THIAGO MANZONI JACINTHO

**Efeitos de diferentes emulsões lipídicas sobre a
expressão de moléculas de superfície envolvidas no
processo de apresentação de antígenos em células
mononucleares humanas *in vitro***

Dissertação apresentada ao Departamento de
Gastroenterologia da Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Cirurgia do Aparelho
Digestivo

Orientador: Prof. Dr. Dan Linetzky Waitzberg

**São Paulo
2004**

THIAGO MANZONI JACINTHO

**Efeitos de diferentes emulsões lipídicas sobre a
expressão de moléculas de superfície envolvidas no
processo de apresentação de antígenos em células
mononucleares humanas *in vitro***

Dissertação apresentada ao
Departamento de Gastroenterologia
da Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em
Ciências

Área de concentração: Cirurgia do
Aparelho Digestivo

Orientador: Prof Dr. Dan Linetzky
Waitzberg

**São Paulo
2004**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Jacinto, Thiago Manzoni

Efeitos de diferentes emulsões lipídicas sobre a expressão de moléculas de superfície envolvidas no processo de apresentação de antígenos em células mononucleares humanas *in vitro* / Thiago Manzoni Jacinto. -- São Paulo, 2004.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.

Departamento de Gastroenterologia.

Área de concentração: Cirurgia do Aparelho Digestivo.

Orientador: Dan Linetzky Waitzberg.

Descritores: 1.NUTRIÇÃO PARENTERAL/métodos 2.ÁCIDOS GRAXOS/
imunologia 3.LEUCÓCITOS MONONUCLEARES/imunologia
4.APRESENTAÇÃO DO ANTÍGENO/imunologia 5.IN VITRO

USP/FM/SBD-331/04

Trabalho Realizado no Laboratório de Fisiologia e Distúrbios Esfincterianos (LIM 35 – Equipe METANUTRI do Departamento de Gastroenterologia) da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP), em conjunto com o Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical da FMUSP e Seção de Citometria de Fluxo do Serviço de Hematologia do Laboratório Central do Hospital das Clínicas da FMUSP .

Apoio:

FAPESP – Processo número 04/04225-8

Fresenius Kabi do Brasil Ltda

Com AMOR,

Dedico este trabalho a meu pai, Helio Jacintho, minha mãe, Wirleis Manzoni Jacintho ao meu irmão caçula, Lucas Manzoni Jacintho, os meus melhores e eternos amigos.

A Família que sempre me acolhe nos momentos de dificuldades e fraquezas. Aos pais, que dedicaram suas vidas e juventude para dar o melhor aos seus filhos e que, com resignação e coragem, enfrentaram o mundo para ver seus filhos triunfarem na vida.

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Dan L. Waitzberg, a quem aprendi a respeitar e admirar, principalmente por sua honestidade científica, agradeço a confiança e inestimável ajuda que possibilitaram meu ingresso para a vida científica e desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Hiro Goto chefe do grupo de Imunopatologia de Leishmaniose do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropical da FMUSP, que me acolheu em seu laboratório dando-me as condições necessárias para a realização desta pesquisa.

A Dra. Maria Mirtes Sales, responsável pela Seção de Citometria de Fluxo do Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, que além de orientar-me na parte técnica, disponibilizou o citômetro de fluxo e parte dos reagentes que foram decisivos para a realização deste trabalho. .

Aos colegas dos Laboratório de Imunopatologia do Instituto de Medicina Tropical da FMUSP que em muitos momentos, em resposta à amizade sincera, não hesitaram em ajudar à ultrapassar os obstáculos que, em muitos momentos, persistiram em meu caminho.

Às colegas da equipe METANUTRI Graziela , Letícia, Cláudia, Elaine, Carol, Liliam, Patrícia, Renata e Amanda agradeço pela ajuda, amizade e pelo agradável convívio do dia-a-dia.

Ao Prof. Dr. Isaac Castro, por sua fundamental orientação nas análises estatísticas, possibilitando a conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Joaquim Gama-Rodrigues, por ter dado a oportunidade de matricular-me como aluno não médico no Depto de Gastroenterologia e garantir as condições para o desenvolvimento desta dissertação.

À Bióloga-chefe da Equipe Metanutri, Profa. Ms. Raquel M.M. Torrinhas que além da amizade consolidada nesses quatro anos de trabalho, agradeço por todo o conhecimento que adquiri em minha estada na equipe METANUTRI, graças à sua imensa competência, paciência e dedicação, que aprendi a admirar e pretendo tomar como exemplo para minha carreira.

Deixo um agradecimento especial para Camila Garcia Marques pela ajuda no desenvolvimento prático e teórico desta pesquisa e que trocou os cinemas e jantares dos sábados à noite por pilhas de livros e artigos científicos, pelo ombro amigo nos momentos difíceis, pela compreensão, atenção, amizade, carinho e amor que foram em muitos momentos, decisivos para manter-me firme em minha caminhada. Não foi fácil mas, aqui, está o fruto do nosso trabalho!

Agradeço o Hemocentro do Hospital das Clínicas de São Paulo (Fundação Pró-Sangue) e seus funcionários, pela disposição em colaborar nas coletas das amostras de sangue, que possibilitaram um bom andamento para esta pesquisa.

.

Não poderia me esquecer de agradecer aos amigos que, com muita gentileza, atenderam aos meus apelos e doaram o fluído fundamental para a vida. Muito obrigado a todos que doaram sangue para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos Josias Muniz da Silva, Humberto Luiz Kunert, Ronaldo dos Santos, Alessandro Daniel, João Aparício Silva, Carlos Eduardo Arem, Diego Rosa da Silva, Jéferson Oliveira, Alexandre Tranquesi, Everaldo Matos Pereira.

À Fresenius Kabi do Brasil, pelo auxílio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

À FAPESP pelo apoio financeiro, garantindo o bom andamento de nossas investigações.

A Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e todos os seus funcionários, com muito carinho, agradeço a oportunidade e as condições, que foram fundamentais para a concretização deste sonho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS

RESUMO

ABSTRACT

1.0 INTRODUÇÃO.....	01
1.1 Considerações sobre o sistema imune – processo de apresentação de antígenos.....	02
1.2 Considerações sobre as emulsões lipídicas.....	04
1.3 Implicações imunológicas das emulsões lipídicas.....	05
1.4 Racional do estudo.....	08
2.0 OBJETIVOS.....	11
2.1 Objetivos.....	12
3.0 MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1 Protocolo experimental.....	14
3.2 Aspectos éticos.....	15
3.3 Obtenção de células mononucleares.....	16
3.4 Emulsões lipídicas.....	17
3.5 Grupos experimentais.....	20
3.6 Cultura para estudar a expressão das moléculas HLA-DR, CD80 e CD86 e na superfície de monócitos/macrófagos humanos.....	21

3.7 Cultura para estudar a expressão das moléculas CD28 e CD152 na superfície de linfócitos T auxiliares humanos.....	22
3.8 Recuperação dos monócitos/macrófagos da placa de cultura e imunofenotipagem.....	25
3.9 Recuperação dos linfócitos da placa de cultura e imunofenotipagem.....	26
3.10 Leitura por citometria de fluxo da fluorescência dos marcadores de moléculas CD28 e CD152, presentes na superfície de linfócitos T auxiliares e moléculas HLA-DR, CD80 e CD86, presentes na superfície de monócitos/macrófagos humanos.....	27
3.11 Análise estatística.....	30
4.0 RESULTADOS.....	31
4.1 Efeito da incubação de Linfócitos T auxiliares com diferentes emulsões lipídicas.....	32
4.1.1 Expressão de moléculas CD28 na superfície de linfócitos T auxiliares humanos - Porcentagem de Fluorescência.....	32
4.1.2 Expressão de moléculas CD28 na superfície de linfócitos T auxiliares humanos - Intensidade de Fluorescência.....	34
4.1.3 Expressão de moléculas CD152 na superfície de linfócitos T auxiliares humanos - Porcentagem de Fluorescência.....	36

4.1.4 Expressão de moléculas CD152 na superfície de linfócitos T auxiliares humanos - Intensidade de Fluorescência.....	38
4.2 Efeitos de diferentes EL sobre a expressão de moléculas de superfície em monócitos/macrófagos humanos.....	40
4.2.1 Expressão de moléculas HLA-DR na superfície de monócitos/macrófagos humanos - Porcentagem de Fluorescência.....	40
4.2.2 Expressão de moléculas HLA-DR na superfície de monócitos/macrófagos humanos - Intensidade de Fluorescência.....	42
4.2.3 Expressão de moléculas CD80 na superfície de monócitos/macrófagos humanos - Porcentagem de Fluorescência.....	44
4.2.4 Expressão de moléculas CD80 na superfície de monócitos/macrófagos humanos - Intensidade de Fluorescência.....	46
4.2.5 Expressão de moléculas CD86 na superfície de monócitos/macrófagos humanos - Porcentagem de Fluorescência.....	48

4.2.6 Expressão de moléculas CD86 na superfície de monócitos/macrófagos humanos - Intensidade de Fluorescência.....	50
4.3 Resumo dos resultados.....	52
5.0 DISCUSSÃO.....	54
6.0 CONCLUSÕES.....	67
7.0 ANEXOS.....	69
8.0 REFERÊNCIAS.....	82

Lista de Abreviaturas

NP	Nutrição Parenteral
EL	Emulsões lipídicas parenterais
AG	Ácidos graxos
AGPI	Ácidos graxos poliinsaturados
AGSCM	Ácidos graxos saturados de cadeia média
AGMI	Ácidos graxos monoinsaturados
AGS	Ácidos graxos saturados
TCL	Triglicérides de cadeia longa
TCM	Triglicérides de cadeia média
n-6	Ômega-6
n-3	Ômega-3
SI	Sistema imunológico
RI	Resposta imunológica
APC	“Antigen Presenting Cells” = Células apresentadoras de antígenos
MO/MØ	Monócitos/macrófagos
LØ CD4	Linfócito T auxiliar
MHC II	“Major Histocompatibility Complex class II” = Complexo principal de histocompatibilidade classe II
TCR	“T cell Receptor” = Receptor de células T
INF-gama	Interferon-gama
TNF-alfa	“Tumor necrosis factor alpha” = Fator de necrose tumoral-alfa
PHA	“Phytohemagglutinin” = Fitohemaglutinina

Jacinto TM. Efeitos de diferentes emulsões lipídicas sobre a expressão de moléculas de superfície envolvidas no processo de apresentação de antígenos em células mononucleares humanas in vitro [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2004. 98p.

Resumo

Moléculas HLA-DR e co-estimulatórias tem papel central na função imune de leucócitos. Diferentes emulsões lipídicas (EL) podem alterar funções imunes de leucócitos.

Para avaliar os efeitos de diferentes EL sobre a expressão de moléculas HLA-DR, CD80 e CD86 presentes na superfície de monócitos/macrófagos (MO/MØ) e CD28 e CD152 presentes na superfície de linfócitos T auxiliares (LØ CD4) humanos, células mononucleares do sangue periférico de voluntários saudáveis (n=10) foram separadas com uso de Ficoll Hypaque (d=1,007) e incubadas por 48 horas (MO/MØ) e 72 horas (LØ) em meio RPMI 1640 acrescidas ou não (controle negativo) de diferentes EL comerciais ou misturas experimentais na concentração de 1mg/mL.

De acordo com o tipo da emulsão lipídica adicionada ao meio de cultura, as células foram divididas em seis grupos experimentais: **a)** Controle negativo – células mononucleares cultivadas sem o acréscimo de EL **b)** TCLn-6 – células mononucleares cultivadas com EL a base de óleo de soja rica em ácidos graxos poliinsaturados tipo n-6 (AGPI n-6), **c)** TCLn-6/TCLn-3 – células mononucleares cultivadas com mistura experimental contendo 80% da EL a base de óleo de soja e 20% de EL a base de óleo de peixe rica em AGPI tipo n-3, **d)** TCM/TCLn-

6 – células mononucleares cultivadas com EL composta por 50% óleo de coco, rico em triglicérides de cadeia média e 50% de óleo de soja, **e)** TCM/TCLn-3 – células mononucleares cultivadas com mistura experimental contendo 80% de EL composta por 50% óleo de coco e 50% de óleo de soja e 20% de EL a base de óleo de peixe, **f)** SMOF – células mononucleares cultivadas com a nova EL contendo 30% de óleo de soja, 30% de triglicérides de cadeia média, 25% de óleo de oliva e 15% de óleo de peixe.

As células mononucleares foram ativadas pelo uso de 10µg/mL de fitohemaglutinina. A expressão das moléculas de superfície foi analisada por citometria de fluxo.

A porcentagem de fluorescência, que indica o número de células expressando as moléculas em estudo e a intensidade de fluorescência, que indica de forma indireta o número de moléculas expressas por células, foram medidas. Os resultados obtidos foram submetidos à teste estatístico Friedman e pós-teste Student-Newman-Keuls, adotando-se nível de significância de $p < 0,05$.

Devido às diferenças na expressão basal dos doadores, os resultados de intensidade de fluorescência foram transformados em porcentagem relativa ao controle basal (Basal=100).

Nos grupos TCLn-6, TCLn-6/TCLn-3, TCM/TCLn-6, TCM/TCLn-3 e SMOF, a intensidade de fluorescência de moléculas HLA-DR expressas na superfície de monócitos/macrófagos diminuiu (medianas = 87,6; 84,0; 81,0; 85,0 e 80,0 respectivamente) em relação ao controle negativo (CN) (mediana=100,0)

p=0,01. Todos os grupos tratados com EL aumentaram o número de linfócitos T auxiliares expressando moléculas CD28 (medianas = 90,9; 90,4; 91,5; 92,6 e 90,1 respectivamente) em relação ao CN (mediana=82,8) p=0,001 e também o número de moléculas CD152 expressas por células na superfície de linfócitos T auxiliares (medianas = 120,6; 108,8; 127,7; 114,6 e 121,3 respectivamente) em relação ao CN (mediana=100,0), p=0,03. Não foram encontradas diferenças estatísticas na expressão de moléculas CD80 e CD86 na superfície de monócitos/macrófagos cultivados com diferentes EL. Ainda não foram encontradas diferenças no número de linfócitos T auxiliares expressando CD152. Finalmente a expressão por células de moléculas CD28 na superfície de linfócitos T auxiliares também não mostrou alteração significativa com as diferentes emulsões lipídicas.

