



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL

BRUNO SAMPAIO

**EFEITOS DA OBESIDADE SOBRE PARÂMETROS  
IMUNOLÓGICOS E HEMATOLÓGICOS DE RATAS  
SUBMETIDAS À ENDOTOXEMIA**

RECIFE/PE

2012

BRUNO SAMPAIO

**EFEITOS DA OBESIDADE SOBRE PARÂMETROS  
IMUNOLÓGICOS E HEMATOLÓGICOS DE RATAS  
SUBMETIDAS À ENDOTOXEMIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Medicina Tropical

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dra<sup>a</sup>. Maria do Amparo Andrade

**Co-orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dra<sup>a</sup> Célia Maria Machado Barbosa de Castro

**RECIFE/PE**

**2012**

Catálogo na Publicação (CIP)  
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S192e Sampaio, Bruno.  
Efeitos da obesidade sobre parâmetros imunológicos e hematológicos de ratas submetidas à endotoxemia / Bruno Sampaio. – Recife: O autor, 2012.  
68 folhas: il. ; tab.; 30 cm.

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Maria do Amparo Andrade.  
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS, Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2012.  
Inclui bibliografia e anexos.

1. Obesidade. 2. Imunidade. 3. Macrófagos Alveolares. 4. Endotoxemia. I. Andrade, Maria do Amparo (Orientadora). II. Título.

618.9883 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2012-217)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO (UFPE)  
PRÓ-REITORIA PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO (PROPESQ)  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE (CCS)  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL (PPGMEDTROP)

## RELATÓRIO DA BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DO MESTRANDO

BRUNO SAMPAIO

No dia 19 de julho de 2012, às 09h00, na Sala de Aula do Departamento de Medicina Tropical do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco (CCS/UFPE), os Membros Doutores: a Profª. Drª. Maria Amélia Vieira Maciel – Presidente da Banca (UFPE), a Profª. Drª. Débora Catarine Nepomuceno de Pontes Pessoa (UFPE) e a Profª. Drª. Flávia Regina Gonçalves de Araújo (UFPE), componentes da Banca Examinadora, em sessão pública, arguiram o mestrando **BRUNO SAMPAIO** sobre a sua Dissertação intitulada “EFEITOS DA OBESIDADE SOBRE PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS E HEMATOLÓGICOS DE RATAS SUBMETIDAS À ENDOTOXEMIA”, o qual foi orientado pela Profª. Dra. Maria do Amparo Andrade (UFPE). Ao final da arguição de cada membro da Banca Examinadora e resposta do mestrando, as seguintes menções foram publicamente fornecidas.

Profª. Drª. Maria Amélia Vieira Maciel

Aprovado

Profª. Drª. Débora Catarine Nepomuceno de Pontes Pessoa

APROVADO

Profª. Drª. Flávia Regina Gonçalves de Araújo

APROVADO

*Profª. Drª. Maria Amélia Vieira Maciel*

*Profª. Drª. Débora Catarine Nepomuceno de Pontes Pessoa*

*Profª. Drª. Flávia Regina Gonçalves de Araújo*



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA TROPICAL**

**REITOR**

Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

**PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO**

Francisco de Sousa Ramos

**DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Nicodemus Teles de Pontes Filho

**COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM MEDICINA TROPICAL**

Maria Rosângela Cunha Duarte Coêlho

**VICE-COORDENADORA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO  
EM MEDICINA TROPICAL**

Valdênia Maria Oliveira de Souza

**CORPO DOCENTE**

Ana Lúcia Coutinho Domingues

Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Edmundo Pessoa de Almeida Lopes Neto

Fábio André dos Santos Brayner

Heloísa Ramos Lacerda de Melo

Maria Amélia Vieira Maciel

Maria de Fátima Pessoa Militão de Albuquerque

Maria do Amparo Andrade

Maria Rosângela Cunha Duarte Coelho

Marli Tenório Cordeiro

Ricardo Arraes de Alencar Ximenes

Valdênia Maria Oliveira de Souza

Vera Magalhães de Silveira

Vláudia Maria Assis Costa

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho às minhas orientadoras, às pessoas que trabalharam nesta pesquisa e à minha família.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares, que sempre acreditaram no meu potencial. Sou grato por todos os incentivos, oportunidades e condições para que eu pudesse crescer na vida.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria do Amparo Andrade, por todo apoio, carinho, confiança e por sempre mostrar-se à disposição em poder ajudar.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Célia Castro, pela oportunidade de trabalhar no LIKA e pelos ensinamentos, paciência e carinho comigo e seus outros alunos.

À equipe: Karla Melo: pelo apoio, incentivo e atenção comigo e com os meus experimentos, cuidando como se seus fossem. Rosângela Rosendo: a qual sempre se mostrou disponível para participar dos experimentos, ajudando em dias de experimento e em alguns cálculos deste estudo. Patrícia Pereira: pela mão estendida nos experimentos e quando era solicitada. Vanessa: a qual já fazia parte da equipe, ajudando-me bastante, em todas as etapas dos experimentos, não importando qual dia e hora fossem. Clarisse Ataíde: que entrou depois, mas que foi muito útil nos experimentos finais deste trabalho.

A todos os amigos e amigas da Microbiologia do LIKA, pelo aprendizado, ajudas, oportunidades, paciência, momentos que jamais serão esquecidos...Sou grato à todos vocês!

A todos os colegas de turma do mestrado e doutorado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical, pela oportunidade de fazer parte do programa mestrado e por deixar que seguisse adiante com as minhas pesquisas.

À Capes, pelo auxílio financeiro.

Ao Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami (LIKA), pelos espaços e materiais oferecidos para realização da pesquisa.

Ao querido Dr. França, pela ajuda e aprendizado não só de biotério, mas de vida também.

Ao amigo Walter, pela falta de burocracia e por ter resolvido vários problemas durante o meu mestrado.

À Profa. Daniela Brunaska e ao Prof. Giovani, por terem me fornecido acesso e disponibilidade aos seus laboratórios, essenciais para o andamento das pesquisas.

A todos que participaram de alguma forma para que este estudo pudesse ser realizado.

## RESUMO

SAMPAIO, Bruno. **Efeitos da Obesidade Sobre Parâmetros Imunológicos e Hematológicos de Ratas Submetidas à Endotoxemia**. 2012. 68 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Tropical) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, 2012.

Atualmente, a obesidade é considerada um importante problema de saúde pública mundial. Notavelmente, o aumento da prevalência desta síndrome está sendo associado ao surgimento de inúmeras doenças secundárias (co-morbidades) que prejudicam a qualidade de vida e agravam o prognóstico de indivíduos e pacientes, tornando-os mais predisponentes à doenças inflamatórias e infecções. Trata-se de uma condição metabólica complexa, que influencia diversos sistemas fisiológicos, inclusive o sistema imune. O tecido adiposo, que antes era conhecido por funções de armazenamento de energia, vem sendo descrito ultimamente como importante órgão endócrino, capaz de secretar uma gama de moléculas pró e anti-inflamatórias (inclusive citocinas), as quais exercem atividade direta sobre os componentes do sistema imune. Com base nesse contexto, a presente pesquisa se propôs a avaliar o efeito e as consequências da obesidade sobre parâmetros do sangue e do sistema imune, como a funcionalidade de macrófagos alveolares, em ratas adultas submetidas à endotoxemia. Neste estudo, ratas *Wistar* (n=32) foram divididas em dois grupos, segundo regime dietético empregado: Grupo Dieta Padrão (DP), formado por animais que receberam dieta padrão do biotério, Labina (Purina do Brasil S/A), durante 18 semanas e Grupo Dieta Hiperlipídica (DH), composto por animais que receberam dieta palatável hiperlipídica por um período de 18 semanas (148 dias). No 147º dia, os grupos iniciais foram subdivididos em endotoxêmicos (DPE e DHE) e não endotoxêmicos (DH e DP). A obtenção dos grupos endotoxêmicos foi feita com aplicação intraperitoneal de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) na dose 1mg/Kg de peso corporal. Após 24h, foram realizadas a obtenção de sangue periférico para contagem de leucócitos e hemácias, a retirada do lavado broncoalveolar (LBA) e a retirada da gordura abdominal para posterior pesagem. Alíquotas do LBA foram extraídas para a análise da contagem total e diferencial de leucócitos. Após, o LBA foi centrifugado para obtenção dos macrófagos alveolares (MA). Foi efetuado o estudo da atividade microbicida dos MA, através da taxa de fagocitose e da produção de óxido nítrico (ON), através da medida indireta da dosagem dos nitritos e nitratos nos cultivos celulares. Foram realizados também testes de viabilidade celular. A análise estatística foi efetuada com os testes MANOVA e ANOVA. Os resultados revelam que o consumo de dieta hiperlipídica não gerou aumento no ganho ponderal, todavia promoveu incremento da quantidade de gordura visceral. A obesidade, gerada pela indução da dieta hiperlipídica, acarretou um aumento na quantidade de hemácias e neutrófilos do sangue periférico e na quantidade de neutrófilos e linfócitos no local da infecção. Surpreendentemente, as atividades microbicidas dos MA de ratas obesas permaneceram semelhantes e intactas, mesmo na presença da endotoxemia.

Palavras-chave: Obesidade, imunidade, macrófagos alveolares, endotoxemia

## ABSTRACT

SAMPAIO, Bruno. **Effects of obesity on immunological and hematological parameters of rats subjected to endotoxemia.** 2012. 68 f. Dissertation (Master in Tropical Medicine) – Health Sciences Center, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, 2011.

