNEY, S.; NOFZIGER, T.H.; CURRENS, M.J.; SENIFF, D.; BOYD, M.R. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensibility in culture using human and other tumor cell lines. **Cancer Research**, 48: 4827- 4833, 1988.

SHAPIRO, S.Z.; NAESSENS, J.; LIESEGANG, B.; MOLLO, S.K.; MAGONDU, J. Analysis by flow cytometry of DNA syntesis during the life cycle of African trypanosomes. **Acta Trop.** 41(4): 313-323, 1984.

SMITH, L.L. Overtraining, excessive exercise, and altered immunity: Is this a T helper-1 versus T-helper-2 lymphocyte response? **Sports Medicine**, 33 (5): 347 – 364, 2003.

SNOW, E.C.; FELDBUSH, T.L.; OAKS, J.A. The role of insulin in the response of murine T lymphocytes to mitogenic stimulation in vitro. **Journal of Immunology.** v. 44, p. 124:739, 1980.

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

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

STUBBS, C.D.; SMITH, A.D. The modification of mammalian polyunsaturated fatty acid composition in relation to membrane fluidity and function. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 779, p. 89–137,1984.

SZKUDELSKI, T. The mechanism of Alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. **Physiological Research**, 50: 536 - 546, 2001.

TAPPIA, P.S.; GRIMBLE, R.F. Complex modulation of cytokine induction by endotoxin and tumour necrosis factor from peritoneal macrophages of rats by diets containing fats of different saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acid composition. **Clin. Sci.**v. 87, p.173–178, 1994.

THEBAULT,S.; OCHOA-GARAY,J. Characterization of TCR-induced phosphorylation of PKC in primary murine lymphocytes. **Molecular Immunology**, v.40, p.931-942, 2003.

THORVALDSON, L.; HOLSTAD,M.; SANDLER, S. Cytokine release by murine spleen cells following multiple low dose streptozotocin-induced diabetes and treatment with a TNFa transcriptional inhibitor. **International Immunopharmacology**, 3: 1609 – 1617, 2003.

THORVALDSON, L.; JOHANSSON, S.E.; HOGLUND, P.; SANDLER, S. Impact of plastic adhesion in vitro on analysis of Th1 and Th2 cytokines and immune cell distribution from mice with multiple low-dose streptozotocin-induced diabetes. **J. Immunol. Methods**. in press, 2005.

TRANTAFILOU, M.; TRIANTAFILOU, K. Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. **Trends in Immunology**, 23 (6): 2002.

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

WAHLI, W. Peroxisome proliferators-activated receptors (PPARs): from metabolic control to epidermal wound healing, **Swiss Med Wkly**, 132: 83 – 91, 2002.

WAKELAN, M.J.O.; HARNETT, M.M. Phospholipase A2 (EC 3.1.1.4) and D (EC 3.1.4.4) signalling in lymphocytes. **Proceedings of the Nutrition Society**, 57: 551-554, 1998.

WANG, L.M.; MYERS, M.G.; SUN, X.J.; AARONSON, S.A.; WHITE, M.; PIERCE, J.H. IRS-1: Essential for insulin and IL-4 stimulated mitogenesis in hematopoietic cells. **Science**: 261: 1591 – 1594, 1993.

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

WEIL, R.; ISRAEL, A. T-cell-receptor- and B-cell-receptor-mediated activation of NF- $\kappa$ B in lymphocytes. **Current Opinion in Immunology**, 16: 1 -8, 2004.

YAMASHIRO, S.; KAWAKAMI, K.; UEZU, K.; KINJO, T.; MIYAGI, K.; NAKAMURA, K.; SAITO, A. Lower expression of Th1-related cytokines and inducible nitric oxide synthase in mice with streptozotocin-induced diabetes mellitus infected with Mycobacterium tuberculosis. **Clinical and Experimental Immunology**, 139: 57-64, 2005.

YAQOOP, P.; NEWSHOLME, E.A.; CALDER, P.C. The effect of dietary lipid manipulation on rat lymphocyte subsets and proliferation. **Immunology**, v.18, p.603-610, 1994.

YAQOOP, P. Fatty acids as gatekeepers of immune cell regulation. **Trends in Immunology** 24 (12): 639-645, 2003

ZHANG, A.; YOUNG, H.A. PPAR and immune system- what do we know? **International Immunopharmacology**, 2: 1029-1044, 2002.

ZEIZEL, S. H. "Vitamine-like" molecules. Choline. **Modern nutrition in health and disease**, p. 440-452, 1988.

ZEYDA, M.; SZEKERES, A.B.; SAEMANN, M.D.; GEYEREGGER,R.; STOCKINGER,H.; ZIABINGER,G.J.; WALDHAUSL, W.; STUINING,T. Suppression of T cell signaling by polyunsaturated fatty acids: selectivity in inhibition of mitogen-activated protein kinase and nuclear factor activation. **The Journal of Immunology**, 170: 6033-6039, 2003.

ZINN, R.A. Influence of level and source of dietary fat on its comparative feeding value in finishing diets for steers: feedlot cattle growth and performance. **J Anim Sci.**, 64 (4): 1029 – 1037, 1989.