Conclusão: Emulsões lipídicas parenterais *in vitro*, diminuem a expressão de moléculas HLA-DR na superfície de monócitos/macrófagos e aumentam a expressão de moléculas CD28 e CD152 na superfície de linfócitos T auxiliares humanos. Estas alterações podem ser um dos mecanismos pelos quais as EL modulam funções de células imunes.

Descritores: Nutrição parenteral, ácidos graxos, leucócitos mononucleares, apresentação de antígeno, *in vitro*.

Jacintho TM. Effects of different lipid emulsions on surface molecules expression involved in antigen presentation process on human mononuclear cells in vitro [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2004. 98p.

Abstract

HLA-DR and co-stimulatory molecules play a central role on leucocytes immune function. Different lipid emulsions (LE) may change leucocytes immune function. It is of interest to study the effect of different LE on HLA-DR and co-stimulatory molecules expression.

To access the effect of LE on the HLA-DR, CD80 and CD86 expression on monocytes/macrophages (MO/MØ) surface and CD28 and CD152 (CD80/CD86 co-stimulatory molecules receptor) expression on human T helper lymphocytes (LØ CD4) surface we obtained mononuclear cells from peripheral blood of healthy volunteers (n=10) by using ficoll hypaque (d=1.077).

The cells were cultured for 48 hours (MOMØ) and 72 hours (LØ CD4) and incubated with RPMI 1640 medium without (negative control) or added with 1mg/mL of commercial or experimental mixtures of five LE.

Groups: **a)** NC – negative control without LE, **b)** LCTn-6 – n-6 polyunsaturated fatty acids (PUFA) rich LE (soybean oil), **c)** LCTFO – 80% of LCT and 20% of n-3 PUFA rich LE (FO) (fish oil), **d)** MCT/LCT - LE containing 50% of medium chain triglycerides and 50% of n-6 PUFA rich LE, **e)** MCT/LCTFO – 80% of MCT/LCT LE and 20% of FO LE and **f)** SMOF - a new

LE containing 30% of soybean oil, 30% of medium chain triglycerides, 25% of olive oil and 15% of fish oil.

Mononuclear cells were activated by using 10 μ g/mL of phytohemagglutinin. Surface molecules expression was measured by flow cytometry. Percentage and intensity of fluorescence were recorded and the data were submitted to Friedman statistical test and Student-Newman-Keuls post test ($p < 0,05$). Due the differences in basal expression between donors, prior to statistical tests, data from intensity of fluorescence were transformed of percentage relative of basal expression (where basal=100).

All LE groups LCT, LCTFO, MCT/LCT, MCT/LCTFO and SMOF decreased HLA-DR intensity of fluorescence on monocytes/macrophages (mean= 87.6, 84.0, 81.0, 85.0, and 80.0 respectively) in relation to negative control (NC) (mean=100.0) cultured without LE ($p=0,01$). All LE groups increased the percentage of lymphocytes expressing CD28 (means=90.9, 90.4, 91.5, 92.6 and 90.1 respectively) in relation to control (mean=82.8) $p=0,001$ and CD152 intensity of fluorescence on lymphocytes cultured with all different LE (mean=120,6; 108,8; 127,7; 114,6 and 121,3 respectively) in relation to NC (mean=100,0), $p=0,03$. No significant differences were found on CD80 and CD86 expression on monocytes/macrophages surface, CD28 intensity of fluorescence and the percentage of lymphocytes expressing CD152 on lymphocytes cultured with the different studied LE.

Conclusion: *In vitro* parenteral LE decreased HLA-DR expression on human monocytes/macrophages surface and increase co-stimulatory molecules receptor expression on human lymphocytes surface. These changes could be one of the mechanisms of LE modulation of immune cells functions.

Keywords: Parenteral nutrition, Fatty acids, mononuclear leukocytes, antigen presenting, *in vitro*.

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações sobre o sistema imune - processo de apresentação de antígenos

O sistema imunológico (SI) é responsável por reações que culminam na defesa do nosso organismo. O ponto chave para o desencadeamento de uma resposta imunológica (RI) adequada é o processo de apresentação de antígenos.

O processo de apresentação de antígeno inicia-se pela fagocitose de um antígeno, que é processado por monócitos/macrófagos e outras células apresentadoras de antígenos ("Antigen presenting cells" APC). Este antígeno, associado a moléculas do complexo principal de histocompatibilidade classe II ("Major Histocompatibility Complex class II = MHC II), é expresso na superfície celular, para ser reconhecido pelos linfócitos T auxiliares, por meio do receptor de células T ("T Cell Receptor" = TCR) (Applenan et al, 2003; Granucci et al, 2003).

No entanto, para ativar os linfócitos T auxiliares não basta apenas a associação da molécula MHC II com o TCR. Para se ter uma ativação efetiva da resposta imune, é preciso um segundo sinal deflagrado pela associação de moléculas co-estimulatórias presentes na superfície de APC, com seus receptores linfocitários (Fleischer et al, 1996; Perrin et al, 1997; Greenfield et al, 1998; Grose et al, 2001,). Sem este sinal, o sistema imune não é ativado

eficientemente, podendo desenvolver um estado de tolerância imunológica ou resultando em morte celular (Slavik et al, 1999).

Moléculas B7-1 e B7-2 (CD80 e CD86) são co-estimuladoras potentes, expressas na superfície de monócitos/macrófagos e outras APC, que interagem com os receptores CD28 e seu homólogo CD152 (CTLA-4), presentes na superfície de linfócitos T CD4 (auxiliares) e CD8 (citotóxicos) (Robey et al, 1995; Vanderborre et al, 1999; Maccoy et al, 1999; Sanson et al, 2000; Omari et al, 2001).

A interação entre as moléculas CD80/CD86 com o receptor CD28 desencadeia sinais no interior dos linfócitos que promovem a ativação de fatores de transcrição, como por exemplo, NFkB (fator nuclear kappa B) (Zhou et al, 2002). Uma vez ativado, o NFkB migra para o núcleo, onde ativa genes de citocinas pró-inflamatórias como a IL-2, IL-4, interferon gama (INF- γ), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) (Unanue et al, 1989; Robey et al, 1995; Fleischer et al, 1996; Genç et al, 1997; De Franco et al, 1998; Walunas et al, 1998; McCoy, 1999; Vanderborre et al, 1999). Quando liberadas essas citocinas desencadeiam diferentes efeitos sobre outros elementos do sistema imunológico, incluindo aumento de proliferação de algumas populações leucocitárias, alteração na permeabilidade endotelial e as quimiotáticas, atraindo células do sistema imunológico para o local da infecção. A combinação desses efeitos corresponde à inflamação (Philpott et al, 2004).

Atuando em conjunto com os mecanismos de ativação da resposta imune, existem mecanismos regulatórios que impedem que a ativação seja exagerada. Esses mecanismos incluem a produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-4 e IL-10 e também a expressão de proteínas de superfície como, por exemplo, a molécula CD152. Após ativação dos Linfócitos T auxiliares, as moléculas CD152 passam a ser expressas na superfície destas células, competindo com as moléculas CD28 pela ligação com CD80/CD86. A interação entre moléculas CD80/CD86 com o ligante CD152 limita a ativação de linfócitos T auxiliares, impedindo o desenvolvimento de uma resposta imune exarcebada (Unanue et al, 1989; Robey et al, 1995; Fleischer et al, 1996; Genç et al, 1997; De Franco et al, 1998; Walunas et al, 1998; McCoy, 1999; Vanderborre et al, 1999).

1.2 Considerações sobre as emulsões lipídicas

Emulsões lipídicas são utilizadas como fontes de ácidos graxos essenciais e energia em pacientes que fazem uso de nutrição parenteral (MacFie, 1999). Elas são constituídas por triglicérides envoltos por camadas estabilizadoras de fosfatídeos de ovo que seguem, após infusão endovenosa, via metabólica semelhante à de quilomícrons resultantes da digestão e absorção da gordura ingerida por via oral (Calder et al, 2002).

Os triglicérides ofertados pelas emulsões lipídicas podem ser compostos por diferentes tipos de ácidos graxos que, após infusão endovenosa, podem ser

incorporados por membranas celulares de células do sistema imunológico, alterar sua fluidez e influenciar suas funções (Martin-peña et al, 2002; Waitzberg et al, 2002).

1.3 Implicações imunológicas das emulsões lipídicas

Emulsões lipídicas disponíveis para uso parenteral, têm sido composta em geral, por triglicérides contendo ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa (AGPI) ou mistura física destes associados a triglicérides compostos por ácidos graxos saturados de cadeia média (AGSCM). As referidas emulsões lipídicas podem alterar funções de células imunoefetoras, provavelmente pela incorporação de AGPI na membrana celular, com modificação de suas características funcionais, estruturais e participação na síntese de eicosanóides (Carpentier et al, 1997; Lotierzo et al, 1998; Waitzberg et al, 2002).

Atualmente, existe uma tendência em evitar o uso de emulsão lipídica parenteral rica em AGPI tipo n-6 em pacientes imuno-comprometidos ou em risco de imunossupressão (Campos et al, 2002). Isso porque, experimentalmente e em estudos clínicos, AGPI tipo n-6 podem inibir certas funções de linfócitos, neutrófilos e macrófagos, prejudicar funções do sistema reticuloendotelial e diminuir o clareamento plasmático de lípidos (Nordenstrom et al, 1979; Hamawy et al, 1985; Sobrado et al, 1985; Jensen et al, 1990; Sedman et al, 1990; Waitzberg et al, 1992; Cukier et al, 1999).

Ácidos graxos poliinsaturados tipo n-6 podem ainda aumentar a intensidade da resposta inflamatória em determinadas condições clínicas conforme exemplificado por estudo em pacientes com sepse, que mostrou aumento da secreção de citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8, durante a oferta de EL rica em AGPI n-6 (Mayer et al, 2003).

As alterações descritas parecem não prejudicar a evolução de pacientes estáveis recebendo emulsão lipídica parenteral rica em AGPI tipo n-6, entretanto, poderiam agravar a condição clínica de pacientes com comprometimento da resposta imunológica (Freeman et al, 1990; Waitzberg et al, 1997). Neste sentido, existe a preocupação clínica em ter disponível emulsão lipídica com efeito imunológico neutro ou com menor impacto nas respostas imune e inflamatória.

Emulsões lipídicas contendo 50% de ácidos graxos saturados de cadeia média (AGSCM) e 50% de AGPI tipo n-6, passaram a ser empregadas alternativamente em doentes críticos com nutrição parenteral. Seu perfil bioquímico e menor quantidade de AGPI n-6, podem oferecer algumas vantagens para pacientes com comprometimento da resposta imune (Ulrich et al, 1996; Bach et al, 1998).

Experimentalmente, emulsão lipídica contendo AGSCM inibiu quimiotaxia e atividades bactericidas de células polimorfonucleares (Waitzberg et al, 1994; Waitzberg et al, 1996). Em estudos *in vitro*, a mesma emulsão lipídica diminuiu

quimiotaxia, capacidade bactericida, fagocitose, produção de peróxidos de hidrogênio, explosão respiratória e expressão de integrinas β_2 , de células polimorfonucleares de doadores saudáveis (Bellinati-Pires et al, 1992; Bellinati-Pires et al, 1993; Heine et al, 1999; Wanten et al, 1999; Wanten et al, 2000).

Apesar das evidências experimentais mostrarem que o uso de emulsão lipídica composta por mistura física de AGSCM e AGPI tipo n-6 (1:1) altera funções de células polimorfonucleares, esta emulsão lipídica parece não modular funções linfocitárias e produção de citocinas envolvidas no processo inflamatório (Gogos et al, 1990; Sedman et al, 1991; Gogos et al, 1994; Gelas et al, 1998).

Está disponível entre nós, para uso clínico parenteral, uma emulsão lipídica à base de óleo de peixe, rica em ácidos graxos poliinsaturados tipo n-3. A suplementação com AGPI tipo n-3 pode ter efeito benéfico durante o estágio inicial de sepse, doenças inflamatórias, como artrite e doenças inflamatórias intestinais, além de inibir a produção de citocinas pró-inflamatórias séricas e teciduais, como IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e TNF- α (Pomposelli et al, 1990; Barton et al, 1991; Muakkassa et al, 1991; Ikehata et al, 1992; Pscheidl et al, 1992; Cooper et al, 1993; Grimminger et al, 1993; Johnson et al, 1993; Koch et al, 1993; Van der Heide et al, 1993; Daly et al, 1995; Gennari et al, 1995; Inui et al, 1996a; 1996b; Alexander, 1998; Hayashi et al, 1998; Tashiro et al, 1998; Bertevello et al, 2003; Campos et al, 2002; Campos et al, 2003; Mayer et al, 2003;). Dessa maneira, o uso de emulsão lipídica a base de óleo de peixe para

uso clínico, poderia representar uma alternativa para auxiliar o tratamento de pacientes em condições inflamatórias exageradas (Carpentier et al, 2000; Calder et al, 2002;).

Entendendo que a alimentação oferece diferentes ácidos graxos oriundos de várias fontes nutricionais, foi recentemente desenvolvida na Europa, uma nova emulsão lipídica para uso parenteral contendo 30% de óleo de soja (rico em AGPI tipo n-6), 30% de triglicérides de cadeia média, 25% de óleo de oliva (rico em AGMI tipo n-9) e 15% de óleo de peixe (rico em AGPI tipo n-3). Existe ainda pouca experiência clínica com a nova emulsão lipídica e poucos relatos de sua influência sobre o sistema imunológico.