Obesity is considered an important public health problem worldwide. Remarkably, the increased prevalence of this syndrome is associated with the emergence of numerous secondary illnesses (comorbidities) that affect the population quality of life and worsen the prognosis of patients, becoming them more predisposing inflammatory diseases and infections. This is a complex metabolic condition that influences many physiological systems, including the immune system. Adipose tissue, which was previously known as functions of energy storage, has been described recently as an important endocrine organ capable of secreting a range of molecules pro and anti-inflammatory (including cytokines), which exert direct activity on the components of immune system. Based on this background, the present study aimed to evaluate the effect and consequences of obesity on blood parameters and immune system, as the functionality of alveolar macrophages in adult rats subjected to endotoxemia. In this study, female *Wistar* rats ( $n = 32$ ) were divided into two groups according to dietary employee: Standard Diet Group (SD), formed by animals fed the standard diet Labina (Purina of Brazil S/A) of our bioterium for 18 weeks and Hyperlipidic Diet Group (HD), composed of animals fed high-fat palatable diet for a period of 18 weeks (148 days). At 147 days, the initial groups were subdivided into endotoxemic (ESD and EHD) and not endotoxemic (SD and HD). To obtain endotoxemic groups was made with intraperitoneal application of bacterial lipopolysaccharide (LPS) at a dose 1mg/kg body weight. After 24 hours, were conducted to obtain peripheral blood leukocyte count and red blood cells, the removal of bronchoalveolar lavage (BAL) and the removal of abdominal fat for later weighing. BAL aliquots were taken for analysis of total and differential count of leukocytes. After the BAL was centrifuged to obtain alveolar macrophages (AM). Was performed to study the microbicidal activity of MA through rate of phagocytosis and the production of nitric oxide (NO) by indirect measurement of the dosage of nitrites and nitrates in cell cultures. Tests were also performed cell viability. Statistical analysis was performed with ANOVA and MANOVA tests. The results show that consumption of high-fat diet did not cause increased weight gain, however promoted increased visceral fat. Obesity, generated by inducing high fat diet, caused an increase in the number of erythrocytes and neutrophils from peripheral blood and the number of neutrophils and lymphocytes at the site of infection. Surprisingly, the activities of microbicides MA of obese rats remained intact and the like, even in the presence of endotoxemia.

Keywords: Obesity, immunity, alveolar macrophage, endotoxemia

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1:</b> Organograma geral da distribuição dos grupos.....	33
<b>Figura 2 :</b> Preparação da dieta hiperlipídica.....	34
<b>Figura 3:</b> Procedimentos da retirada do lavado broncoalveolar.....	37
<b>Figura 4:</b> Amostra de lavado broncoalveolar diluída em Corante Azul de Tripan..	37
<b>Figura 5:</b> Citocentrífuga (Cytopro™-Cytocentrifuge Wescor).....	38
<b>Figura 6:</b> Centrifugação do lavadobroncoalveolar.....	39

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Composição da dieta padrão do biotério Labina (Labina-Purina do Brasil).....	34
<b>Tabela 2</b> – Composição da dieta hiperlipídica.....	35
<b>Tabla 3</b> – Ingredientes necessários para confecção de 1,0 kg de dieta hiperlipídica.....	35

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acpr30	Adiponectina
CFU-GM	Unidades Formadoras de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
c-NOS	Nitric Oxide Sintase Constitutive (Óxido Nítrico sintase constitutiva)
DP	Grupo Dieta Padrão
DH	Grupo Dieta Hiperlipídica
DPE	Grupo Dieta Padrão Endotoxêmico
DHE	Grupo Dieta Hiperlipídica Endotoxêmico
DMSO	Dimetilsulfóxido
EDTA	Ácido etileno diaminoacético
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Ensaio Imunoenzimático)
HB	Hemoglobina
IL	Interleucina
i-NOS	Nitric Oxide Sintase Induvible (Óxido Nítrico sintase induzida)
LBA	Lavado Broncoalveolar

LIKA	Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami
LP	Leptina
LSP	Lipopolissacarídeo
MA	Macrófagos Alveolares
NF-KB	Fator KB (immune-stimulatory transcription factor nuclear factor)
NK	Células Natural Killer
NO	Nitric Oxide (Óxido Nítrico)
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-brometo de difenil tetrazólico
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Phosphate Buffered Saline (Solução tampão de fosfato)
RPMI	Meio de Cultura do Roswell Park Memorial Institute
TAB	Tecido adiposo branco
TAM	Tecido adiposo marron
TF	Taxa de fagocitose
TG	Triglicerídeos
TNF	Fator de Necrose Tumoral
WHO	World Health Organization

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	15
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	17
2.1 OBESIDADE .....	17
<b>2.1.1 Definição e epidemiologia .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1.2 Etiologia da obesidade .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1.3 Co-morbidades associadas à obesidade .....</b>	<b>18</b>
2.2 MODELOS DE INDUÇÃO DA OBESIDADE EM ANIMAIS E DIETA HIPERLIPÍDICA ..	19
2.3 TECIDO ADIPOSO E ADIPOCINAS.....	19
<b>2.3.1 Tecido adiposo .....</b>	<b>19</b>
<b>2.3.2 Adipocinas .....</b>	<b>21</b>
2.3.2.1 Leptina (Lp).....	21
2.3.2.2 Adiponectina (acpr30).....	22
2.3.2.3 Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ).....	23
2.3.2.4 Interleucina 6 (IL-6).....	23
2.3.2.5 Moléculas do complemento .....	23
2.4 SISTEMA IMUNE .....	24
<b>2.4.1 Visão geral.....</b>	<b>24</b>
<b>2.4.2 Reação Inflamatória .....</b>	<b>25</b>
<b>2.4.3 Macrófagos.....</b>	<b>25</b>
2.4.3.1 Fagocitose.....	26
2.4.3.1 Óxido Nítrico.....	27
2.5 LIPOPOLISSACARÍDEO E ENDOTOXEMIA.....	27
2.6 OBESIDADE E DOENÇAS INFECCIOSAS .....	28
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>30</b>
3.1 OBJETIVO GERAL.....	30
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
<b>4. ANIMAIS, MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>31</b>
4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	31
4.2 DESENHO DO ESTUDO .....	31
4.3 ANIMAIS .....	31
4.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	32
4.5 DIETA HIPERLIPÍDICA PALATÁVEL.....	33
4.6 AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL.....	35
4.7 COLETA DE SANGUE PERIFÉRICO E ANÁLISES DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.....	36

4.8 ANÁLISE DAS CÉLULAS DO LAVADO BRONCOALVEOLAR.....	36
<b>4.8.1 Obtenção do Lavado Broncoalveolar (LBA) .....</b>	<b>36</b>
<b>4.8.2 Contagem total de leucócitos do LBA.....</b>	<b>37</b>
<b>4.8.3 Contagem diferencial de leucócitos do LBA .....</b>	<b>38</b>
<b>4.8.4 Cultura de macrófagos alveolares .....</b>	<b>38</b>
4.9 OBTENÇÃO DA GORDURA VISCERAL.....	39
4.10 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ON.....	39
<b>4.10.1 Construção da curva padrão .....</b>	<b>40</b>
<b>4.10.2 Processo de revelação da curva padrão e das amostras .....</b>	<b>40</b>
4.11 DETERMINAÇÃO DA TAXA DE CAPACIDADE FAGOCÍTICA.....	41
4.12 VIABILIDADE CELULAR (ENSAIO MTT).....	42
4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	42
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>44</b>
5.1 ARTIGO CIENTÍFICO .....	44
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS DA DISSERTAÇÃO .....</b>	<b>60</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>60</b>
<b>ANEXO 1 - Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal.....</b>	<b>67</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença multifatorial crônica, sendo definida como um acúmulo de gordura pelo organismo num nível que compromete a saúde dos indivíduos, consequente aos desequilíbrios da homeostase energética do organismo (WHO, 2005; SHILLS et al, 2008). Atualmente é considerada um dos maiores problemas de saúde pública, repercutindo negativamente na saúde dos indivíduos por conta das suas co-morbidades (MATARESE et al, 2010).

Notavelmente, o aumento da prevalência desta síndrome está sendo associado ao surgimento de inúmeras doenças secundárias (co-morbidades) que prejudicam a qualidade de vida e agravam o prognóstico de indivíduos e pacientes, tornando-os mais predisponentes à doenças inflamatórias e infecções. Trata-se de uma condição metabólica complexa, que influencia diversos sistemas fisiológicos, inclusive o sistema imune, sistema bastante sensível às alterações na homeostase (SAMARTÍN; CHANDRA, 2001; FÁLAGAS; MATARESE et al, 2010).

Neste contexto, o tecido adiposo, responsável pelo armazenamento de energia, tem sido reconhecido como um importante órgão endócrino com participação ativa tanto no processo inflamatório como na resposta imune, principalmente através da produção e liberação de uma variedade de fatores pró e anti-inflamatórios, denominados de adipocitocinas que incluem: a leptina, a adiponectina e diversas citocinas (FANTUZZI, 2005; COSTA; DUARTE, 2006). A secreção dessas moléculas e os mecanismos de comunicação do tecido adiposo com as células do sistema imune estão relacionados com a massa de tecido adiposo. Portanto, as alterações nutricionais e o desequilíbrio na homeostase do tecido adiposo podem modificar o padrão de síntese desses mensageiros e consequentemente interferir na função de células imunológicas (FANTUZZI, 2005; FAGGIONI; FEINGOLD; GRUNFELD, 2001).