1.4 Racional do estudo

Os ácidos graxos exercem efeitos moduladores sobre funções da resposta imunológica. Em estudo experimental, monócitos do sangue periférico humano tratados com ácidos graxos poliinsaturados tipo n-3 (AGPI n-3), tiveram menor capacidade de apresentar antígenos. Esse achado foi associado a uma menor expressão de moléculas do MHC classe II na superfície dessas células. (Hughes et al, 2000)

Em estudos de cultura de células mononucleares anteriormente desenvolvidos em nosso laboratório (LIM-35), (Torrinhas et al, 2003) a incubação com emulsão lipídica à base de óleo de peixe, não alterou a

expressão de moléculas apresentadoras de antígenos HLA-DR (MHC classe II) na superfície de monócitos/macrófagos humanos não ativados ou previamente ativados com Interferon-gama ($\text{INF-}\gamma$). No entanto, quando o agente ativador ($\text{INF-}\gamma$) foi adicionado juntamente com a emulsão lipídica à base de óleo de peixe, houve uma menor expressão de moléculas HLA-DR, sugerindo que essa emulsão lipídica impediu a ativação dos monócitos/macrófagos. (Torrinhas et al, 2003)

Para que ocorra uma efetiva ativação da resposta imune celular, é necessário o primeiro sinal, promovido pela apresentação de antígeno, a interação de moléculas co-estimulatórias com seus receptores, e a produção de citocinas que comandarão a resposta imunológica (Sandstrom et al, 2003; Buono et al, 2004). Alterações em qualquer uma dessas vias de sinalização podem modificar funções específicas da resposta imunológica, tornando-a mais ou menos eficiente (Appleman et al, 2003). Considerando-se que emulsões lipídicas podem influenciar todas as três etapas descritas, seu papel na modulação da resposta imunológica poderia ter repercussões clínicas, particularmente em pacientes críticos sob nutrição parenteral e uso de emulsão lipídica.

Até o presente momento, não existem estudos avaliando os efeitos de emulsões lipídicas sobre a expressão de moléculas co-estimulatórias em monócitos/macrófagos e seus receptores linfocitários. Deste modo, é interesse da presente pesquisa avaliar os efeitos de diferentes emulsões lipídicas para

uso parenteral, sobre a expressão de moléculas envolvidas no processo de apresentação de antígenos presentes na superfície de monócitos/macrófagos e linfócitos humanos.

2.0 OBJETIVOS

2.1. Objetivos

Avaliar os efeitos *in vitro* de diferentes emulsões lipídicas parenterais com composições diferentes de ácidos graxos sobre a expressão de moléculas envolvidas no processo de apresentação de antígenos do tipo CD28 e CD152, presentes na superfície de linfócitos T auxiliares e moléculas HLA-DR, CD80 e CD86 presentes na superfície de monócitos/macrófagos humanos.

3.0 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Protocolo experimental

Para avaliar a influência de emulsões lipídicas parenterais sobre a expressão de moléculas envolvidas no processo de apresentação de antígenos, células mononucleares do sangue periférico de doadores voluntários saudáveis (n=10) foram cultivadas com diferentes emulsões lipídicas em quantidades e tempos pré-determinados. As células foram marcadas com anticorpos monoclonais específicos para estudar a expressão das moléculas de superfície CD28/CD152 em linfócitos T auxiliares e moléculas HLA-DR (MHC classe II), CD80 e CD86 em monócitos/macrófagos por citometria de fluxo.

3.2 Aspectos éticos

O protocolo da presente pesquisa, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, apresentados e aprovados pelo Departamento de Gastroenterologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, foram aprovados em 11 de junho de 2003 pela Comissão de Ética da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (anexo 1).

Os doadores foram esclarecidos sobre o protocolo de pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo 2).

3.3 Obtenção de células mononucleares

Amostras de sangue periférico (40 mL) foram obtidas de doadores voluntários saudáveis do sexo masculino (n=10), com idade entre 20 e 40 anos, com tubos para coleta a vácuo (Beckton & Dickson) heparinizados. Os doadores foram selecionados após análise das informações colhidas pelo preenchimento de ficha de inclusão (anexo 3). Foram inclusos no projeto apenas os doadores com respostas negativas para todas as perguntas nela presentes.

Em fluxo laminar, as amostras de sangue foram diluídas em solução fisiológica (Baxter) na proporção de 1:1 e a solução foi adicionada sobre gradiente de Ficoll Hypaque (Histopaque 1077, Sigma - EUA), na proporção de 3:1. As amostras foram centrifugadas na velocidade de 1500 rpm, a 12°C e durante 20 minutos.

As nuvens de células mononucleares obtidas foram coletadas com pipetas Pasteur e centrifugadas três vezes em meio RPMI 1640 (Gibco-EUA) contendo 2mmol/L de L-glutamina, 25mM/L de solução de Hepes, 0,07mM/L de gentamicina e 1×10^5 U/L de penicilina (RPMI simples), na velocidade de 1200 rpm e durante 10 minutos a 4°C. Após a última lavagem, as células foram ressuspensas em meio RPMI simples acrescido de 10% de soro fetal bovino inativado por calor (RPMI completo 10%).

As células obtidas pela separação por gradiente de Ficoll Hypaque, foram submetidas a teste de viabilidade pela exclusão de azul Tripán (“Tripán Blue”, Sigma-EUA) (Hughes et al, 1997). Foram colocadas em cultura, amostras com viabilidade celular superior a 95%.

3.4 Emulsões Lipídicas

Foram utilizadas diferentes emulsões lipídicas fornecidas pela Fresenius-Kabi® Brasil, que estão descritas abaixo e suas respectivas composições encontram-se na tabela 1.

- **Lipovenos® LCT 20%** (Fresenius-Kabi®, Bad-Homburg - Germany) – Emulsão lipídica à base de óleo de soja, rica em ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa tipo n-6 (AGPI n-6).
- **Lipovenos® MCT 20%** (Fresenius-Kabi®, Bad-Homburg - Germany) - Emulsão lipídica à base de mistura de óleo de côco e óleo de soja, contendo 50% de triglicérides de cadeia média (TCM) e 50% de AGPI n-6 (TCM/TCL n-6) - 1:1 vol./vol.
- **Omegaven® 10%** (Fresenius-Kabi®, Bad-Homburg - Germany) - Emulsão lipídica à base de óleo de peixe, rica em ácidos graxos poliinsaturados de cadeia longa tipo n-3 (AGPI n-3).

- **SMOF® 20%** (Fresenius-Kabi®, Bad-Homburg - Germany) - Emulsão lipídica contendo mistura de 30% de óleo de soja, 30% de triglicérides de cadeia média, 15% de óleo de peixe e 25% de óleo de oliva.

TABELA 1: COMPOSIÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS DAS EMULSÕES LIPÍDICAS DISPONÍVEIS COMERCIALMENTE PARA USO CLÍNICO UTILIZADAS NO PRESENTE ESTUDO.

Composição	Lipovenos® LCT 20%*	Lipovenos® MCT 20%*	Omegaven® 10%**	SMOF® 20% *
Óleo	200	200	100	200
Fosfatidio de ovo	12	12	12	12
Glicerol	25	25	25	25
Tocoferol (Vitamina E)	0,1	0,1	0,2	0,1
Água	1000	1000	1000	1000
Ácidos Graxos				
Capróico (C6:0)	-	0,35	-	0,35
Caprílico (C8:0)	-	60,0	-	37
Cáprico (C10:0)	-	33,8	-	17
Láurico (C12:0)	-	0,43	-	0,5
Mirístico (C14:0)	0,19	0,13	4,7	0,06
Palmítico (C16:0)	23,5	13,0	10,6	17,3
Palmitinoléico (C16:1)	-	0,27	8,6	2,82
Esteárico (C18:0)	8,02	5,2	2,1	5,587
Oléico (C18:1 w-9)	46,9	24,9	14,3	55
Linoléico (C18:2 w-6)	104,1	52,4	3,3	41
Octadecatetraenoico (C18:4 w-3)	-	-	3,8	-
Araquidônico (C20:4 w-6)	-	0,43	2,6	0,76
alfa-linolênico (C18:3 w-3)	13,47	7,5	1,2	-
Eicosapentaenóico (C20:5w-3)	-	-	20,6	3
Docosapentaenóico (C22:5w-3)	-	-	2,4	0,747
Docosahexaenóico (C22:6w-3)	-	-	15,8	4

* Valores expressos em g/L para emulsões lipídicas 20%.

** Valores expressos em g/L para emulsões lipídicas 10%.

3.5 Grupos experimentais

De acordo com o tipo de emulsão lipídica adicionada ao meio de cultura, as células foram divididas em seis grupos experimentais, conforme descrito abaixo:

Controle Negativo: Cultivo sem emulsão lipídica

TCLn-6: Cultivo com emulsão lipídica Lipovenos® LCT 20%

TCLn-6/TCLn-3: Cultivo com mistura experimental contendo 80% de emulsão lipídica Lipovenos® LCT 20% enriquecida com 20% de emulsão lipídica Omegaven® 10%.

TCM/TCLn-6: Cultivo com emulsão lipídica Lipovenos® TCM 20%.

TCM/TCLn-3: Cultivo com mistura experimental contendo 80% de emulsão lipídica Lipovenos® TCM 20% enriquecida com 20% de emulsão lipídica Omegaven® 10%.

SMOF: Cultivo com emulsão lipídica SMOF® 20%.

3.6 Cultura para estudar a expressão das moléculas HLA-DR, CD80 e CD86 na superfície de monócitos/macrófagos humanos

Em placas de cultura de 24 poços (Costar-EUA), 2×10^6 células mononucleares com viabilidade superior a 95% foram incubadas por 48 horas, em atmosfera úmida, com 5% de CO₂ a 37°C, em 2 ml de meio de cultura RPMI 1640 (Gibco-EUA) acrescido de 10% de soro fetal bovino (Gibco-EUA) inativado pelo calor, 2mmol/L de L-glutamina, 25mM/L de solução de Hepes, 0,07mM/L de gentamicina, 1×10^5 U/L de penicilina. Tendo em vista que moléculas CD80 presentes na superfície de monócitos/macrófagos são expressas somente em células ativadas, as culturas foram realizadas na presença de 10µg/ml de fitohemaglutinina ("Phytohemagglutinin" = PHA) (Sigma-EUA) e das diferentes emulsões lipídicas compondo-se os seis grupos experimentais em estudo, acrescidas na concentração de 1mg/ml, conforme esquematizado na figura 1.

3.7 Cultura para estudar a expressão das moléculas CD28 e CD152 na superfície de linfócitos T auxiliares humanos

Em placas de cultura de 24 poços (Costar-EUA), 2×10^6 células mononucleares com viabilidade superior a 95% foram incubadas por 72 horas, em atmosfera úmida, com 5% de CO₂ a 37°C, em 2 ml de meio de cultura RPMI 1640 (Gibco-EUA) acrescido de 10% de soro fetal bovino (Gibco-EUA) inativado pelo calor, 2mmol/L de L-glutamina, 25mM/L de solução de Hepes, 0,07mM/L de gentamicina, 1×10^5 U/L de penicilina. Tendo em vista que moléculas CD152 presentes na superfície de linfócitos T auxiliares são expressas somente em células ativadas, as culturas foram realizadas na presença de 10µg/ml de fitohemaglutinina ("Phytohemagglutinin" = PHA) (Sigma-EUA) e das diferentes emulsões lipídicas compondo-se os seis grupos experimentais em estudo, acrescidas na concentração de 1mg/ml, conforme esquematizado na figura 1.

FIGURA 01: Esquema da placa de cultura utilizada para estudar os efeitos de diferentes emulsões lipídicas sobre a expressão de moléculas envolvidas no processo de apresentação de antígenos

Grupos experimentais e disposição na placa de cultura

Poço 01= Controle Negativo (CN) - Células mononucleares cultivadas sem acréscimo de emulsão lipídica e ativadas por PHA (10µg/ml).

Poço 02= Controle Negativo (CN) - Células mononucleares cultivadas sem acréscimo de emulsão lipídica e ativadas por PHA (10µg/ml).

Poço 03= TCLn-6 - Células mononucleares cultivadas com acréscimo de emulsão lipídica Lipovenos® LCT 20% (1mg/mL) e ativadas por PHA (10µg/ml).

Poço 04= TCLn-6/TCLn-3 - Células mononucleares cultivadas com acréscimo de emulsão lipídica experimental contendo 80% de EL Lipovenos® LCT 20% enriquecida com 20% de emulsão lipídica Omegaven® 10% (1mg/mL) e ativadas por PHA (10µg/ml).

Poço 05= TCM/TCLn-6 - Células mononucleares cultivadas com acréscimo de emulsão lipídica Lipovenos® MCT 20% (1mg/mL) e ativadas por PHA (10µg/ml).

Poço 06= TCM/TCLn-3 - Células mononucleares cultivadas com acréscimo de emulsão lipídica experimental contendo 80% de emulsão lipídica Lipovenos® MCT 20% enriquecida com 20% de EL Omegaven® 10% (1mg/mL) e ativadas por PHA (10µg/ml).

Poço 07= SMOF - Células mononucleares cultivadas com acréscimo de emulsão lipídica SMOF® 20% (1mg/mL) e ativadas por PHA (10µg/ml).

OBS: As diferentes emulsões lipídicas em estudo foram testadas no mesmo doador, para cada experimento (n=10).

3.8 Recuperação dos monócitos/macrófagos da placa de cultura e imunofenotipagem

Após 48 horas de cultura, as células foram transferidas para tubos de citometria de fluxo (Becton & Dickinson-EUA), previamente identificados. Em seguida, foram acrescentados 900 μ L de EDTA em cada poço da placa de cultura que permaneceu reagindo durante 15 minutos em câmara fria, para descolar os monócitos/macrófagos aderidos ao fundo da placa.

As células mononucleares colhidas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato ("Phosphate buffered saline" = PBS) duas vezes sendo centrifugadas (centrífuga Epeendorf 5804R-Alemanha) durante 10 minutos, à velocidade de 1200 rpm e temperatura de 4°C. Uma alíquota de cada tubo foi submetida a teste de viabilidade pela exclusão de azul Tripán ("Tripán Blue", Sigma-EUA) (Hughes et al, 2000). Foram consideradas viáveis para o estudo apenas amostras com viabilidade celular superior a 80%.

Após verificar a viabilidade, 1×10^6 células mononucleares por mL, foram submetidas a imunofenotipagem direta, feita pela adição de anticorpos monoclonais específicos para moléculas de superfície de monócitos/macrófagos (anexo 4), permanecendo em reação durante 15 minutos, no escuro, e em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas uma vez com PBS sendo centrifugadas, durante 10 minutos,

temperatura de 4° C e velocidade de 1200 rpm e fixadas em paraformol aldeído 2%, para posterior análise em citometria de fluxo.

3.9 Recuperação dos linfócitos da placa de cultura e imunofenotipagem

Após 72 horas de cultura, as células mononucleares foram transferidas para tubos de citometria de fluxo (Becton & Dickinson-EUA), previamente identificados.

As células mononucleares colhidas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato ("Phosphate buffered saline" = PBS) duas vezes sendo centrifugadas (centrífuga Ependorf 5804R-Alemanha), durante 10 minutos, à velocidade de 1200 rpm e temperatura de 4°C. Uma alíquota de cada tubo foi submetida a teste de viabilidade pela exclusão de azul Tripán ("Tripán Blue", Sigma-EUA) (Hughes et al, 2000). Foram consideradas viáveis para estudo apenas amostras com viabilidade celular superior a 80%.

Após verificar a viabilidade celular, 1×10^6 células mononucleares por mL, foram submetidas a imunofenotipagem direta, feita pela adição de anticorpos monoclonais específicos para moléculas de superfície de linfócitos (anexo 4). As amostras celulares permaneceram reagindo por 15 minutos no escuro sob temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas uma vez com PBS sendo centrifugadas, durante 10 minutos, na temperatura de 4° C e

velocidade de 1200 rpm e fixadas em paraformol aldeído 2%, para posterior análise em citometria de fluxo.

3.10 Leitura por citometria de fluxo da fluorescência dos marcadores de moléculas CD28 e CD152, presentes na superfície de linfócitos T auxiliares e moléculas HLA-DR, CD80 e CD86, presentes na superfície de monócitos/macrófagos humanos

O citômetro de fluxo (FACSCALIBUR, Becton & Dickson-EUA) da Seção de Citometria de Fluxo da Divisão de Laboratório Central do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo foi calibrado diariamente, com o programa FACSCOMP nele instalado, utilizando-se esferas de calibração (Calibrate™ 3, Becton & Dickson-EUA). Seu feixe de laser de 488nm foi utilizado para excitar simultaneamente os fluorocromos (FITC, PE, Cy-Chrome e APC) dos anticorpos monoclonais utilizados na presente pesquisa.

A incidência de feixe de luz do citômetro no ângulo de 90° em cada célula das amostras forneceu, de acordo com a refração de seus raios, os parâmetros morfológicos das células referentes a seu tamanho e complexidade interna. O programa Cell Quest, instalado no aparelho, recebeu os referidos dados e os representou em gráficos, distribuindo dessa maneira, as células em diferentes populações.

Devido à permanência das amostras celulares em cultura na presença de mitógeno (PHA), tornou-se inviável a discriminação das diferentes populações de células mononucleares apenas por seus parâmetros morfológicos, havendo a necessidade de se empregar marcadores específicos para monócitos/macrófagos e linfócitos.

Desta forma, para analisar a expressão das moléculas HLA-DR, CD80 e CD86 na superfície de monócitos/macrófagos humanos, foi determinada uma janela com a utilização de anticorpo monoclonal anti CD14 conforme demonstrado na figura 02.

Figura 02 – Janela feita para isolar a população de monócitos/macrófagos humanos, positivos para o anticorpo monoclonal anti-CD14 (R1), cultivados durante 48 horas, ativados com PHA e estimulados com diferentes emulsões lipídicas. A expressão das moléculas HLA-DR, CD80 e CD86 foi analisada na população delimitada em R1.

Da mesma forma, para analisar a expressão das moléculas CD28 e CD152 presentes na superfície de linfócito T auxiliares, foi determinada uma janela com a utilização de anticorpos monoclonais anti-CD3 e anti-CD4 (anexo 04), conforme demonstrado na figura 03

Figura 03 – Janela feita para isolar a população de linfócitos T auxiliares humanos, positivos para os anticorpos monoclonais anti-CD3 e anti-CD4 (R2), cultivados durante 72 horas, ativados com PHA e estimulados com diferentes emulsões lipídicas. A expressão das moléculas CD28 e CD152 foi analisada na população delimitada em R2.

A leitura da porcentagem de fluorescência que determina a porcentagem de monócitos/macrófagos e linfócitos humanos exprimindo as moléculas de superfície em estudo e a intensidade de fluorescência dessas moléculas, que determina de forma indireta, a quantidade de moléculas expressas por célula na população foram analisadas em dez mil eventos de cada amostra.

Para o controle de ligações inespecíficas dos anticorpos monoclonais, foram utilizados controles isotípicos (anexo 04).

3.11 Análise Estatística

Considerando as diferenças na expressão das amostras em estudo entre os distintos doadores, os dados referentes à intensidade de fluorescência foram convertidos em porcentagem relativa à expressão basal (onde basal = 100). Os dados obtidos da intensidade de fluorescência, após conversão e porcentagem de fluorescência, foram submetidos à análise estatística por teste de Friedman e pós-teste de Student Newman Keuls, sendo consideradas diferenças significantes aquelas que apresentaram $p \leq 0,05$.

4.0 RESULTADOS

4.1 Efeito da incubação de linfócitos T auxiliares com diferentes emulsões lipídicas

4.1.1 Expressão de moléculas CD28 na superfície de linfócitos T auxiliares humanos - Porcentagem de Fluorescência.

O número percentual de linfócitos T auxiliares (CD4+) expressando CD28 aumentou na presença de todas as emulsões lipídicas parenterais e misturas experimentais em estudo (TCL n-6, TCL n-6/TCL n-3, TCM/TCLn-6, TCM/TCL n-3 e SMOF), em relação ao grupo controle sem acréscimo das emulsões lipídicas (EL) ($p=0,001$). Os resultados obtidos pelo efeito das diferentes emulsões lipídicas sobre o número percentual de linfócitos humanos exprimindo moléculas CD28 estão na tabela 02 e figura 04.

Porcentagem de Fluorescência CD28						
Grupos	CN	TCLn-6	TCLn-6/TCLn-3	TCM/TCLn-6	TCM/TCLn-3	SMOF
Mediana	82,8	90,9*	90,4*	91,5*	92,6*	90,1*
25%-75%	81,3-88,6	81-94,1	83,3-92,5	85,1-94,4	82,3-95,6	85,6-94,7

Tabela 02 – Número percentual de linfócitos T auxiliares humanos cultivados com diferentes emulsões lipídicas exprimindo moléculas CD28 (Dados expressos em mediana e 25-75 percentis). *EL vs CN $p < 0,05$ (Teste de Friedman e pós-teste de Student Newman Keuls). $n=10$.

Figura 04 – Número percentual de linfócitos T auxiliares humanos cultivados com diferentes emulsões lipídicas exprimindo moléculas CD28 (Dados expressos em mediana e 25-75 percentis). *EL vs CN $p < 0,05$ (Teste de Friedman e pós-teste de Student Newman Keuls). $n=10$.

4.1.2 Expressão de moléculas CD28 na superfície de linfócitos T auxiliares humanos - Intensidade de Fluorescência.

Não foram encontradas diferenças estatísticas na expressão por célula de moléculas CD28 na superfície de linfócitos T auxiliares humanos incubados na presença das diferentes emulsões lipídicas (EL) em estudo (TCL n-6, TCL n-6/TCL n-3, TCM/TCLn-6, TCM/TCL n-3 e SMOF), em relação ao controle e entre os grupos experimentais ($p=0,450$). Os resultados obtidos pelo efeito das diferentes EL sobre a expressão por célula de moléculas CD28 estão na Tabela 03 e figura 05.

Intensidade de Fluorescência CD28						
Grupos	CN	TCLn-6	TCLn-6/TCLn-3	TCM/TCLn-6	TCM/TCLn-3	SMOF
Mediana	100	91,5	97,3	94,9	96,9	95,2
25%-75%	100-100	85,9-102,2	92,2-101,4	89,1-101,3	92,9-103,8	89,1-99

Tabela 03 – Expressão por célula de moléculas CD28 na superfície de linfócitos T auxiliares humanos cultivados com diferentes emulsões lipídicas (Dados expressos em mediana e 25-75 percentis). **Diferenças não significantes** - EL vs CN $p > 0,05$ (Teste de Friedman e pós-teste de Student Newman Keuls). $n=10$.

Figura 05 – Expressão por célula de moléculas CD28 na superfície de linfócitos T auxiliares humanos cultivados com diferentes emulsões lipídicas (Dados expressos em mediana e 25-75 percentis). **Diferenças não significantes** - EL vs CN $p > 0,05$ (Teste de Friedman e pós-teste de Student Newman Keuls). $n=10$.

4.1.3 Expressão de moléculas CD152 na superfície de linfócitos T auxiliares humanos - Porcentagem de Fluorescência

Não foram encontradas diferenças estatísticas no número percentual de linfócitos T auxiliares incubados com diferentes emulsões lipídicas (EL) em estudo (TCL n-6, TCL n-6/TCL n-3, TCM/TCLn-6, TCM/TCL n-3 e SMOF) exprimindo moléculas CD152, em relação ao controle e entre os experimentais ($p=0,608$). Os resultados obtidos pelo efeito das diferentes EL sobre o número percentual de linfócitos T auxiliares exprimindo moléculas CD152 estão na tabela 04 e figura 06.

Porcentagem de Fluorescência CD152						
Grupos	CN	TCLn-6	TCLn-6/TCLn-3	TCM/TCLn-6	TCM/TCLn-3	SMOF
Mediana	54,4	52,9	55,4	61,3	61,3	54,4
25%-75%	50,4-77,6	46,1-70,2	49,7-67,3	50,1-76,2	53,5-75,3	48,3-76,9

Tabela 04 - Número percentual de linfócitos T auxiliares humanos cultivados com diferentes emulsões lipídicas exprimindo moléculas CD152 (Dados expressos em mediana e 25-75 percentis). **Diferença não significativa** - EL vs CN $p>0,05$ (Teste de Friedman e pós-teste de Student Newman Keuls). $n=10$.

Figura 06 - Número percentual de linfócitos T auxiliares humanos cultivados com diferentes emulsões lipídicas exprimindo moléculas CD152 (Dados expressos em mediana e 25-75 percentis). **Diferença não significativa** - EL vs CN $p>0,05$ (Teste de Friedman e pós-teste de Student Newman Keuls). $n=10$.

4.1.4 Expressão de moléculas CD152 na superfície de linfócitos T auxiliares humanos - Intensidade de Fluorescência.

A expressão por célula de moléculas CD152 expressas na superfície de linfócitos T auxiliares humanos aumentou em todos os grupos tratados com as diferentes emulsões lipídicas (EL) (TCL n-6, TCL n-6/TCL n-3, TCM/TCLn-6, TCM/TCL n-3 e LMOP), em relação ao controle não tratado com EL ($p=0,03$). Os resultados obtidos pelo efeito das diferentes EL sobre a expressão por célula de moléculas CD152 estão na tabela 05 e figura 07.

Intensidade de Fluorescência CD152						
Grupos	CN	TCLn-6	TCLn-6/TCLn-3	MCT	MCT/TCLn-3	LMOP
Mediana	100	120,6*	108,8*	127,7*	114,6*	121,3*
25%-75%	100-100	111,8-153	104,8-140,2	110,2-149,7	109,8-124,6	112,7-135,6

Tabela 05 - Expressão por célula de moléculas CD152 na superfície de linfócitos T auxiliares humanos cultivados com diferentes emulsões lipídicas (Dados expressos em mediana e 25-75 percentis). *EL vs CN $p < 0,05$ (Teste de Friedman e pós-teste de Student Newman Keuls). $n=10$.

Figura 07 - Expressão por célula de moléculas CD152 na superfície de linfócitos T auxiliares humanos cultivados com diferentes emulsões lipídicas (Dados expressos em mediana e 25-75 percentis). *EL vs CN $p < 0,05$ (Teste de Friedman e pós-teste de Student Newman Keuls). $n=10$.

4.2 Efeitos de diferentes EL sobre a expressão de moléculas de superfície em monócitos/macrófagos humanos

4.2.1 Expressão de moléculas HLA-DR na superfície de monócitos/macrófagos humanos - Porcentagem de Fluorescência.

A porcentagem de monócitos/macrófagos expressando HLA-DR não se alterou nos grupos tratados com as diferentes emulsões lipídicas (EL) em relação ao grupo controle sem acréscimo de EL ($p=0,413$). Os resultados obtidos pelo efeito das diferentes EL sobre o número percentual de monócitos/macrófagos humanos exprimindo moléculas HLA-DR estão na tabela 6 e figura 08.

Porcentagem de Fluorescência HLA-DR						
Grupos	CN	TCLn-6	TCLn-6/TCLn-3	TCM/TCLn-6	TCM/TCLn-3	SMOF
Mediana	98,7	99,1	99,2	98,3	98,1	99,4
25%-75%	95,2-99,8	95,2-99,9	94,6-99,8	93,4-99,8	93,1-99,9	91,9-99,9

Tabela 06 - Número percentual de monócitos/macrófagos humanos cultivados com diferentes emulsões lipídicas exprimindo moléculas HLA-DR (Dados expressos em mediana e 25-75 percentis). **Diferença não significativa** - EL vs CN $p > 0,05$ (Teste de Friedman e pós-teste de Student Newman Keuls). $n=10$.

Figura 08 - Número percentual de monócitos/macrófagos humanos cultivados com diferentes emulsões lipídicas exprimindo moléculas HLA-DR (Dados expressos em mediana e 25-75 percentis). **Diferença não significativa** - EL vs CN $p > 0,05$ (Teste de Friedman e pós-teste de Student Newman Keuls). $n=10$.

4.2.2 Expressão de moléculas HLA-DR na superfície de monócitos/macrófagos humanos - Intensidade de Fluorescência.

A expressão de moléculas HLA-DR na superfície de monócitos/macrófagos diminuiu em todos os grupos tratados com emulsão lipídica em relação ao grupo controle (CN) sem acréscimo de emulsões lipídicas (EL) ($p=0,01$). Os resultados obtidos pelo efeito das diferentes emulsões lipídicas sobre a expressão por célula de moléculas HLA-DR estão na tabela 07 e figura 09.