A administração de dieta hipercalórica e hiperlipídica para induzir obesidade é um modelo simples e possivelmente, um dos que mais se assemelha à realidade da obesidade nos seres humanos. As evidências sugerindo que a obesidade seja uma doença inflamatória tornam-se motivo de preocupação em pacientes (ALVES, 2006; FÁLAGAS; KOMPOTI, 2006).

Paralelamente, o estudo das manifestações nas alterações fisiológicas durante um processo infeccioso por bactérias pode ser realizado através da utilização de modelos animais. A administração parenteral de lipopolissacarídeo bacteriano (LPS) tem sido amplamente utilizada como modelo de infecção por mimetizar a reação generalizada de defesa do organismo frente à sepse, reproduzindo os sintomas clínicos observados em pacientes com septicemia por bactérias Gram-negativas. Todo o processo inicia-se, nesse modelo de administração do LPS, a partir do foco infeccioso ou da disseminação da endotoxina administrada na cavidade peritoneal (BENJAMIM, 2001; MELO et al., 2010).

Os macrófagos são fundamentais para o desenvolvimento, a amplificação e a resolução da reação inflamatória, por suas funções fagocítica, microbicida e capacidade de sintetizar e secretar uma grande variedade de mediadores inflamatórios como citocinas e quimiocinas (RUBINS, 2003). Particularmente, o macrófago é bastante sensível aos efeitos da endotoxina, tanto que a superestimulação das vias de sinalização monocíticas por LPS pode levar a uma inflamação sistêmica, resultando em sepse ou choque (ROBERT; SPITZER, 1997).

Com base nesse contexto, a realização de trabalhos, como o nosso, associando a obesidade com a resposta imune frente à processos infecciosos podem dar esclarecimentos a cerca de alguns aspectos que envolvam a resposta imune com alterações metabólicas. Além de fornecer resultados proveitosos que enriquecerão a literatura científica e poderão dar suporte as bases para a definição de medidas de tratamento e controle das doenças infecciosas em indivíduos obesos.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 OBESIDADE

#### 2.1.1 Definição e epidemiologia

A obesidade é considerada uma doença integrante do grupo de Doenças Crônicas Não-Transmissíveis (PINHEIRO; FREITAS; CORSO, 2004) e está se tornando motivo crescente de preocupação no mundo ocidental (JAMES, 2008).

O conceito de obesidade é baseado no Índice de Massa Corporal (IMC;  $\text{kg/m}^2$ ). A Organização Mundial de Saúde (OMS) define obesidade como um IMC maior ou igual a  $30 \text{ Kg/m}^2$  e sobrepeso como um IMC maior ou igual a  $25 \text{ Kg/m}^2$  (WHO, 2000). Atualmente, sabe-se que a localização abdominal da gordura (obesidade central ou visceral) está mais correlacionada a distúrbios metabólicos e risco cardiovascular. Medidas da circunferência da cintura ou da razão entre as circunferências da cintura e do quadril são capazes de fornecer estimativas da gordura abdominal, que, por sua vez, está correlacionada à quantidade de tecido adiposo visceral (FORMIGUERA; CANTO'N, 2004).

A prevalência e a incidência da doença estão crescendo rapidamente. Pesquisas revelam que aproximadamente 1,6 bilhões de pessoas estão com sobrepeso, das quais cerca de 400 milhões desses indivíduos estão obesos. Estima-se que em 2015, cerca de 2,3 bilhões de adultos terão sobrepeso e 700 milhões serão obesos (WHO, 2006).

Sabidamente, a obesidade tornou-se um problema de saúde pública tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento (SEIDELL, 2006). Nos Estados Unidos calcula-se que a prevalência de obesidade seja de 32,2% para homens adultos e 35,5% para mulheres adultas, percentuais esses que se elevam para 72,3% e 64,1%, respectivamente, quando se trata de sobrepeso e obesidade, resultando em aproximadamente 300.000 mortes por ano (FLEGAL et al, 2010). Este número é superior às mortes decorrentes de acidentes no trânsito e de HIV/AIDS, com 42.643 e 15.798 óbitos, respectivamente (LASH; ARMSTRONG, 2009).

No Brasil, a obesidade está presente em 16,9% das mulheres e 12,4% dos homens. Quando inclusos os casos de sobrepeso, estes valores elevam-se para 48% das mulheres e 50,1% dos homens (IBGE, 2010). Estimativas revelam que, em 2025, o Brasil será o quinto país no mundo a ter problemas de obesidade em sua população (ROMERO; ZANESCO, 2006).

### **2.1.2 Etiologia da obesidade**

Múltiplos fatores têm sido apontados como promotores do desenvolvimento da obesidade, condição que normalmente deriva da interação de fatores genéticos com a abundante quantidade de calorias ingeridas e o reduzido gasto de calorias destinadas à geração de energia. Trata-se, portanto, de um desequilíbrio na homeostase energética, gerando um acúmulo excessivo de gordura pelo organismo. Além disso, distúrbios metabólicos, fatores neuroendócrinos bem como influências psicológicas e comportamentais, como o hábito de consumir alimentos excessivamente energéticos, mas pobres em micronutrientes associado à redução da prática de atividade física são as causas comumente apontadas como geradores dessa patologia (SAMARTÍN; CHANDRA, 2001; MATARESE, 2005; JEBB, 2004; SHILLS et al., 2008).

### **2.1.3 Co-morbidades associadas à obesidade**

A obesidade tem sido associada ao surgimento de inúmeras co-morbidades que prejudicam a qualidade de vida dos indivíduos e agravam o prognóstico de pacientes. Dentre elas, destacam-se o Diabetes Não-Insulino-Dependente (Tipo 2), hipertensão, dislipidemias, diversos tipos de câncer e doenças cardiovasculares, além de alterações no sistema imune (AHMED et al., 1999; LASH; ARMSTRONG, 2009). Todas essas condições patológicas parecem ser consequência de um estado crônico de baixo grau de inflamação, mediado por mecanismos metabólicos e inflamatórios (MATARESE; LA CAVA, 2005; TILG; MOSCHEN, 2006). A obesidade está também associada à problemas psicossociais, como depressão e estresse

relacionados à questão da discriminação a indivíduos sob esta condição patológica (BENSON et al., 2009).

## 2.2 MODELOS DE INDUÇÃO DA OBESIDADE EM ANIMAIS E DIETA HIPERLIPÍDICA

A obesidade em humanos é primariamente o resultado de uma desigualdade entre a entrada e o consumo de calorias. Em animais, os modelos mais utilizados para indução de obesidade são: a lesão do núcleo hipotalâmico ventromedial através da administração de glutamato monossódico ou lesão elétrica direta, ooforectomia, alimentação com dietas hipercalóricas e manipulação genética para obesidade (VON DIEMEN; TRINDADE; TRINDADE, 2006).

A grande similaridade e homologia genética dos roedores e dos humanos permitem que os modelos animais sejam uma importante alternativa para estudos de diversas condições que afetam os seres humanos. A obesidade, assim, pode ser induzida, simulada e seus efeitos estudados em ratos. Segundo esses mesmos autores, alterações neuroendócrinas, genéticas e dietéticas podem produzir essa condição em animais, sendo o modelo dietético o mais simples e o mais análogo da realidade da doença no homem (VON DIEMEN; TRINDADE; TRINDADE, 2006). Diversos tipos de dietas têm sido utilizados com sucesso para a reprodução de modelos experimentais da obesidade (ESTADELLA et al., 2004; DUARTE et al., 2006; SILVA, 2010).

## 2.3 TECIDO ADIPOSEO E ADIPOCINAS

### 2.3.1 Tecido adiposo

O tecido adiposo é um tipo especializado de tecido conjuntivo frouxo, onde há predominância de células armazenadoras de gorduras neutras (ou triglicérides), denominadas adipócitos. Essas células podem ser encontradas no tecido conjuntivo frouxo, no entanto a maior parte está agrupada no tecido adiposo distribuído pelo corpo (HAM; COMACK, 1991; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

Como os mamíferos consomem energia de modo contínuo, mas se alimentam intermitentemente, torna-se importante a presença de um reservatório de energia, representado pelo tecido adiposo. Além dessa função clássica, há outras também tradicionais, como a de isolante térmico e preenchimento de espaços entre tecidos, servindo para proteção e sustentação dos órgãos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). Na classe *Mammalia*, estão presentes duas variedades de tecido adiposo: o branco (TAB) e o marrom (TAM). O TAB está presente periféricamente nas regiões subcutânea e visceral e é responsável pela regulação do balanço energético mediante processos de lipogênese e lipólise. Histologicamente, é composto por adipócitos, células imunológicas, tecido conjuntivo, nervoso e vascular. O TAM está localizado no sistema nervoso central e apresenta função termogênica, é mais vascularizado, possui maior número de mitocôndrias e diminui com a idade (LEITE; ROCHA; BRANDÃO-NETO, 2009).

O TAB, antes considerado como órgão passivo de energia, é considerado atualmente um importante órgão endócrino metabolicamente ativo (COSTA; DUARTE, 2006). Isto porque em 1994, foi descoberta uma proteína com funções endócrinas que é produzida no tecido adiposo, a Leptina (Lp). Seu gene (*ob*) foi clonado por Friedman e colaboradores e desde então, revolucionou os conceitos sobre a biologia do tecido adiposo (MATARESE; LA CAVA, 2005).