Intensidade de Fluorescência HLA-DR						
Grupos	CN	TCLn-6	TCLn-6/TCLn-3	TCM/TCLn-6	TCM/TCLn-3	SMOF
Mediana	100	87,6*	84*	81*	85*	80*
25%-75%	100-100	80,8-92,3	74,2-90,5	79,5-96	77,3-95,8	74,1-94,3

Tabela 07 - Expressão por célula de moléculas HLA-DR na superfície de monócitos/macrófagos humanos cultivados com diferentes emulsões lipídicas (Dados expressos em mediana e 25-75 percentis). *EL vs CN $p < 0,05$ (Teste de Friedman e pós-teste de Student Newman Keuls). $n=10$.

Figura 09 - Expressão por célula de moléculas HLA-DR na superfície de monócitos/macrófagos humanos cultivados com diferentes emulsões lipídicas (Dados expressos em mediana e 25-75 percentis). *EL vs CN $p < 0,05$ (Teste de Friedman e pós-teste de Student Newman Keuls). $n=10$.

4.2.3 Expressão de moléculas CD80 na superfície de monócitos/macrófagos humanos - Porcentagem de Fluorescência.

As diferentes emulsões lipídicas (EL) estudadas não alteraram o número de monócitos/macrófagos expressando moléculas CD80 ($p>0,05$). Os resultados obtidos pelo efeito das diferentes EL sobre o número percentual de monócitos/macrófagos humanos exprimindo moléculas CD80 estão na tabela 8 e figura 10.

Porcentagem de Fluorescência CD80						
Grupos	CN	TCLn-6	TCLn-6/TCLn-3	TCM/TCLn-6	TCM/TCLn-3	SMOF
Mediana	62,6	67,7	75	57,2	62,5	63,8
25%-75%	35,5-76	34,1-76,1	36,1-81	27-66,9	25,2-78,4	29,3-71,7

Tabela 08 - Número percentual de monócitos/macrófagos humanos cultivados com diferentes emulsões lipídicas exprimindo moléculas CD80 (Dados expressos em mediana e 25-75 percentis). **Diferença não significativa** - EL vs CN $p > 0,05$ (Teste de Friedman e pós-teste de Student Newman Keuls). $n=10$.

Figura 10 - Número percentual de monócitos/macrófagos humanos cultivados com diferentes emulsões lipídicas exprimindo moléculas CD80 (Dados expressos em mediana e 25-75 percentis). **Diferença não significativa** - EL vs CN $p > 0,05$ (Teste de Friedman e pós-teste de Student Newman Keuls). $n=10$.

4.2.4 Expressão de moléculas CD80 na superfície de monócitos/macrófagos humanos - Intensidade de Fluorescência.

As diferentes emulsões lipídicas (EL) em estudo não alteraram a expressão por célula de moléculas CD80 na superfície de monócitos/macrófagos humanos ($p=0,661$). Os resultados obtidos pelo efeito das diferentes EL sobre a expressão por célula de moléculas CD80 estão na tabela 09 e figura 11.

Intensidade de Fluorescência CD80						
Grupos	CN	TCLn-6	TCLn-6/TCLn-3	TCM/TCLn-6	TCM/TCLn-3	SMOF
Mediana	100	103,2	88,3	97,2	103,5	89
25%-75%	100-100	90,5-119,6	79,3-94,3	84,9-115,6	78,1-119,6	83,3-114,5

Tabela 09 - Expressão por célula de moléculas CD80 na superfície de monócitos/macrófagos humanos cultivados com diferentes emulsões lipídicas (Dados expressos em mediana e 25-75 percentis). **Diferença não significativa** (Teste de Friedman e pós-teste de Student Newman Keuls). n=10.

Figura 11 - Expressão por célula de moléculas CD80 na superfície de monócitos/macrófagos humanos cultivados com diferentes emulsões lipídicas (Dados expressos em mediana e 25-75 percentis). **Diferença não significativa** (Teste de Friedman e pós-teste de Student Newman Keuls). n=10.

4.2.5 Expressão de moléculas CD86 na superfície de monócitos/macrófagos humanos - Porcentagem de Fluorescência.

As diferentes emulsões lipídicas parenterais (EL) em estudo não alteraram o número percentual de células exprimindo moléculas CD86 ($p=0,162$). Os resultados obtidos pelo efeito das diferentes EL sobre o número percentual de monócitos/macrófagos humanos exprimindo moléculas CD86 estão na tabela 10 e figura 12.

Porcentagem de Fluorescência CD86						
Grupos	CN	TCLn-6	TCLn-6/TCLn-3	TCM/TCLn-6	TCM/TCLn-3	SMOF
Mediana	84,2	82,8	85,6	83	81,3	81,6
25%-75%	80-98,4	68,8-96,3	69,6-94,1	80,8-95,2	72,6-94,7	72,5-97,7

Tabela 10 - Número percentual de monócitos/macrófagos humanos cultivados com diferentes emulsões lipídicas exprimindo moléculas CD86 (Dados expressos em mediana e 25-75 percentis). **Diferença não significativa** - EL vs CN $p > 0,05$ (Teste de Friedman e pós-teste de Student Newman Keuls). $n=10$.

Figura 12 - Número percentual de monócitos/macrófagos humanos cultivados com diferentes emulsões lipídicas exprimindo moléculas CD86 (Dados expressos em mediana e 25-75 percentis). **Diferença não significativa** - EL vs CN $p > 0,05$ (Teste de Friedman e pós-teste de Student Newman Keuls). $n=10$.

4.2.6 Expressão de moléculas CD86 na superfície de monócitos/macrófagos humanos - Intensidade de Fluorescência.

As diferentes emulsões lipídicas (EL) não alteraram a expressão por células de moléculas CD86 expressas na superfície de monócitos/macrófagos humanos ($p=0,939$). Os resultados obtidos pelo efeito das diferentes EL sobre a expressão por células de moléculas CD86 estão na tabela 11 e Figura 13.

Intensidade de Fluorescência CD86						
Grupos	CN	TCLn-6	TCLn-6/TCLn-3	TCM/TCLn-6	TCM/TCLn-3	SMOF
Mediana	100	94,2	96,9	94,9	91,3	88,6
25%-75%	100-100	92,8-118	66,3-112,5	80,2-126,7	79,2-127	77,9-126,9

Tabela 11 - Expressão por célula de moléculas CD86 na superfície de monócitos/macrófagos humanos cultivados com diferentes emulsões lipídicas (Dados expressos em mediana e 25-75 percentis). **Diferença não significativa** (Teste de Friedman e pós-teste de Student Newman Keuls). $n=10$.

Figura 13 - Expressão por célula de moléculas CD86 na superfície de monócitos/macrófagos humanos cultivados com diferentes emulsões lipídicas (Dados expressos em mediana e 25-75 percentis). **Diferença não significativa** (Teste de Friedman e pós-teste de Student Newman Keuls). $n=10$.

4.3 Resumo dos resultados

No sentido de facilitar a compreensão, os resultados estão resumidos nas tabela 12 e 13

Tabela 12– Resumo dos resultados encontrados do efeito das diferentes emulsões lipídicas parenterais sobre a expressão de moléculas de superfície de linfócitos T auxiliares humanos

<i>Grupos</i>	<i>Moléculas</i>			
	<i>CD28</i>		<i>CD152</i>	
	<i>Porcentagem</i>	<i>Intensidade</i>	<i>Porcentagem</i>	<i>Intensidade</i>
TCLn-6	↑	NA	NA	↑
TCLn-6/TCLn-3	↑	NA	NA	↑
TCM	↑	NA	NA	↑
TCM/TCLn-3	↑	NA	NA	↑
SMOF	↑	NA	NA	↑

■ EL vs CN ($p > 0,05$ – teste de Friedman e pós-teste de Student Newman Keuls – $n=10$)

NA – Não alterou

Tabela 13– Resumo dos resultados preliminares do efeito das diferentes emulsões lipídicas parenterais sobre a expressão de moléculas de superfície de monócitos/macrófagos humanos

Grupos	Moléculas					
	HLA-DR		CD80		CD86	
	Porcentagem	Intensidade	Porcentagem	Intensidade	Porcentagem	Intensidade
TCLn-6	NA	↓	NA	NA	NA	NA
TCLn-6/TCLn-3	NA	↓	NA	NA	NA	NA
TCM	NA	↓	NA	NA	NA	NA
TCM/TCLn-3	NA	↓	NA	NA	NA	NA
SMOF	NA	↓	NA	NA	NA	NA

■ EL vs CN ($p > 0,05$ – teste de Friedman e pós-teste de Student Newman

Keuls – $n=10$)

NA – Não alterou

5.0 Discussão

Discussão

Os ácidos graxos (AG) desempenham papel estrutural na constituição de membranas biológicas. Mudanças na composição de AG da membrana fosfolipídica, inclusive de células do sistema imunológico (SI), podem influenciar suas funções, produção de mediadores inflamatórios, e alterar a fluidez da membrana, levando a alterações na função e expressão de moléculas de superfície. (Escudero et al, 1998; Sasaki et al 1999; Granato et al, 2000; Visioli et al, 2000; De Pablo et al, 2002; Kew et al, 2004; Yaqoob et al, 2004)

Nas condições da presente pesquisa, observou-se que todas as emulsões lipídicas (EL) estudadas, independente da composição de AG, alteraram a expressão de moléculas de superfície. No entanto, foi possível observar que esse efeito modulatório desempenhado pelas EL foi diferente de acordo com o tipo de leucócito. Houve um aumento do número percentual de linfócitos T auxiliares expressando moléculas CD28 e da expressão por célula de moléculas CD152. Por outro lado, na população de monócitos/macrófagos (MO/MØ) houve uma diminuição da expressão por célula de moléculas HLA-DR.

Até o presente momento, não existem relatos na literatura sobre o efeito de EL sobre a expressão de moléculas CD28, CD152 e de suas ligantes co-estimulatórias CD80 e CD86. Alguns estudos avaliaram os efeitos de AG livres isolados sobre a expressão de moléculas de superfície (Hughes et al, 1997 e

2000; Sampson et al, 2001; Reissig et al, 2003;). No entanto, na prática clínica emprega-se EL contendo vários tipos de AG na forma de triglicérides, com predominância distinta de alguns AG. Os estudos anteriores apontam a originalidade do presente estudo, mas tornam difícil a interpretação e discussão de nossos resultados.

Nos últimos anos, o grupo METANUTRI – LIM35 da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo tem estudado o efeito *in vitro* de distintas EL sobre a expressão de moléculas de superfície com funções imunes. Em trabalhos preliminares, EL à base de óleo de peixe não alterou a expressão de moléculas apresentadoras de antígenos HLA-DR em culturas de monócitos/macrófagos humanos não ativados ou previamente ativados com interferon-gama (INF-gama). No entanto, quando o agente ativador (INF-gama) foi adicionado juntamente com a EL à base de óleo de peixe, houve uma menor expressão de moléculas HLA-DR, sugerindo que essa EL impediu a ativação dos monócitos/macrófagos. (Torrinhas et al, 2003).

Ainda em cultura de macrófagos humanos, ácidos graxos poliinsaturados tipo n-3 (AGPI n-3) livres inibiram a expressão de moléculas apresentadoras de antígenos HLA-DR e HLA-DP, moléculas de adesão ICAM-1 (Hughes et al, 1997 e 2000; Mayer et al, 2003). A menor expressão dessas moléculas foi relacionada pelos autores com a menor capacidade de apresentar antígenos por esses leucócitos e menor produção de citocinas pró-inflamatórias. (Hughes et al, 1997 e 2000; Mayer et al, 2003).

Ácidos graxos poliinsaturados n-3 demonstraram ter efeito imunossupressor sobre células com funções imunes (Kew et al, 2004; Hughes et al, 2000 e 1997). Entretanto, na presente pesquisa, os linfócitos T auxiliares cultivados com EL enriquecida com 20% de EL rica em AGPI n-3 (TCLn-6/TCLn-3 e TCM/TCLn-3) aumentou a expressão de moléculas de superfície CD28 e CD152.

Guardando as devidas diferenças entre estudos clínicos e experimentais, permitimo-nos cortejar nossos resultados *in vitro* com pesquisas clínicas. Sabe-se que monócitos/macrófagos ligam-se por moléculas de superfície tipo HLA-DR e moléculas co-estimulatórias a linfócitos (Appleman et al, 2003). Estes se ativam e passam a produzir, entre outras moléculas, citocinas pró-inflamatórias (Hope et al, 2004; Rangachari, 2004). Este processo foi observado por Schauder et al (2002) em estudo clínico, onde após estresse cirúrgico, ofereceram a pacientes nutrição parenteral (NP) contendo mistura de 80% de EL à base de óleo de soja (rica em AGPI n-6) e 20% de EL à base de óleo de peixe (rica em AGPI n-3). Ocorreu aumento da produção de IL-2, INF-gama, TNF-alfa e expressão de receptor para IL2 (IL-2R) por células mononucleares (Schauder et al, 2002). Os autores concluíram que a mistura de EL contendo 20% de EL à base de óleo de peixe, igual a utilizada na presente pesquisa não é imunossupressora e tem efeito pró-inflamatório. (Schauder et al, 2002)

No entanto, existem controvérsias a este respeito porque, em outro estudo clínico, pacientes em pós-operatório recebendo NP com EL à base de óleo de

peixe, rica em AGPI n-3, apresentaram efeito antiinflamatório com diminuição de IL-6 sérica e HLA-DR na superfície de células mononucleares (Weiss et al, 2002), contrastando com o trabalho de Schauder et al (2002). Os modelos de estudo adotados nos trabalhos de Weiss e Schauder são parecidos: todos os pacientes receberam NP após trauma cirúrgico e a população celular estudada foi a mesma, entretanto, Weiss et al (2002) suplementaram seus pacientes com EL a base de óleo de peixe (10%) pura, enquanto Schauder et al (2002) utilizaram uma mistura de apenas 20% desta EL e 80% de EL rica em AGPI n-6.

Diferenças na metodologia dos estudos podem ser decisivas ao conduzir os resultados das pesquisas para direções diferentes, o que poderia explicar os resultados controversos encontrados na literatura e que dificultam a interpretação de nossos achados. Isso pode ser observado também em estudos *in vitro* e *in vivo*.

Em estudos *in vitro*, a adição de EL à base de óleo de soja, rica em AGPI n-6 em cultura de células mononucleares humanas ativadas, inibe a proliferação linfocitária e a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-2, IL-1, TNF-alfa) (Granato et al, 2000; Wanten et al, 2000).

Entretanto, em estudos *in vivo*, EL à base de óleo de soja, rica em AGPI n-6 está associada à maior produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF-alfa, IL-

1 β , IL-6 e IL-8), tromboxano B2 e B3. (Szeinberg et al, 1986; Calder 1990; Hayashi et al, 1998; McCann et al, 2000; Mayer et al, 2003).

Mesmo em estudos *in vivo* podem ocorrer diferenças se os AG são ofertados por via oral ou endovenosa. Em 1999, Sasaki et al encontraram em camundongos isogênicos C57BL/6, alimentados com dieta oral suplementada com AGPI n-3 maior expressão de moléculas CD28 na superfície de linfócitos T, ao mesmo tempo em que a expressão de moléculas CD4 e CD8 diminuiu. Os autores atribuíram esses achados à alteração da fluidez da membrana promovida pela incorporação de AGPI.

Esta observação faz com que nossa discussão deixe de ser conduzida no sentido de tentar confrontar nossos resultados com os distintos efeitos exercidos pelos AGPI n-3 e n-6 sobre células com funções imunes e voltamos nossa atenção para as alterações nas funções da membrana celular pela possível modificação no seu perfil lipídico.

O aumento de AGPI confere maior fluidez à membrana, principalmente se esta for comparada com membranas ricas em ácidos graxos saturados e monoinsaturados (Calder et al, 1994). A maior fluidez causada pelos AGPI pode alterar funções de membrana, em especial, expressão de moléculas de superfície (Sasaki et al, 1999). Na mesma linha de argumentação poderíamos explicar na presente pesquisa, o aumento da expressão das moléculas CD28 e CD152 na superfície de linfócitos T auxiliares suplementados com diferentes EL

(contendo quantidade superior a 50% de AGPI) devido à maior facilidade destas moléculas atravessarem a membrana celular.

As diferentes populações de células mononucleares estudadas (linfócitos T auxiliares e monócitos/macrófagos) desempenham funções distintas no organismo. Para manter suas capacidades funcionais, ambas impõem uma dinâmica na membrana fosfolipídica, alterando sua composição lipídica, que pode ser determinada pelo estágio de ativação celular. Isto pode ser exemplificado experimentalmente em timócitos de coelhos onde, após estimulação por mitógenos, a membrana fosfolipídica trocou ácidos graxos saturados e monoinsaturados por ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) (Rode et al, 1982).

Após estímulo *in vivo* com *Mycobacterium calmette guerin*, células do timo de coelhos também aumentaram a incorporação de AGPI na membrana fosfolipídica (Ferber et al, 1975). De acordo com essas observações, pode-se concluir que células ativadas por mitógenos parecem aumentar sua afinidade por AGPI.

O aumento da afinidade por AGPI de células imunológicas ativadas parece ser devido ao maior “turnover” de AG. Em cultura de linfócitos, os AG podem ser esterificados pela ação de enzimas do tipo aciltransferases. A enzima acil-CoA: lisofosfatidilcolina O-aciltransferase tem maior atividade em linfócitos ativados e demonstra maior afinidade por AGPI (Rode et al, 1982; Yamashita et

al, 1997). Esta enzima transfere o ácido graxo livre para os fosfolipídios que são incorporados na membrana (Rode et al, 1982; Yamashita et al, 1997).

Na presente pesquisa, culturas de leucócitos mononucleares humanos foram acrescidas de PHA (para que ocorresse ativação celular), e de EL ricas em AGPI. Cabe levantar a hipótese que os linfócitos T auxiliares ativados teriam aumentado sua afinidade por AGPI e sua posterior incorporação na membrana fosfolipídica, aumentando sua fluidez e conferindo maior facilidade para as moléculas CD28 e CD152 atravessarem a membrana.

O aumento da expressão de moléculas CD152 na superfície de linfócitos T auxiliares, poderia ter ocorrido em resposta à expressão aumentada de moléculas CD28. Em resposta à ativação linfocitária, moléculas CD152 são expressas, com o objetivo de impedir a ativação exagerada de $L\emptyset$, competindo com CD28 pela ligação às moléculas co-estimulatórias (CD80/CD86) (Vandenborre et al, 1999; Sansom, 2000). Este é um mecanismo de defesa que impede o desenvolvimento de uma resposta exacerbada, mantendo a homeostase.

De forma similar aos linfócitos, os monócitos/macrófagos ativados com INF- γ , também aumentam a incorporação de AGPI tipo n-6, conferindo maior fluidez à membrana o que resulta, eventualmente, em maior expressão das moléculas de superfície de monócitos/macrófagos (Furlong et al, 1992). No entanto, na presente pesquisa, o número de moléculas apresentadoras de

antígenos HLA-DR diminuiu em monócitos/macrófagos, enquanto que a expressão das moléculas co-estimulatórias de monócitos/macrófagos não foi alterada. Uma explicação possível prende-se que, na mesma cultura, encontram-se as duas populações celulares estudadas (linfócitos T auxiliares e monócitos/macrófagos) ao lado de outras células brancas que não foram objeto de estudo da presente pesquisa. Isso poderia limitar a oferta de AGPI por tipo celular e por sua afinidade pelos AG.

Apesar da preferência por AGPI de monócitos/macrófagos, devemos considerar que a quantidade de AGPI na cultura, mesmo superior em relação aos outros tipos de AG, ainda é limitada. Pode-se especular que os AGPI disponíveis foram utilizados preferencialmente pela população de linfócitos, em resposta ao estímulo proliferativo oferecido pela adição de PHA na cultura. Dessa maneira, com restrição de AGPI, os monócitos/macrófagos obrigatoriamente metabolizariam os demais AG, saturados ou monoinsaturados disponíveis na cultura, provenientes das EL. As características físico-químicas destes AG levariam à produção de membranas fosfolipídicas com menor fluidez (Calder et al, 1994).

Em camundongos B/W com lupus, a expressão de moléculas de adesão e co-estimulatórias está aumentada (Muthukumar et al, 2004). Entretanto, dieta oral enriquecida com óleo de peixe (rico em AGPI n-3) ou simples restrição alimentar em 40%, evita o aumento destas moléculas mesmo quando a dieta é enriquecida com óleo de milho (rico em AGPI n-6) (Muthukumar et al, 2004).

Esta observação sugere que expressão dessas moléculas pode sofrer influência da menor oferta de AGPI na dieta.

Na presente investigação, as moléculas co-estimulatórias CD80 e CD86 tiveram sua expressão preservada em relação ao grupo controle sem EL. Comparadas com as moléculas HLA-DR, as moléculas CD80 e CD86 são estruturalmente menos complexas e compostas por cadeia simples (Ikemizu et al, 2000; Kwok et al, 2002). É possível que a diminuição da fluidez das membranas de monócitos/macrófagos provocada pela menor disponibilidade de AGPI na cultura, não tenha sido suficiente para prejudicar a expressão dessas moléculas menores.

De modo geral, as alterações na expressão de moléculas de superfície encontradas neste estudo, podem influenciar as funções de linfócitos T auxiliares e monócitos/macrófagos, o que poderia repercutir na resposta imunológica.

A menor expressão de moléculas HLA-DR na superfície de monócitos/macrófagos tratados com diferentes EL ricas em AGPI, poderia prejudicar a apresentação de antígenos. Em monócitos/macrófagos humanos ativados Hughes et al (2000) verificaram que os AGPI diminuíram a capacidade de apresentação de antígenos associada à menor expressão de moléculas HLA-DR e HLA-DP. Este efeito dos AGPI poderia resultar em menor ativação de linfócitos T auxiliares e conseqüentemente de outras células com funções

imunes. No entanto, associado ao estímulo promovido pela apresentação de antígenos, o sinal co-estimulatório é necessário para promover a efetiva ativação de linfócitos T auxiliares e, conseqüentemente da resposta imune (Shahinian et al, 1993; Linsley et al, 1994; Lenschow et al, 1996; Chambers et al, 1999).

Considerando-se que o sinal co-estimulatório é promovido pela interação de moléculas CD80 e CD86, presentes na superfície de monócitos/macrófagos, com o receptor linfocitário CD28 (Shahinian et al, 1993; Linsley et al, 1994; Lenschow et al, 1996; Chambers et al, 1999;), os resultados da presente pesquisa apontam que a função co-estimulatória de monócitos/macrófagos, após tratamento com diferentes EL, pode estar preservada. Além disso, a maior expressão de moléculas CD28, sugere que linfócitos T auxiliares apresentam maior capacidade de ativação após tratamento com EL rica em AGPI. Deste modo, podemos sugerir que mesmo com um possível prejuízo na apresentação de antígenos por monócitos/macrófagos, a ativação de linfócitos T auxiliares não é prejudicada. Da mesma forma, a regulação da amplificação da ativação dos linfócitos T auxiliares é mantida, tendo em vista a ocorrência de um aumento concomitante das moléculas CD152.

Tomadas em conjunto, as alterações na expressão das moléculas de superfície de células mononucleares tratadas com diferentes EL, se confirmadas por estudos clínicos, provavelmente não representam prejuízos para a ativação de linfócitos T auxiliares e, conseqüentemente, da resposta

imune. É importante ressaltar que durante o processo de apresentação de antígenos para linfócitos T auxiliares, outros tipos celulares como células dendríticas, neutrófilos e linfócitos B, que não foram estudados, são capazes de executar esta função (Al-Daccak et al, 2004). Dessa forma, torna-se difícil a compreensão do impacto que nossos achados *in vitro* teriam efetivamente para a resposta imune.

Além disso, se considerarmos que a oferta de AG durante a infusão parenteral é contínua, a disponibilidade dos diferentes AG pode ser aproveitada pelos diferentes tipos celulares de forma uniforme. Nessas condições, seguindo a linha de pensamento da incorporação de AG e com base em nossos resultados, podemos sugerir a possibilidade de haver uma amplificação da resposta imunológica *in vivo*.

A suplementação contínua de EL rica em AGPI garantiria maior disponibilidade de AGPI para monócitos/macrófagos. Neste caso, com maior incorporação destes AG, a expressão de moléculas HLA-DR e co-estimulatórias poderiam ser preservadas ou ainda aumentadas, resultando em maior apresentação de antígeno e sinal co-estimulatório. As capacidades de apresentação de antígeno e de co-estimulação de linfócitos T auxiliares maiores ou preservadas, associada à maior expressão de moléculas CD28, resultaria na amplificação da resposta imune.

Esta observação pode explicar os resultados encontrados na literatura, onde a suplementação com EL rica em AGPI, está associada à maior produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF-alfa, IL-1 β , IL-6 e IL-8), eicosanóides, além de aumentar a capacidade fagocítica de monócitos e macrófagos em humanos e animais. (Szeinberg et al, 1986; Calder 1990; Hayashi et al, 1998; McCann et al, 2000; Mayer et al, 2003)

A hipótese apresentada para discussão dos dados coletados necessitaria ser explorada por meio da condução de novas pesquisas que avaliem a incorporação de AGPI nas membranas de diferentes populações de leucócitos no modelo de cultura presentemente estudado e a correlacionem com a expressão de moléculas de superfície.

6.0 Conclusões

Conclusões

Nas condições da presente pesquisa em que células mononucleares humanas foram cultivadas com diferentes emulsões lipídicas parenterais pode-se concluir que:

- Emulsões lipídicas parenterais exercem influências distintas sobre a expressão de moléculas de superfície, de acordo com o tipo de leucócito mononuclear e a molécula estudada.
- Emulsões lipídicas parenterais, independente da composição de ácidos graxos, aumentam a expressão de moléculas receptoras de sinais co-estimulatórios na superfície de linfócitos T auxiliares humanos ativados.
- Emulsões lipídicas parenterais, independente da composição de ácidos graxos, diminuem a expressão de moléculas apresentadoras de antígenos (HLA-DR) na superfície de monócitos/macrófagos humanos ativados.

7.0 ANEXOS

**Anexo 01 – Aprovação d o protocolo de pesquisa e do
termo de consentimento livre e esclarecido pela
Comissão de Ética da Diretoria Clínica do Hospital das
Clinicas da Faculdade de Medicina da USP.**

Hospital das Clínicas
Da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Caixa Postal, 8091 – São Paulo – Brasil

DIRETORIA CLÍNICA

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

APROVAÇÃO

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 11.06.03, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 332/03, intitulado: “Efeitos de diferentes emulsões lipídicas sobre a expressão de moléculas envolvidas no processo de apresentação de antígenos na superfície de células mononucleares humanas *in vitro*” apresentado pelo Departamento de GASTROENTEROLOGIA, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Pesquisador(a) Responsável: Prof. Dr. Dan Linetzky Waitzberg

Pesquisador(a) Executante: Sr. Thiago Manzoni Jacintho

CAPPesq, 11 de Junho de 2003

Prof. Dr. EUCIIDES AYRES de CASTILHO

Presidente da Comissão de Ética para Análise
De Projetos de Pesquisa

Observações: Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq os relatórios parciais e finais sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10.10.1996, inciso IX.2, letra “c”)

Anexo 02 – Termo de consentimento livre e esclarecido

Hospital das Clínicas
Da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Caixa Postal, 8091 – São Paulo – Brasil

Termo de consentimento livre e esclarecido

I- DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. Nome do paciente.....
 Documento de identidade Nº.....Sexo M ☐ F ☐
 Data de nascimento...../...../.....
 Endereço:Nº.....Apto:
 Bairro:Cidade:
 CEP: Telefone: DDD(.....)

2. Responsável Legal
 Natureza (Grau de parentesco, tutor, curador etc.)
 Documento de Identidade: Sexo M ☐ F ☐
 Data de nascimento:/...../.....
 Endereço:Nº.....Apto:
 Bairro:Cidade:
 CEP: Telefone: DDD (.....)

II – DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

1. Título do protocolo de Pesquisa:
 Efeitos de diferentes emulsões lipídicas sobre a expressão de moléculas de superfície envolvidas no processo de apresentação de antígenos em células mononucleares humanas *in vitro*.