Com base em estudos das últimas duas décadas, considera-se atualmente o tecido adiposo como um órgão multifuncional que produz peptídeos e moléculas bioativas, reconhecidas com adipocinas (GUIMARÃES et al., 2007). Estas têm ações diversas, podendo-se agrupá-las de acordo com a sua principal função em adipocinas com função imunológica, cardiovascular, metabólica e endócrina (MAFRA; FARAGE, 2006).

Como órgão secretor, o tecido adiposo apresenta diversas peculiaridades. Encontra-se disperso pelo organismo, em depósitos isolados e sem ligação física entre si, sendo suas atividades de secreção de moléculas regulada por mecanismos hormonais e humorais, ainda sem total esclarecimento (COSTA; DUARTE, 2006). Em tais depósitos individuais, estão presentes macrófagos, fibroblastos, pré-adipócitos e adipócitos secretores de adipocinas. Esses fatores não são produzidos exclusivamente no tecido adiposo, sendo secretado por outros tecidos e por isso é difícil determinar exatamente a sua contribuição para os níveis de adipocinas circulantes (FANTUZZI, 2005; BERG; SCHERER, 2005).

Algumas dessas moléculas secretadas estão ativamente implicadas na regulação da função imune, um exemplo já conhecido é o da Lp (AHIMA e FLIER, 2000). As evidências apontam que a Lp pode estar envolvida na deficiência da resposta imune humoral e celular, mas isso não está totalmente esclarecido. O peptídeo Adiponectina é também secretado pelo adipócito e participa na resposta imune atuando como protetor da inflamação (RUDIN e BARZILAI, 2005). As Interleucinas, como a Interleucina-6 (IL-6) e a Interleucina-8 (IL-8), e o Fator de necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ) e os fatores do complemento B, C3 e D são os componentes de participação direta no sistema imune que são também secretados pelo tecido adiposo (OTERO et al., 2005; BERG; SCHERER, 2005).

Por estas razões, a obesidade tem sido caracterizada como um estado de baixo grau de inflamação crônica, capaz de aumentar a suscetibilidade de adquirir infecções, a incapacidade em combatê-las, elevar a disposição para desenvolver doenças auto-imunes e doenças inflamatórias de caráter crônico (MATARESE; LA CAVA, 2005; ALVES, 2006).

### **2.3.2 Adipocinas**

#### **2.3.2.1 Leptina (Lp)**

A Lp é um hormônio polipeptídico codificado pelo gene obesidade (*ob*) que é expresso principalmente nos adipócitos, tanto de seres humanos quanto de roedores (ZHANG *et al.* 1994; CAMPFIELD *et al.* 1995).

O “hormônio da saciedade”, como é conhecida a Lp, age como um sinal aferente para o sistema nervoso central (SNC) através de um *feedback* negativo que inibe a expressão de seus genes, e posteriormente controla a ingestão alimentar, regula o tecido adiposo, peso corporal e apetite (BENATTI; LANCH JR, 2007).

A produção de Lp é regulada pelas alterações induzidas pela insulina no adipócito e os seus níveis correlacionam-se com a massa de tecido adiposo (HAVEL, 2004). A sua ligação a receptores hipotalâmicos, transmitem informação relativa à massa de tecido adiposo e depósitos energéticos existentes (SILVEIRA et

al, 2009). Adipócitos secretam Lp em proporção direta a massa de tecido adiposo, bem como o estado nutricional. Assim, quanto maior a quantidade de tecido adiposo, maior a concentração de leptina produzida e liberada (FONSECA-ALANIZ et al, 2006).

Evidências têm sugerido que a leptina também possui um papel modulador da resposta imune, atuando em processos inflamatórios e patologias imuno-mediadas. Segundo Fantuzzi (2005), a leptina aumenta, em monócitos e macrófagos, a síntese de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-12, além de estimular a ativação de neutrófilos e a proliferação de monócitos *in vitro* circulantes.

Além disso, a hiperleptinemia presente na obesidade está associada a uma resistência à leptina, gerando prejuízos na resposta imune (ALVES, 2006). A obesidade é caracterizada por um estado central de resistência à Lp (JUGE-AUBRY; MEIER, 2002). As células T reconhecem esse quadro de deficiência, o que gera uma disfunção do imunológico similar à da desnutrição (SILVEIRA et al. 2009).

#### 2.3.2.2 Adiponectina (acpr30)

A acpr30 é uma proteína sintetizada exclusivamente pelos adipócitos e seus níveis estão inversamente relacionados à obesidade e Insulino-Resistência (PRINS, 2002; BERG; SCHERER, 2005).

De acordo com Fantuzzi (2005), a adiponectina apresenta função imunológica anti-inflamatória, que é resultado da supressão da síntese TNF- $\alpha$ , IL-6, e consequente indução da síntese de IL-10, agindo como proteção para distúrbios cardiovasculares e aumentando a sensibilidade à insulina (FANTUZZI, 2005; COSTA; DUARTE, 2005). Além disso, inibe a ativação do fator kB (NF-kB) em células endoteliais e interfere na função de macrófagos (OUCHI et al, 1999).

A Acrp30 também inibe a proliferação de precursores de mielo-monócitos, suprime a função de macrófagos maduros, a fagocitose e a produção de citocinas (YOKOTA et al., 2000). Em contrapartida, a produção local pelos adipócitos de algumas citocinas, como IL-6 e TNF- $\alpha$  inibe a secreção e expressão de adiponectina, sendo os níveis dessas moléculas no plasma inversamente correlacionados (ALVES, 2006).

### 2.3.2.3 Fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ )

O TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória produzida pelos tecidos muscular, adiposo e linfóide, com papel central na defesa do organismo, assim como no metabolismo lipídico, através da diminuição da diferenciação dos pré-adipócitos e indução da apoptose (*in vitro*) e da lipólise (*in vitro* e *in vivo*), regulando a massa de tecido adiposo. O TNF-  $\alpha$  está associado à Insulino-Resistência, observando-se valores elevados na obesidade que diminuem com a perda de peso (XU et al., 2003; GERKHE; PEREIRA, 2007).

### 2.3.2.4 Interleucina 6 (IL-6)

A IL-6 é uma citocina imuno-moduladora com ação pró-inflamatória e endócrina. O tecido adiposo é a principal fonte de IL-6 circulante nos estados não inflamatórios (PRINS, 2005; FANTUZZI, 2005). Também ocorre secreção de IL-6 à nível de hipotálamo onde se pensa que desempenha um papel na regulação do apetite e no gasto energético. Atribui-se a ela um papel no metabolismo dos lípidios e da glucose. Inibe a lipoproteína lipase, induz a lipólise e aumenta a captação de glucose. Os seus níveis estão aumentados na obesidade (tanto os séricos como os do tecido adiposo) e diminuem com a perda de peso. É também marcador de Insulino-Resistência (PRINS, 2005; BERG; SCHERER, 2005).

### 2.3.2.5 Moléculas do complemento

As moléculas de complemento foram as primeiras proteínas produzidas pelos adipócitos a serem identificadas. No tecido adiposo, há produção de fator B, fator C3 e fator D. A presença dos fatores B e D é necessária à síntese de fator C3a, a partir de C3. (XU et al., 2003; PRINS, 2005). Esta proteína intervém na síntese e armazenamento de triglicerídeos (TG). Em ratos, sua deficiência está associada à diminuição da gordura corporal e aumento da sensibilidade à insulina (HAVEL, 2004).

## 2.4 SISTEMA IMUNE

### 2.4.1 Visão geral

O sistema imunológico é altamente complexo sendo composto por uma rede integrada de células, órgãos linfoides, fatores humorais e citocinas, que desempenham um papel crucial na defesa contra agentes infecciosos (ABBAS; LICHTMAN, 2008).

Tradicionalmente é dividido em dois principais ramos: o sistema imune inato (ou inespecífico) e o sistema imune adaptativo (ou específico). Ambos agem de forma integrada e utilizam mecanismos que atuam no controle da expansão da infecção e da erradicação de organismos (CHANDRA, 1997; PEAKMAN e VERGANI, 1999).

Os mecanismos do sistema imune adaptativo incluem a imunidade humoral, mediada pelos linfócitos B, que produzem anticorpos, e os linfócitos T, os quais atuam na imunidade celular. Juntos, estes dois tipos celulares atuam com uma capacidade de reconhecer, virtualmente, qualquer antígeno que penetre no organismo, porém apenas são estimuladas pela exposição a agentes infecciosos cuja magnitude e capacidade defensiva aumentam com exposições posteriores a um micro-organismo em particular (TURVEY; BROIDE, 2010).

Em contraste, o sistema imune inato se baseia no trabalho realizado por diversos componentes, tais como as barreiras anatomo-fisiológicas (pele intacta, lizozimas, muco, epitélio ciliar), sistema complemento; células fagocíticas (macrófagos e neutrófilos); célula Natural Killer (NK) e citocinas derivadas de macrófagos (TNF- $\alpha$ , interferon-alfa, interferon-beta) que sendo naturalmente presentes não necessitam de contato prévio com micro-organismos ou outros determinantes antigênicos (CHANDRA, 1997). Esta linha de defesa baseia-se em um repertório limitado de receptores para detectar patógenos invasores, porém responde rapidamente: dentro de poucos minutos de exposição ao patógeno, o sistema imune inato começa a gerar uma resposta protetora (TURVEY; BROIDE, 2010).