Pesquisador: Thiago Manzoni Jacintho

Cargo/Função: Biólogo

Inscrição no Conselho Regional N°:

Unidade do HCFMUSP: LIM35

2. Avaliação do risco da pesquisa:

Sem Risco ☐

Risco Mínimo ☐

Risco Médio ☐

Risco Baixo ☐

Risco Maior ☐

(Probabilidade que o indivíduo sofra dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

3. Duração da pesquisa: 12 meses

III – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE OU SEU REPRESENTANTE LEGAL SOBRE A PESQUISA CONSIGNANDO:

1. Justificativa e os objetivos da pesquisa

Uma pessoa que não se alimenta corretamente pode desenvolver um problema de saúde chamado desnutrição. Isso ocorre porque os alimentos possuem nutrientes que são elementos importantes para manter o nosso corpo saudável e nos fornecer energia.

Infelizmente, a desnutrição faz parte da realidade brasileira e é um problema grave dentro dos nossos hospitais, pois quando uma pessoa está doente precisa ainda mais de nutrientes e energia que os alimentos oferecem para recuperar a saúde.

Um dos tratamentos para combater esse problema é chamado “Terapia Nutricional Parenteral”. Consiste em oferecer ao doente todos os nutrientes que ele necessita para que se recupere da desnutrição e consiga combater a

doença. Esses nutrientes são ofertados na forma líquida, pela veia, e vão agir diretamente nas células de todo o organismo, principalmente nas células sanguíneas.

Diversos trabalhos na literatura demonstraram que as dietas ofertadas na Terapia Nutricional Parenteral podem alterar algumas funções do sistema imunológico deste modo, nosso objetivo é verificar os efeitos moduladores de diferentes emulsões lipídicas sobre a expressão de moléculas envolvidas no processo de apresentação de antígenos em células mononucleares humanas.

2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos, que são experimentais

Serão coletados a vácuo, 100mL de sangue para utilizar na obtenção de células mononucleares, a fim de incubá-las por 48 e 72 horas, com diferentes emulsões lipídicas em estufa, em atmosfera úmida, temperatura ambiente de 37° C e 5% de CO₂. Passadas 48 e 72 horas, as células serão marcadas com anticorpos monoclonais específicos para monócitos/macrófagos (CD14, CD80, CD86 e HLA-DR) e linfócitos (CD3, CD4, CD28 e CD152) e analisadas por citometria de fluxo.

3. Desconfortos e riscos esperados

Não haverão desconfortos além dos esperados em uma coleta de sangue.

4. Benefícios que poderão ser obtidos

Com a conclusão desta pesquisa, poderemos compreender os efeitos das emulsões lipídicas sobre o sistema imunológico, o que dará parâmetros para

um tratamento mais eficaz e seguro para pacientes hospitalizados com o sistema imune comprometido.

5. Procedimentos alternativos que podem ser vantajosos para o indivíduo

Não há.

IV – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA CONSIGNADO:

1. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.
2. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízos à continuidade da assistência.
3. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade.
4. Disponibilidade de assistência do HCFMUSP, por eventuais danos à saúde, decorrente da pesquisa.
5. Viabilidade de indenização por eventuais danos à saúde decorrente da pesquisa.

V - INFORMAÇÕES DE NOMES, ENDEREÇOS E TELEFONES DOS RESPONSÁVEIS PELO ACOMPANHAMENTO DA PESQUISA, PARA CONTATO EM CASO DE INTEROCORRÊNCIAS CLÍNICAS E REAÇÕES ADVERSAS.

Laboratório de Fisiologia e Distúrbios Esfincterianos (Equipe METANUTRI) LIM 35 – Telefones 3062-0841/3066-7459.

VI - OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES:

VII – CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIMENTO

Declaro que, após convenientemente esclarecido pelo pesquisador e ter entendido o que foi explicado, consinto em participar do presente protocolo de pesquisa.

São Paulo,.....de.....de 20.....

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

Assinatura do pesquisador
(Carimbo ou nome legível)

Anexo 03 – Ficha de Inclusão

Ficha de inclusão

Questionário de inclusão

I. Identificação: _____ Data: __/__/__

Doador nº _____.

Sexo _____.

Idade _____.

II. Questionário:

1) Ingeriu bebida alcoólica nas últimas 24 horas?

☐ **Sim** ☐ **Não**

2) É tabagista?

☐ **Sim** ☐ **Não**

3) Pratica esportes regularmente?

☐ **Sim** ☐ **Não**

Se positivo, é esportista?

☐ **Sim** ☐ **Não**

4) Faz uso de algum medicamento regularmente?

☐ **Sim** ☐ **Não**

5) Teve alguma doença nas últimas três semanas?

☐ **Sim** ☐ **Não**

6) Ingeriu algum medicamento nas últimas 24 horas?

☐ **Sim** ☐ **Não**

7) É usuário de drogas?

☐ **Sim** ☐ **Não**

OBS: Todas as respostas devem ser negativas.

Anexo 04 – Relação dos anticorpos monoclonais e controles isotípicos

**Relação dos anticorpos monoclonais e controles isotípicos que serão
utilizados no projeto**

<i>Anticorpos</i>	<i>Isotípico</i>	<i>Fluorocromo</i>	<i>Função</i>
Anti CD80	IgG1	FITC	Reconhece receptor B7-1 em monócitos/macrófagos
Anti CD86	IgG2b,k	PE	Reconhece receptor B7-2 em monócitos/macrófagos
Anti HLA-DR	IgG2a,k	Cy-Chrome	Reconhecer moléculas MHC classe II
Anti CD14	IgG2a	APC	Reconhecer glicoproteína expressa em monócitos/macrófagos
Anti CD28	IgG1	FITC	Reconhece receptor CD28 em linfócitos.
Anti CD152	IgG2a	PE	Reconhece receptor CTLA-4 em linfócitos
Anti CD3	IgG1,k	Cy-Chrome	Reconhece complexo de sinalização do TCR.
Anti CD4	IgG1,k	APC	Reconhece receptor CD4 presentes somente em linfócitos CD4+.
IgG1		FITC	Controle isotípico para anti CD80
IgG2b,k		PE	Controle isotípico para anti CD86
IgG2a,k		Cy-Chrome	Controle isotípico para anti HLA-DR
IgG2a		APC	Controle isotípico para anti CD14
IgG1		FITC	Controle isotípico para anti CD28
IgG2a,k		PE	Controle isotípico para anti CD152
IgG1,k		Cy-Chrome	Controle isotípico para anti CD3
IgG1,k		APC	Controle isotípico para anti CD4

8.0 REFERÊNCIAS

Referências*

Al-Daccak R, Mooney N, Charron D. MHC class II signaling in antigen-presenting cells. *Curr Opin Immunol*. 2004;16(1):108-13.

Alexander JW. Immunonutrition: the role of omega-3 fatty acids. *Nutrition*. 1998;14(7-8):627-33.

Appleman LJ, Boussiotis VA. T cell anergy and costimulation. *Immunol Rev*. 2003;192:161-80.

Bach AC, Babayan VK. Medium-chain triglycerides: an update. *Am J Clin Nutr*. 1982;36(5):950-62.

Bach AC, Babayan VK. Medium-chain triglycerides: an update. *Am J Clin Nutr*, 1998; 36: 950-62.

Barton RG, Wells CL, Carlson A, Singh R, Sullivan JJ, Cerra FB. Dietary omega-3 fatty acids decrease mortality and Kupffer cell prostaglandin E2 production in a rat model of chronic sepsis. *J Trauma*. 1991;31(6):768-73; discussion 773-4.

Bellinati-Pires R, Waitzberg DL, Salgado MM, Carneiro-Sampaio MM. Effect of medium- and long-chain triglycerides on human neutrophil migration. *Braz J Med Biol Res*. 1992;25(4):369-73.

* De acordo com:

Adaptado de *International Committee of Medical Journals Aditors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2004.

Abreviatura dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*

Bellinati-Pires R, Waitzberg DL, Salgado MM, et al. Functional alterations of human neutrophils by medium-chain triglyceride emulsions: evaluation of phagocytosis, bacterial killing, and oxidative activity. *J Leukoc Biol.* 1993;53(4):404-10.

Bertevello PL, Waitzberg DL, Logullo A, et al. Proctetive effect of intravenous lipid emulsions with long and medium chain triglycerides in inflammatory colitis in rats. Second Annual Nutrition Week - Scientific Abstrac Posters Exchange, 2003.

Buono C, Lichtman AH. Co-stimulation and plaque-antigen-specific T-cell responses in atherosclerosis. *Trends Cardiovasc Med.* 2004;14(4):166-72.

Calder PC, Bond JA, Harvey DJ, Gordon S, Newsholme EA. Uptake and incorporation of saturated and unsaturated fatty acids into macrophage lipids and their effect upon macrophage adhesion and phagocytosis. *Biochem J.* 1990;269(3):807-14.

Calder PC, Grimble RF. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *Eur J Clin Nutr.* 2002;56 (Supl 3):S14-9.

Calder PC, Yaqoob P, Harvey DJ, Watts A, Newsholme EA. Incorporation of fatty acids by concanavalin A-stimulated lymphocytes and the effect on fatty acid composition and membrane fluidity. *Biochem J.* 1994;300 (Pt 2):509-18.

Calder PC, Yaqoob P, Thies F, Wallace FA, Miles EA. Fatty acids and lymphocyte functions. *Br J Nutr.* 2002;87 (Suppl 1):S31-48.

Campos FG, Waitzberg DL, Habr-Gama A, Logullo AF, Noronha IL, Jancar S, et al. Impact of parenteral n-3 fatty acids on experimental acute colitis. *Br J Nutr.* 2002;87 (Suppl 1):S83-8.

Campos FG, Waitzberg DL, Teixeira MG, Mucerino DR, Kiss DR, Habr-Gama A. Pharmacological nutrition in inflammatory bowel diseases. *Nutr Hosp.* 2003;18(2):57-64.

Carpentier YA, Dupon IE. Advances in intravenous lipid emulsion. *World J Surg,* 2000; 24(12): 1493-7.

Carpentier YA, Simoens C, Siderova V, el Nakadi I, Vanweyenberg V, Eggerickx D, Deckelbaum RJ. Recent developments in lipid emulsions: relevance to intensive care. *Nutrition.* 1997;13(9 Suppl):73S-78S.

Chambers CA, Allison JP. Costimulatory regulation of T cell function. *Curr Opin Cell Biol.* 1999;11(2):203-10.

Cooper A, Gibbons L, Horan M, Little R, Rothwell N. Effect of dietary fish oil supplementation on fever and cytokine production in human volunteers. *Clin Nutr.* 1993;12:321 – 8.

Cukier C, Waitzberg DL, Logullo AF, Bacchi CE, Travassos VH, Torrinhas RS, et al. Lipid and lipid-free total parenteral nutrition: differential effects on macrophage phagocytosis in rats. *Nutrition*. 1999;15(11-12):885-9.

Daly JM, Weintraub FN, Shou J, Rosato EF, Lucia M. Enteral nutrition during multimodality therapy in upper gastrointestinal cancer patients. *Ann Surg*. 1995;221(4):327-38.

De Franco AI, Weiss A. Lymphocyte activation and effector functions. *Curr Opin Immunol*. 1998;10:243-67.

de Pablo MA, Puertollano MA, Alvarez de Cienfuegos G. Biological and clinical significance of lipids as modulators of immune system functions. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002;9(5):945-50.

Escudero A, Montilla JC, Garcia JM, Sanchez-Quevedo MC, Periago JL, Hortelano P, Suarez MD. Effect of dietary (n-9), (n-6) and (n-3) fatty acids on membrane lipid composition and morphology of rat erythrocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1394(1):65-73.

Ferber E, De Pasquale GG, Resch K. Phospholipid metabolism of stimulated lymphocytes. Composition of phospholipid fatty acids. *Biochim Biophys Acta*. 1975;398(3):364-76.

Fleischer J, Soeth E, Reiling N, Grage-Griebenow E, Flad HD, Ernst M. Differential expression and function of CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) on human peripheral blood monocytes. *Immunology*. 1996;89(4):592-8.

Freeman J, Goldmann DA, Smith NE, Sidebottom DG, Epstein MF, Platt R. Association of intravenous lipid emulsion and coagulase-negative staphylococcal bacteremia in neonatal intensive care units. *N Engl J Med*. 1990;323(5):301-8.

Furlong ST, Mednis A, Remold HG. Interferon-gamma stimulates lipid metabolism in human monocytes. *Cell Immunol*. 1992;143(1):108-17.

Gelas P, Cotte L, Poitevin-Later F, Pichard C, Leverve X, Barnoud D, et al. Effect of parenteral medium- and long-chain triglycerides on lymphocytes subpopulations and functions in patients with acquired immunodeficiency syndrome: a prospective study. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 1998;22(2):67-71.

Genc K, Dona DL, Reder AT. Increased CD80(+) B cells in active multiple sclerosis and reversal by interferon beta-1b therapy. *J Clin Invest*. 1997;99(11):2664-71.

Gennari R, Alexander JW, Eaves-Pyles T. Effect of different combinations of dietary additives on bacterial translocation and survival in gut-derived sepsis. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 1995;19(4):319-25.

Gogos CA, Kalfarentzos FE, Zoumbos NC. Effect of different types of total parenteral nutrition on T-lymphocyte subpopulations and NK cells. *Am J Clin Nutr.* 1990;51(1):119-22.

Gogos CA, Zoumbos N, Makri M, Kalfarentzos F. Medium- and long-chain triglycerides have different effects on the synthesis of tumor necrosis factor by human mononuclear cells in patients under total parenteral nutrition. *J Am Coll Nutr.* 1994;13(1):40-4.

Granato D, Blum S, Rossle C, Le Boucher J, Malnoe A, Dutot G. Effects of parenteral lipid emulsions with different fatty acid composition on immune cell functions in vitro. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 2000;24(2):113-8.

Granucci F, Zanoni I, Feau S, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cell regulation of immune responses: a new role for interleukin 2 at the intersection of innate and adaptive immunity. *EMBO J.* 2003;22(11):2546-51.

Greenfield EA, Nguyen KA, Kuchroo VK. CD28/B7 costimulation: a review. *Crit Rev Immunol.* 1998;18(5):389-418.

Grose RH, Howarth GS, Xian CJ, Hohmann AW. Expression of B7 costimulatory molecules by cells infiltrating the colon in experimental colitis induced by oral dextran sulfate sodium in the mouse. *J Gastroenterol Hepatol.* 2001;16(11):1228-34.