A imunidade natural fornece a linha de defesa inicial contra os micro-organismos e, em muitos casos, consegue eliminá-los. Esta imunidade estimula as respostas imunes adaptativas e pode influenciar a natureza das respostas

adaptativas para torná-las otimamente eficazes contra diferentes tipos de micro-organismos (ABBAS; LICHTMAN, 2008).

#### **2.4.2 Reação Inflamatória**

A reação inflamatória faz parte da resposta imune inespecífica e é uma tentativa orgânica de restauração e manutenção da homeostase, cujo objetivo consiste na eliminação da causa inicial de lesão tecidual (bactérias, toxinas, trauma etc.) (CONTRAN; KUMAR; ROBINS, 2000). Seu processo, imprescindível no reparo às agressões teciduais sofridas caracteriza-se pela ocorrência de uma série de fenômenos que irão resultar em vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e migração de células fagocitárias para o espaço extravascular. Esses eventos se traduzem clinicamente nos sinais clássicos da inflamação aguda, descritos como tumor, rubor, calor e dor (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 2000). Durante a reação inflamatória ocorre recrutamento de leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos, eosinófilos e basófilos) e mononucleares (monócitos e linfócitos) para o foco da lesão, com predomínio numérico de neutrófilos e macrófagos na resposta aguda (SOUTO, 2009). Fatores quimiotáticos atraem células sanguíneas que, por diapedese, atravessam a barreira endotelial (MARTÓN; KISS, 2000).

Neutrófilos e macrófagos são fagócitos e têm a capacidade de internalizar partículas inertes, células alteradas do indivíduo, micro-organismos e parasitas. A ingestão de micro-organismos e partículas pelos fagócitos constitui um dos principais fenômenos que ocorrem no processo inflamatório. Os macrófagos pertencem ao sistema fagocítico mononuclear e constituem a segunda maior população celular do sistema imune (FOGG et al, 2006; TACKEA; RANDOLPH, 2006).

#### **2.4.3 Macrófagos**

Macrófagos são células imunes diferenciadas, descendentes dos monócitos circulantes (ABBAS; LICHTMAN, 2008). Os monócitos são originados na medula óssea a partir da célula precursora de macrófago e neutrófilo, a CFU-GM (unidade

formadora de colônia de granulócito e macrófago) (FOGG et al, 2006). Uma vez na circulação, o monócito migra para diferentes tecidos e cavidades do organismo, diferenciando-se em macrófago, de acordo com o tecido e sua função (TACKEA; RANDOLPH, 2006).

Os macrófagos são fundamentais para o desenvolvimento, a amplificação e a resolução da reação inflamatória, por suas funções fagocítica, microbicida e capacidade de sintetizar e secretar uma grande variedade de mediadores inflamatórios como citocinas e quimiocinas (RUBINS, 2003; TAPPER, 1996). Podem ser ativados por endotoxinas, por linfocinas, por produtos ativados do complemento ou por interferon-gama (IF- $\gamma$ ). Neste processo, estas células podem apresentar alterações, tais como: aumento de tamanho, da aderência, da velocidade de deslocamento e da atividade fagocítica. Ocorrem ainda, alterações metabólicas aumentando o consumo celular de ATP e de oxigênio com conseqüente aumento da produção de radicais livres de oxigênio (O'KEEFE et al., 1997).

#### 2.4.3.1 Fagocitose

A fagocitose é um processo ativo de englobamento de partículas grandes (>0,5 $\mu$ m de diâmetro) dependente de energia (ABBAS; LICHTMANN, 2008). A fagocitose realizada pelo macrófago representa uma habilidade primordial da resposta imune inata para o combate às doenças infecciosas, um processo organizador da resposta imune adaptativa, sendo constituída de várias etapas: quimiotaxia (migração de células fagocíticas em direção ao sítio infectado), a fagocitose (reconhecimento, fixação e ingestão do microorganismo e partículas inertes) e a morte ou degradação intracelular dos micro-organismos ingeridos (GAGNON et al, 2002 ; ABBAS; LICHTMANN, 2008).

Ainda conforme Abbas e Lichtman (2008), a fagocitose ocorre após o reconhecimento do micróbio, opsozinado ou não, por meio de receptores de alta afinidade presente nos fagócitos. Uma vez um micróbio ligado, o fagócito redistribui a membrana plasmática na região dos receptores e estende uma projeção ao redor do micro-organismo e o internaliza, formando uma vesícula intracelular.

### 2.4.3.2 Óxido nítrico

Óxido nítrico (ON) é um radical livre gasoso que participa de uma ampla variedade de processos biológicos, que nos macrófagos, funciona como agente antimicrobiano em potencial para destruir organismos fagocitados (ABBAS; LICHTMAN, 2008; GUTIERREZ et al., 2009).

Em condições homeostáticas, o ON é produzido em baixas concentrações por uma enzima chamada óxido nítrico sintetase (NOS) constitutiva, presente em vertebrados e invertebrados, atuando como um mensageiro celular e como fator antioxidante. As NOS produzem ON através da catálise enzimática do aminoácido essencial L-arginina a L-citrulina e ON, na presença de O<sub>2</sub> e NADPH. Três isoformas dessa enzima são reconhecidas: as isoformas constitutivas (neuronal e endotelial) de óxido nítrico sintetase (c-NOS), dependentes de íons cálcio (Ca<sup>2+</sup>) intracelular/calmodulina e a isoforma induzida (i-NOS) independente de Ca<sup>2+</sup>, expressa por macrófagos e outros tecidos em condições de estímulo por citocinas ou endotoxinas (MIRANDA; CORTEGUERA, 1999; BOGDAN, 2001; GUTIERREZ et al., 2009).

Dentro dos fagolisossomos, o óxido nítrico pode reagir com o superóxido ou peróxido de hidrogênio, gerando radicais altamente reativos na eliminação de patógenos invasores, denominados de peroxinitritos (ABBAS; LICHTMAN, 2008).

## 2.5 LIPOPOLISSACARÍDEO E ENDOTOXEMIA

O lipopolissacarídeo bacteriano (LPS ou endotoxina), um constituinte das paredes celulares externas de bactérias Gram-negativas e responsável por sua organização e estabilidade, é um potente estimulante da resposta imunológica. Embora esteja firmemente ligada à membrana celular bacteriana, a endotoxina é liberada durante a lise ou reprodução da célula bacteriana (PETSCH; ANSPACH, 2000; ABBAS; LICHTMAN, 2008).

O LPS é um ativador das células do sistema imune inato e como consequência há intensa produção de diversas citocinas inflamatórias, incluindo IL-1, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$  e ON. Particularmente, o macrófago é bastante sensível aos efeitos da endotoxina, tanto que a superestimulação das vias de sinalização

monocíticas por LPS pode levar a uma inflamação sistêmica, resultando em sepse ou choque (ROBERT; SPITZER, 1997; WAI; KUO. 2004; ABBAS; LICHTMAN, 2008).

Segundo Cotran et al. (2000), a sepse é uma anarquia metabólica gerada pela ativação exacerbada de células inflamatórias e liberação de mediadores inflamatórios na qual o próprio organismo se vê incapaz de organizar e normalizar o estado por ele mesmo criado. As manifestações clínicas da doença incluem febre, hipercoagulação, hipotensão sistêmica, hipóxia tecidual e lesões e falência múltipla de órgãos (BENJAMIM, 2001). De acordo com Welbourn e Young (1992), o pulmão é o primeiro órgão atingido na endotoxemia seguido do fígado, intestino e rim. Conseqüentemente, devido ao aumento do estresse oxidativo, as complicações pulmonares, incluindo edema pulmonar e falência, são as maiores causas de morbimortalidade em pacientes sépticos (CHENG et al, 1994; CRESPO et al, 1999).

A administração intraperitoneal do LPS mimetiza vários desses efeitos observados na clínica, em pacientes com quadro de sepse, atuando como um modelo para o estudo da endotoxemia por bactérias Gram-negativas, pois o processo se inicia a partir do foco infeccioso ou da disseminação da endotoxina administrada na cavidade peritoneal, (BENJAMIM, 2001; MELO et al., 2010).

## 2.6 OBESIDADE E DOENÇAS INFECCIOSAS

Diversas evidências na literatura científica tem sugerido que a obesidade esteja associada com um estado de inflamação crônica de baixo grau (MATARESE; LA CAVA, 2005; ALVES, 2006; TILG; MOSCHEN, 2006).

No entanto, consideravelmente pouco foi desvendado acerca de como esta condição pode influenciar as principais tarefas do sistema imunológico no combate às infecções. Os achados clínicos indicam que a obesidade está associada com aumento da susceptibilidade às infecções. Estudos clínicos e epidemiológicos mostram que a incidência e a gravidade de doenças infecciosas são maiores em indivíduos obesos quando comparado com pessoas magras (MOULTON et al., 1994; STALLONE, 1994; MATARESE et al., 2010). ATUALIZAR

A obesidade tem sido identificada como fator de risco de infecção e de maior tempo de cicatrização após cirurgias (FASOL et al., 1992; MOULTON et al., 1994).

Os vários tipos de infecções incluem a hospitalar, a cirúrgica, odontogênica, a respiratória etc (FALAGAS; KOMPOTI, 2006; DOSSET et al, 2009). No entanto, esta associação pode ser devido a vários fatores, como por exemplo, o maior tempo de cirurgia internação dos pacientes obesos, com aumento do risco de infecções nosocomiais, tais como pneumonia, infecção de feridas, bacteremia e infecções intestinais (FALAGAS; KOMPOTI, 2006). Alternativamente, a obesidade poderia suprimir a resposta do sistema imunológico, como já foi discutido anteriormente.

Apesar das evidências em humanos, ainda há poucos estudos relacionando a resposta imune de obesos e eutróficos, e os que existem mostram apenas uma pequena gama de análises imunológicas (NIEMAN et al, 1999; MELO et al., 2010). Dessa forma, estudos sistemáticos em animais experimentais são importantes para o esclarecimento destas questões (FALAGAS; KOMPOTI, 2006).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Comparar parâmetros hematológicos e imunológicos entre ratas adultas obesas e não obesas submetidas à endotoxemia.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar o peso ponderal e o peso da gordura abdominal de ratas obesas e não obesas;
- Verificar as possíveis repercussões nas contagens total e diferencial de leucócitos e na concentração de hemoglobina no sangue periférico dos animais;
- Avaliar o recrutamento de células inflamatórias para o pulmão;
- Comparar a liberação de óxido nítrico e a taxa de capacidade fagocítica dos macrófagos alveolares de ratas obesas e não obesas submetidas à endotoxemia.

## 4. ANIMAIS, MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco, sob processo número 23076.055317/2010-85 e seguiu as normas sugeridas pelo Comitê Brasileiro de Experimentação Animal, com o título “EFEITOS DA OBESIDADE SOBRE PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS E HEMATOLÓGICOS DE RATAS SUBMETIDAS À ENDOTOXEMIA” (documento em anexo).

### 4.2 DESENHO DO ESTUDO

Tratou-se de um estudo experimental, prospectivo, pareado e aleatório. A escolha desse desenho de estudo garante uma grande comparabilidade entre grupos em termos de variáveis de confundimento e facilidade de formação do grupo controle. Dessa forma, a comparabilidade foi garantida pela homogeneidade que os grupos apresentam quanto à idade, sexo, raça, tipo de dieta dentre outros fatores.

### 4.3 ANIMAIS

Foram utilizadas 32 ratas fêmeas, albinas, *Wistar*, provenientes da colônia de criação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos em biotério em gaiolas de propileno, com tampa de arame zincado, com máximo de três animais por gaiola, sob uma temperatura de  $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ , em ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo ração e água *ad libitum*, segundo recomendação ética do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

Os animais foram gerados por acasalamento de machos e fêmeas adultos, na proporção de um macho para três fêmeas, por um período de 16 dias (HARKNESS, 1993). O diagnóstico de prenhez foi realizado por um veterinário através da observação do crescimento do ventre. Após um dia, realizou-se a sexagem,

selecionando-se apenas as fêmeas. Então, a ninhada foi padronizada em seis filhotes fêmeas por mãe, número que segundo Fishbeck e Rasmussen (1987) confere um maior potencial lactotóxico.

#### 4.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Após 21 dias de amamentação, os animais foram separados de suas mães. Neste mesmo dia (22º dia de vida), foi feita a divisão das ratas em dois grupos segundo o regime dietético a ser empregado:

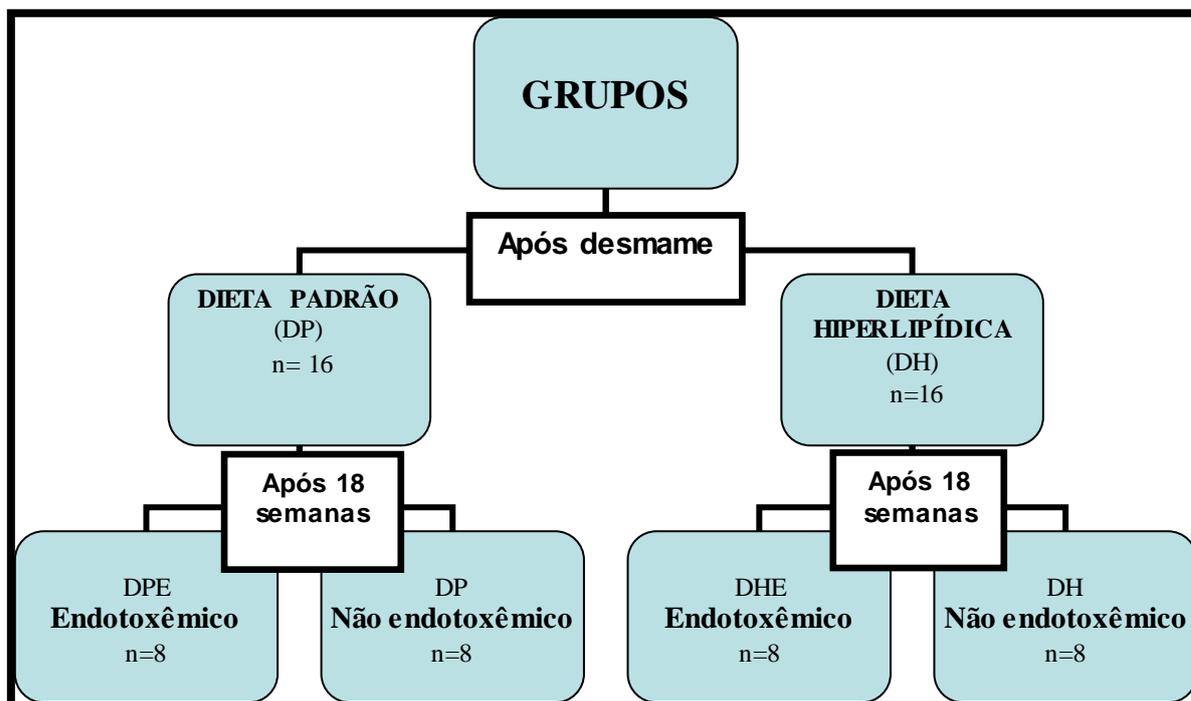
- **Grupo Dieta Padrão (DP):** formado por 16 animais que consumiram a dieta padrão do Biotério (Labina-Purina do Brasil S/A).
- **Grupo Dieta Hiperlipídica (DH):** constituído por 16 animais alimentados com dieta palatável hiperlipídica.

Após 147 dias de idade, após terem recebido as respectivas dietas por 18 semanas, os grupos foram divididos em endotoxêmicos e não endotoxêmicos.

O grupo DP foi subdividido em Grupo dieta padrão não endotoxêmicos (DP, n=8) e Grupo dieta padrão endotoxêmico (DPE, n=8). Da mesma maneira, o grupo DH foi subdividido em Grupo dieta hiperlipídica não endotoxêmico (DH, n=8) e dieta hiperlipídica endotoxêmico (DHE, n=8).

Para obtenção dos grupos com endotoxemia (DPE e DHE), os animais receberam injeção intraperitonal de LPS (sorotipo *Escherichia coli*; 055: B5, Sigma) na dose de 1mg/Kg de peso corporal, preparado com NaCl a 0,9%. Os animais sem endotoxemia (DP e DH) receberam, pela mesma via, apenas NaCl a 0,9% na equivalente proporção, como uma maneira de igualar o estresse sofrido pela injeção.

No dia seguinte (24 horas após administração das substâncias), foram coletadas amostras de sangue periférico e do lavado broncoalveolar (LBA) de cada animal para os estudos (DE CASTRO et al., 1997).



**Figura 1:** Organograma de distribuição dos grupos.

#### 4.5 DIETA HIPERLIPÍDICA PALATÁVEL

A dieta hiperlipídica utilizada consiste em uma mistura normoprotéica e hiperlipídica descrita e utilizada previamente por Estadella et al. (2004) e Duarte et al. (2006). É composta por ração comercial Labina (Purina do Brasil S/A), amendoim torrado, chocolate ao leite e biscoito maisena, na proporção 3:2:2:1. Destes constituintes, a ração, o amendoim e o biscoito são moídos em trituradores elétricos, já o chocolate é derretido em banho Maria (**Figura 2A**). Após esta primeira fase, todos os ingredientes são misturados até formarem uma massa, que é posteriormente aquecida em estufa (sob uma temperatura de 60°C) e oferecida na forma de péletes (**Figura 2B**). Em média, eram preparados quatro quilos de dieta hiperlipídica por semana.



**Figura 2:** **A.** Mistura dos ingredientes para a confecção de dieta hiperlipídica; **B.** Massa formada, pronta para ser aquecida em estufa.

Fonte: Silva (2010).

**Tabela 1.** Composição da dieta padrão do biotério Labina (Labina-Purina do Brasil)

Enriquecimento (Kg de ração)		Níveis de Garantia (g%)	
Vitamina A	2000UI	Umidade	13
Vitamina D <sub>3</sub>	6000UI	Proteínas	23,0
Vitamina E	30UI	Carboidratos	63,0
Vitamina K	6mg	Lipídeos	4,0
Vitamina B12	10mg	Cinzas	-
Vitamina B2	8mg	Fibras	5,0
Pantetonato de cálcio	24mg	Kcal	275,0
Niacina	95mg	Extrato Etéreo	2,5
Tiamina	4mg	Matéria Fibrosa (máx)	9,0
Ácido Fólico	0,5mg	Matéria Mineral (máx)	8,0
Piridoxina	6mg	Cálcio (máx)	1,8
Biotina	0,1mg	Fósforo (min)	0,0
Colina	2000mg		
Manganês	50mg		
Iodo	2mg		
Ferro	65mg		
Zinco	35mg		
Cobre	26mg		
Antioxidante	100mg		

Fonte: Agribands do Brasil Ltda.