Hayashi N, Tashiro T, Yamamori H, Takagi K, Morishima Y, Otsubo Y, et al. Effects of intravenous omega-3 and omega-6 fat emulsion on cytokine production and delayed type hypersensitivity in burned rats receiving total parenteral nutrition. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 1998;22(6):363-7.

Heine J, Scheinichen D, Jaeger K, Andre M, Leuwer M. In vitro influence of parenteral lipid emulsions on the respiratory burst of neutrophils. *Nutrition.* 1999;15(7-8):540-5.

Hope JC, Thom ML, McCormick PA, Howard CJ. Interaction of antigen presenting cells with mycobacteria. *Vet Immunol Immunopathol.* 2004;100(3-4):187-95.

Hughes DA, Pinder AC. N-3 polyunsaturated fatty acids inhibit the antigen-presenting function of human monocytes. *Am J Clin Nutr.* 2000;71(Suppl 1):357S-60S.

Hughes DA, Pinder AC. N-3 polyunsaturated fatty acids modulate the expression of functionally associated molecules on human monocytes and inhibit antigen-presentation in vitro. *Clin Exp Immunol.* 1997;110(3):516-23.

Ikehata A, Hiwatashi N, Kinouchi Y, Yamazaki H, Kumagai Y, Ito K, et al. Effect of intravenously infused eicosapentaenoic acid on the leukotriene generation in patients with active Crohn's disease. *Am J Clin Nutr.* 1992;56(5):938-42.

Ikemizu S, Gilbert RJ, Fennelly JA, Collins AV, Harlos K, Jones EY, Stuart DI, Davis SJ. Structure and dimerization of a soluble form of B7-1. *Immunity*. 2000;12(1):51-60.

Inui K, Fukuta Y, Ikeda A, Kameda H, Kokuba Y, Sato M. The effect of alpha-linolenic acid-rich emulsion on fatty acid metabolism and leukotriene generation of the colon in a rat model with inflammatory bowel disease. *Ann Nutr Metab*. 1996;40(3):175-82.

Jensen GL, Mascioli EA, Seidner DL, Istfan NW, Domnitch AM, Selleck K, et al. Parenteral infusion of long- and medium-chain triglycerides and reticuloendothelial system function in man. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 1990;14(5):467-71.

Johnson JA 3rd, Griswold JA, Muakkassa FF. Essential fatty acids influence survival in sepsis. *J Trauma*. 1993;35(1):128-31.

Kew S, Mesa MD, Tricon S, Buckley R, Minihane AM, Yaqoob P. Effects of oils rich in eicosapentaenoic and docosahexaenoic acids on immune cell composition and function in healthy humans. *Am J Clin Nutr*. 2004;79(4):674-81.

Koch T, Duncker HP, Klein A, Neuhof H, Van Ackern K. Effects of omega-3 fatty acids on pulmonary vascular reaction: a therapeutical approach in critical illness. *Clin. Intensive Care*. 1993;4:10.

Kwok WW, Ptacek NA, Liu AW, Buckner JH. Use of class II tetramers for identification of CD4+ T cells. *J Immunol Methods*. 2002;268(1):71-81.

Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol*. 1996;14:233-58.

Linsley PS, Greene JL, Brady W, Bajorath J, Ledbetter JA, Peach R. Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity*. 1994;1(9):793-801.

Lotierzo PH, Waitzberg DL. Efeito das emulsões lipídica sobre o sistema imnológico. *Rev Bras Nutr Clin*. 1998;13:258-69.

MacFie J. The development of fat emulsions. *Nutrition*. 1999;15(7-8):641, 643-5.

MacFie J.. The development of fat emulsions. *Nutrition*. 1999; 15(7-8):641, 643-5.

Martin-Pena G, Culebras JM, De P, Barro-Ordovas JP, Catala-Pizarro R, Ruiz-Galiana J. Effects of 2 lipid emulsions (LCT versus MCT/LCT) on the fatty acid composition of plasma phospholipid: a double-blind randomized trial. *JPEN J Parenter Enteral Nutr*. 2002;26(1):30-41.

Mayer K, Gokorsch S, Fegbeutel C, Hattar K, Rosseau S, Walmrath D, et al. Parenteral nutrition with fish oil modulates cytokine response in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2003;167(10):1321-8.

McCann ME, Moore JN, Carrick JB, Barton MH. Effect of intravenous infusion of omega-3 and omega-6 lipid emulsions on equine monocyte fatty acid composition and inflammatory mediator production in vitro. *Shock*. 2000;14(2):222-8.

McCoy KD, Le Gros G. The role of CTLA-4 in the regulation of T cell immune responses. *Immunol Cell Biol*. 1999;77(1):1-10.

Muakkassa FF, Koruda MJ, Ramadan FM, Kawakami M, Meyer AA. Effect of dietary fish oil on plasma thromboxane B2 and 6-keto-prostaglandin F1 alpha levels in septic rats. *Arch Surg*. 1991;126(2):179-82.

Muthukumar A, Sun D, Zaman K, Barnes JL, Haile D, Fernandes G. Age Associated Alterations in Costimulatory and Adhesion Molecule Expression in Lupus-Prone Mice Are Attenuated by Food Restriction with n-6 and n-3 Fatty Acids. *J Clin Immunol*. 2004;24(5):471-80.

Nordenstrom J, Jarstrand C, Wiernik A. Decreased chemotactic and random migration of leukocytes during Intralipid infusion. *Am J Clin Nutr*. 1979;32(12):2416-22.

Omari KI, Dorovini-Zis K. Expression and function of the costimulatory molecules B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) in an in vitro model of the human blood--brain barrier. *J Neuroimmunol*. 2001;113(1):129-141.

Perrin PJ, Davis TA, Smoot DS, Abe R, June CH, Lee KP. Mitogenic stimulation of T cells reveals differing contributions for B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) costimulation. *Immunology*. 1997;90(4):534-42.

Pomposelli JJ, Flores E, Hirschberg Y, Teo TC, Blackburn GL, Zeisel SH, et al. Short-term TPN containing n-3 fatty acids ameliorate lactic acidosis induced by endotoxin in guinea pigs. *Am J Clin Nutr*. 1990;52(3):548-52.

Pscheidl EM, Wan JM, Blackburn GL, Bistrian BR, Istfan NW. Influence of omega-3 fatty acids on splanchnic blood flow and lactate metabolism in an endotoxemic rat model. *Metabolism*. 1992;41(7):698-705.

Rangachari M, Penninger JM. Negative regulation of T cell receptor signals. *Curr Opin Pharmacol*. 2004;4(4):415-22

Reissig D, Rassoul F, Salvetter J, Wagner O, Richter V. Effect of fatty acids on expression of endothelial leukocyte adhesion molecules. *Eur J Nutr*. 2003;42(4):224-7.

Robey E, Allison JP. T-cell activation: Integration of signal from the antigen receptor and costimulatory molecules. *Immunol Today*. 1995;16:306-10.

Rode HN, Szamel M, Schneider S, Resch K. Phospholipid metabolism of stimulated lymphocytes. Preferential incorporation of polyunsaturated fatty acids into plasma membrane phospholipid upon stimulation with concanavalin A. *Biochim Biophys Acta*. 1982;688(1):66-74.

Sampson MJ, Davies IR, Brown JC, Morgan V, Richardson T, James AJ, et al. n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation, monocyte adhesion molecule expression and pro-inflammatory mediators in Type 2 diabetes mellitus. *Diabet Med.* 2001;18(1):51-8.

Sandstrom K, Xu Z, Forsberg G, Nygren PA. Inhibition of the CD28-CD80 co-stimulation signal by a CD28-binding affibody ligand developed by combinatorial protein engineering. *Protein Eng.* 2003 ;16(9):691-7.

Sansom DM. CD28, CTLA-4 and their ligands: who does what and to whom? *Immunology.* 2000 ;101(2):169-77.

Sasaki T, Kanke Y, Kudoh K, Misawa Y, Shimizu J, Takita T. Effects of dietary docosahexaenoic acid on surface molecules involved in T cell proliferation. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1436(3):519-30.

Schauder P, Röhn U, Schäfer G, Korff G, Schenk HB. Impact of fish oil enriched total parenteral nutrition on DNA synthesis, cytokine release and receptor expression by lymphocytes in the postoperative period. *Br J Clin Nutr.* 2002;87(Suppl 1):S103-S110.

Sedman PC, Ramsden CW, Brennan TG, Guillou PJ. Pharmacological concentrations of lipid emulsions inhibit interleukin-2-dependent lymphocyte responses in vitro. *JPEN J Parenter Enteral Nutr.* 1990;14(1):12-7.

Sedman PC, Somers SS, Ramsden CW, Brennan TG, Guillou PJ. Effects of different lipid emulsions on lymphocyte function during total parenteral nutrition. *Br J Surg*. 1991;78(11):1396-9.

Shahinian A, Pfeffer K, Lee KP, Kundig TM, Kishihara K, Wakeham A, et al. Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice. *Science*. 1993;261(5121):609-12.

Slavik JM, Hutchcroft JE, Bierer BE. CD28/CTLA-4 and CD80/CD86 families: signaling and function. *Immunol Res*. 1999;19(1):1-24.

Sobrado J, Moldawer LL, Pomposelli JJ, Mascioli EA, Babayan VK, Bistrian BR, et al. Lipid emulsions and reticuloendothelial system function in healthy and burned guinea pigs. *Am J Clin Nutr*. 1985;42(5):855-63.

Szeinberg A, Messer G, Davidsohn J, Levanon M, Passwell JH. Studies on the effect of intralipid on human monocyte functions in vitro. *Isr J Med Sci*. 1986;22(11):791-6.

Tashiro T, Yamamori H, Takagi K, Hayashi N, Furukawa K, Nakajima N. n-3 versus n-6 polyunsaturated fatty acids in critical illness. *Nutrition*. 1998;14(6):551-3.

Torrinhas RM, Goto H, Gidlund M, Sales MM, Oliveira PA, Manzoni TJ, et al. Human monocytes/macrophages activation state influences the modulatory

effect of fish oil lipid emulsion on HLA-DR expression. Clin Nutr. 2003;22(S1):S42-3.

Torrinhas RS, Goto H, Giudlund M, Sales MM, Oliveira PA, Jacintho TM.; et al. Effect of multiples fatty acids parenteral lipid emulsion on the expression of functional immunological surface molecules on human monocytes/macrophages (MO). Clin Nutr. 2002;75:422.

Ulrich H, Pastores SM, Katz DP, Kvetan V. Parenteral use of medium-chain triglycerides: a reappraisal. Nutrition. 1996;12(4):231-8.

Unanue ER, Cerottini JC. Antigen presentation. FASEB J. 1989;3(13):2496-502.

Van der Heide JJ, Bilo HJ, Donker JM, Wilmink JM, Tegzess AM. Effect of dietary fish oil on renal function and rejection in cyclosporine-treated recipients of renal transplants. N Engl J Med. 1993;329(11):769-73.

Vandenborre K, Van Gool SW, Kasran A, Ceuppens JL, Boogaerts MA, Vandenberghe P. Interaction of CTLA-4 (CD152) with CD80 or CD86 inhibits human T-cell activation. Immunology. 1999;98(3):413-21.

Visioli F, Marangoni F, Moi D, Rise P, Galli C. In vitro differentiation of human monocytes to macrophages results in depletion of antioxidants and increase in n-3 fatty acids levels. FEBS Lett. 2000;471(1):75-7.

Waitzberg DL, Bellinati-Pires R, Salgado MM, Hypolito IP, Colieto G, Yagi O, et al. Effect of total parenteral nutrition with different lipid emulsion on human monocytes and neutrophil function. *Nutrition*, 1997;13(2):128-32.

Waitzberg DL, Bellinati-Pires R, Yamaguchi N, Massili-Oku S, Salgado MM, et al. Influence of medium-chain triglyceride-based lipid emulsion on rat polymorphonuclear cell functions. *Nutrition*. 1996;12(2):93-9.

Waitzberg DL, Bellinati-Pires R, Yamaguchi N. Efeito de emulsões de triglicérides de cadeia longa e média sobre funções de células polimorfonucleares de ratos. *Rev Bras Nutr Clin*. 1994;9:35-43.

Waitzberg DL, Lotierzo PH, Logullo AF, Torrinhas RS, Pereira CC, Meier R. Parenteral lipid emulsions and phagocytic systems. *Br J Nutr*. 2002;87 Suppl 1:S49-57.

Waitzberg DL, Yamaguchi N, Bellinati-Pires R, Leone MC, Masili-Oku SM, Salgado MM, et al. Efeito de emulsões lipídicas sobre os mecanismos de defesa orgânica na agressão infecciosa. *Rev. Hosp. Clin*. 1992;47:215-22.

Walunas TL, Bluestone JA. CTLA-4 regulates tolerance induction and T cell differentiation in vivo. *J Immunol*. 1998;160(8):3855-60.

Wanten GJ, Naber AH, Kruimel JW, Tool AT, Roos D, Jansen JB. Influence of structurally different lipid emulsions on human neutrophil oxygen radical production. *Eur J Clin Invest*. 1999;29(4):357-63.

Wanten GJ, Roos D, Naber AH. Effects of structurally different lipid emulsions on human neutrophil migration. *Clin Nutr.* 2000;19(5):327-31.

Weiss G, Meyer F, Matthies B, Pross M, Koenig W, Lippert H. Immunomodulation by perioperative administration of n-3 fatty acids. *Br J Clin Nutr.* 2002;87(Suppl 1):S89-S94.

Yamashita A, Sugiura T, Waku K. Acyltransferases and transacylases involved in fatty acid remodeling of phospholipids and metabolism of bioactive lipids in mammalian cells. *J Biochem.* 1997;122(1):1-16.

Yaqoob P. Fatty acids and the immune system: from basic science to clinical applications. *Proc Nutr Soc.* 2004;63(1):89-104.

Zhou XY, Yashiro-Ohtani Y, Nakahira M, Park WR, Abe R, Hamaoka T, et al. Molecular mechanisms underlying differential contribution of CD28 versus non-CD28 costimulatory molecules to IL-2 promoter activation. *J Immunol.* 2002;168(8):3847-54.