**Tabela 2** - Composição da dieta hiperlipídica.

<b>NUTRIENTES</b>	<b>(g/100g)</b>
<b>Proteínas</b>	17,93
<b>Lipídeos</b>	24,50
<b>Carboidratos</b>	47,50
<b>Cinzas</b>	3,62
<b>Fibras</b>	6,77
<b>Conteúdo calórico (Kcal/100g)</b>	480,94

Fonte: Silva (2010).

**Tabela 3** - Ingredientes necessários para confecção de 1,0 kg de dieta hiperlipídica.

<b>INGREDIENTES</b>	<b>QUANTIDADE</b>
<b>Labina (Purina do Brasil S/A)</b>	375g
<b>Amendoim torrado</b>	250g
<b>Chocolate ao leite</b>	250g
<b>Biscoito maisena</b>	125g

Fonte: Silva (2010).

#### 4.6 AVALIAÇÃO DO PESO CORPORAL

Do nascimento ao final do período de amamentação (21° dia), foram realizadas aferições dos pesos corporais dos animais diariamente, com o objetivo de se identificar possíveis anormalidades de peso antes da imposição das dietas. Foram incluídos somente animais com pesos equivalentes para formarem os grupos.

Do 22° até o último dia de dieta, o peso corporal foi aferido duas vezes por semana. Uma balança eletrônica com capacidade para 4 Kg e sensibilidade 0,1g (Marte, modelo S-4000) foi utilizada para a pesagem das ratas.

#### 4.7 COLETA DE SANGUE PERIFÉRICO E ANÁLISES DOS PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS

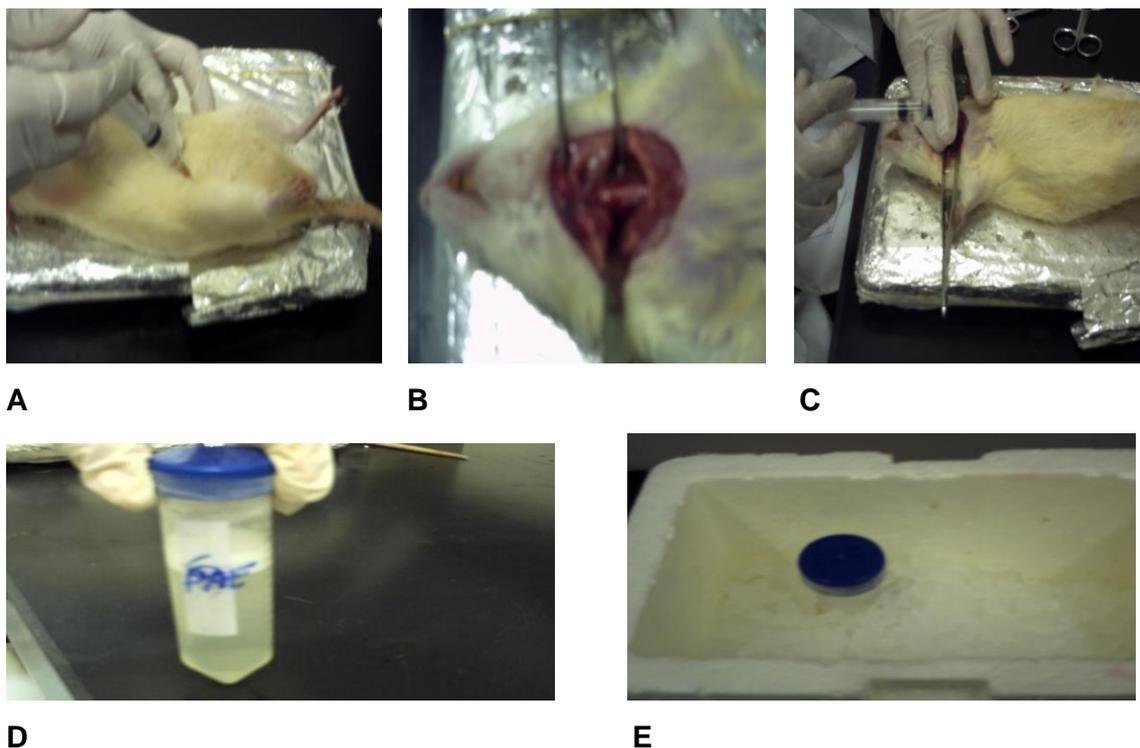
O sangue periférico foi obtido após a realização de um pequeno corte com bisturi na extremidade da cauda das ratas previamente anestesiadas. Aproximadamente 200µL de sangue, foram depositados em eppendorfs, previamente acrescidos de 20µL de anticoagulante (EDTA - ácido etileno diaminotetraacético a 3%). As amostras coletadas foram então enviadas ao Laboratório do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (ULAB- HC- UFPE) onde foram processadas em equipamentos e os resultados da série branca, da série vermelha e da contagem de plaquetas foram obtidos automaticamente. Em paralelo, lâminas com sangue das amostras foram confeccionadas para análise microscópica.

#### 4.8 ANÁLISE DAS CÉLULAS DO LAVADO BRONCOALVEOLAR

##### **4.8.1 Obtenção do Lavado Broncoalveolar (LBA)**

O LBA foi obtido de acordo com a técnica usada por De Castro et al., 1997. Sob efeito do anestésico (cloralose-uretana, em concentrações respectivas de 0,5 e 12,5%, via intraperitoneal, na proporção de 1mL/100g de peso corporal), o animal foi submetido à uma traqueostomia para coleta do LBA. Inicialmente, foi realizada a assepsia do local com álcool etílico a 70%, em seguida, cortados os pêlos e a pele na porção média do pescoço, abrindo-se e afastando-se as camadas musculares até acessar a traqueia. Com uma pequena pinça, isolou-se a traqueia e, com uma tesoura, criou-se um pequeno orifício entre dois anéis traqueais na porção ventral da mesma.

Foi inserida, então, uma cânula plástica acoplada a uma seringa. Várias alíquotas de cerca de 3mL solução fisiológica foram então injetadas e imediatamente aspiradas. O material recolhido (LBA) foi depositado em tubo estéril. Ao final, obteve-se um volume de 30mL de LBA por cada rata.

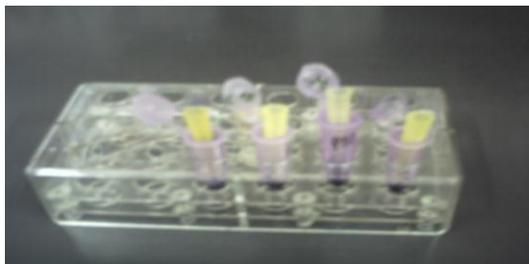


**Figura 3:** **A.** Aplicação do anestésico por via intraperitoneal; **B.** Procedimento cirúrgico (traqueostomia); **C.** Retirada do lavado broncoalveolar; **D.** Amostra de lavadobroncoalveolar recém-obtida; **E.** Recipiente com gelo para armazenamento temporário das amostras.

Fonte: Silva (2010).

#### 4.8.2 Contagem total de leucócitos do LBA

Os leucócitos totais do LBA foram contados ao microscópio de luz (utilizando-se a objetiva de 40x) a partir de uma amostra diluída na proporção de 1:10 em corante Azul Tripán a 0,05% (**Figura 4**). Foi utilizada, para isto, uma câmara de volume conhecido, a Câmara de Neubauer.



**Figura 4.** Amostra de lavado broncoalveolar diluída em Corante Azul de Tripán  
Fonte: Silva (2010).

#### 4.8.3 Contagem diferencial de leucócitos do LBA

Foram confeccionadas lâminas a partir de preparações citocentrifugadas do LBA de cada animal (Cytopro™-Cytocentrifuge Wescor) diretamente em lâminas histológicas a 800 rpm/10min, em alta velocidade. Inicialmente, será realizada uma diluição de 1:10 do LBA em solução fisiológica. As preparações foram, então, fixadas e coradas com o Kit Panótico Rápido (Laborclin Ltda). As lâminas foram lidas ao microscópio de luz com a objetiva de imersão (100x). Os diferentes tipos de leucócitos foram quantificados em um contador eletrônico da marca Kacil, com teclas correspondentes a cada tipo de glóbulo branco.



**Figura 5.** Citocentrífuga (Cytopro™-Cytocentrifuge Wescor)

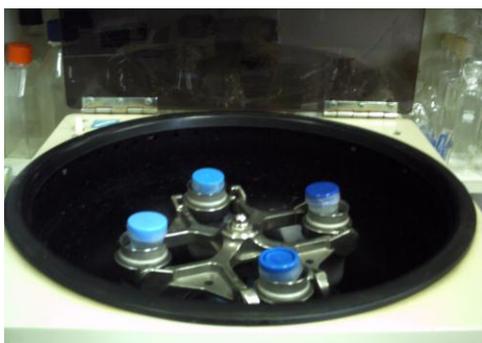
Fonte: Silva (2010).

#### 4.8.4 Cultura de macrófagos alveolares

Para a obtenção dos MA, as amostras de LBA foram centrifugadas a 1500 rpm durante 15 minutos (**Figura 6A**). Em seguida, o precipitado correspondente às células (**Figura 6B**) foi ressuspendido em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco-Invitrogen Corporation), suplementado com 3% de soro fetal bovino inativado (Gibco-Invitrogen Corporation), e antibióticos (penicilina (100U/ml), estreptomicina (100 mg/ml) e anfotericina B (0.25 mg/ml) (Sigma-Aldrich, SP Brasil). A contagem das células foi realizada em Câmara de Neubauer, após a diluição de 10 $\mu$ L da suspensão de células com 90  $\mu$ L corante Azul Tripán (corante vital que tem a propriedade de corar as células mortas, excluindo-as das células vivas) a 0.05% (proporção de 1:10).

Os macrófagos alveolares foram cultivados como descrito em De Castro et al, (2000). Após a padronização no número de células, as mesmas foram transferidas para placas de cultura tipo Falcon, com 6 poços de 35 mm de diâmetro cada, em

uma proporção de  $10^6$  células/mL de meio RPMI 1640 em cada poço. Após 1 hora na incubadora a  $37^\circ\text{C}$  e 5% de  $\text{CO}_2$ , foi desprezado o sobrenadante com as células não aderentes e adicionado RPMI, deixando as placas por mais 1 hora na incubadora em meio de cultura RPMI 1640 com antibióticos e soro fetal bovino, para estabilizar as células.



A



B

**Figura 6:** **A.** Centrifugação do lavado broncoalveolar; **B.** Precipitado de células após centrifugação.

Fonte: Silva (2010).

#### 4.9 OBTENÇÃO DA GORDURA VISCERAL

A coleta da gordura visceral foi realizada após o procedimento cirúrgico de traqueostomia e a coleta do LBA. Com o animal ainda anestesiado, realizou-se uma incisão na região abdominal, onde todos os órgãos locais foram retirados e as gorduras aderidas a estes separadas e somadas à gordura da região abdominal. Assim, a gordura total obtida foi pesada posteriormente.

#### 5.10 ANÁLISE DA PRODUÇÃO DE ON

Seguindo o método descrito por Feder e Laskin, em 1994, a produção de ON, dos macrófagos não estimulados e dos macrófagos estimulados *in vitro* com  $10 \mu\text{m}/\text{mL}$  de LPS, foi mensurada vinte e quatro horas após essa estimulação. As

células foram distribuídas em uma concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL por poço da placa tipo Falcon, seguindo para a estufa com tensão de 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37^\circ\text{C}$ , onde permaneceram por 24 horas.

Para a quantificação de nitrato e nitrito, foram retirados  $100\mu\text{L}$  do sobrenadante das culturas e acrescentado  $50\text{mL}$  do reagente de Griess (1,5% de sulfanilamida em 5% de ácido fosfórico –  $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 0,1% de naftiletieno diamino diiclorito em  $\text{H}_2\text{O}$ ). Após um repouso de 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, foi feita a leitura em leitor de ELISA (Ensaio Imunoenzimático) com filtro de 550 nm. A concentração de nitrito foi calculada através de valores médios de uma curva padrão de nitrito de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) e os dados foram expressos em mM de nitrito/mL.

#### **4.10.1 Construção da curva padrão**

Foi construída uma curva padrão, utilizando-se a Solução padrão de 1mM de nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ), meio RPMI 1640 e reagente de Griess ou Solução reveladora. Por meio da curva padrão, a dosagem de ON foi efetuada, quantificando-se os níveis de nitrito e nitrato das amostras.

#### **4.10.2 Processo de revelação da curva padrão e das amostras**

A determinação dos níveis de nitrato e nitrito da curva padrão, assim como daqueles liberados nas amostras foram registradas em absorbância. A partir da determinação dos valores da curva padrão foi possível converter os valores de todas as amostras e assim determinar a quantidade de nitrito e nitrato (medida indireta) liberados pelas células dos animais dos diferentes grupos.

### **4.11 DETERMINAÇÃO DA TAXA DE CAPACIDADE FAGOCÍTICA**

Para este estudo, foram utilizados fungos (*Saccharomyces cerevisiae*). Os fungos foram lavados duas vezes com Solução tampão de fosfato (PBS) a 0,01M; contados  $10^7$  células em  $200\mu\text{L}$  de PBS e em seguida foram adicionados à suspensão de macrófagos ( $800\mu\text{L}$  de RPMI 1640, com  $1 \times 10^6$  células) recuperados

do LBA. O conteúdo dos tubos (macrófagos e fungos) foi distribuído em lâminas para microscopia óptica e incubados a 37°C, em atmosfera úmida por um período de 1 hora. Após este período, as lâminas foram lavadas com solução salina tamponada e secadas a temperatura ambiente.

Para a coloração, foi utilizado o kit Panótico Rápido. Depois de coradas e secas a temperatura ambiente, as lâminas foram levadas para leitura ao microscópio óptico, lidos com objetiva de 100 sob imersão. A taxa de fagocitose foi obtida como percentual de macrófagos que englobaram fungo em uma contagem total de 100 células.

#### 4.12 VIABILIDADE CELULAR (ENSAIO MTT)

A viabilidade celular foi avaliada pela redução mitocondrial do 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-brometo de difenil tetrazólico (MTT) a cristais de formazam como descrito por Akao et al, 1995. Os macrófagos alveolares foram incubados com MTT (0,5 mg/mL) em meio completo (200µl/poço) durante 60 minutos a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período o meio foi removido e os cristais formados são diluídos após adição do DMSO (Dimetilsulfóxido) mais etanol (em proporção de 1:1), produzindo uma reação colorimétrica, quantificada em leitor de ELISA com filtro de 550 nm. O percentual de viabilidade celular foi calculado pela seguinte fórmula:  
Viabilidade celular = (Absorbância das células tratadas/ Absorbância das células controles x 100%).

#### 4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As medidas utilizadas na representação das estatísticas apresentadas foram as médias com seus respectivos erros padrões. Na análise do acompanhamento do peso médio, os grupos foram comparados utilizando um MANOVA para medidas repetidas. Na análise das comparações entre grupos foi aplicada uma ANOVA com dois fatores, considerando a dieta como um fator e a condição de endotoxemia como um segundo fator. As hipóteses foram testadas e analisadas considerando uma

significância estatística de 5% ( $p < 0,05$ ). O software utilizado foi o STATA versão 9.0.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 ARTIGO CIENTÍFICO

Artigo formatado conforme as recomendações da Microbiology and Immunology

#### **Atividade microbicida de macrófagos alveolares de ratas obesas frente à endotoxemia**

Bruno Sampaio<sup>1,2</sup>; Maria do Amparo Andrade<sup>1,2</sup>; Karla Melo Pereira da Silva<sup>1,3</sup>; Rosângela Rosendo da Silva<sup>1,3</sup>; Vanessa de Oliveira Santana<sup>1</sup>; Célia Maria Barbosa de Castro<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Setor de Microbiologia, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

<sup>3</sup>Programa de Pós-graduação em Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brasil.

\*Endereço para correspondência:

Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Setor de Microbiologia, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, Universidade Federal de Pernambuco, Campus Universitário, Cidade Universitária, Recife-PE-Brasil. CEP: 50670-901. Tel.: +55 81 2126 8484 E-mail: [cmmbc5@yahoo.com.br](mailto:cmmbc5@yahoo.com.br)

## RESUMO

A proposta deste estudo foi avaliar o efeito da obesidade sobre o recrutamento de células imune para o pulmão e a função dos macrófagos alveolares na presença da endotoxemia. Foram utilizadas 32 ratas albinas *Wistar*. A partir do desmame, os animais foram divididos em dois grupos segundo o regime dietético, sendo cada grupo composto por 16 animais. O grupo dieta padrão (DH) foi mantido com dieta padrão do biotério Labina (Purina do Brasil S/A) e o grupo dieta hiperlipídica (DH) foi alimentado com uma dieta hiperlipídica consistida em uma mistura hipercalórica (normoprotéica e hiperlipídica) contendo ração comercial Labina (Purina do Brasil S/A), amendoim torrado, chocolate ao leite e biscoito maisena. Após 18 semanas de consumo das dietas, metade dos animais de cada grupo foi submetido à endotoxemia, constituindo então quatro grupos: dieta padrão endotoxêmico (DPE) e dieta padrão não endotoxêmico (DP), dieta hiperlipídica endotoxêmico (DHE) e dieta hiperlipídica não endotoxêmico (DH). Para obtenção da endotoxemia, os animais receberam injeção intraperitoneal de lipopolissacarídeo (sorotipo *Escherichia coli*; 055: B5, Sigma). Após 24h, foram realizadas a obtenção de sangue periférico para contagem de leucócitos e hemácias, a retirada do lavado broncoalveolar (LBA) e a retirada da gordura abdominal para posterior pesagem. Alíquotas do LBA foram extraídas para a análise da contagem total e diferencial de leucócitos. Após, o LBA foi centrifugado para obtenção dos macrófagos alveolares (MA). Foi efetuado o estudo da atividade microbicida dos MA, através da taxa de fagocitose e da produção de óxido nítrico (ON), através da medida indireta da dosagem dos nitritos e nitratos nos cultivos celulares. Foram realizados também testes de viabilidade celular. A análise estatística foi efetuada com os testes MANOVA e ANOVA. Os resultados revelam que o consumo de dieta hiperlipídica não gerou aumento no ganho ponderal, todavia promoveu incremento da quantidade de gordura visceral. A obesidade, gerada pela indução da dieta hiperlipídica, acarretou um aumento na quantidade de hemácias e neutrófilos do sangue periférico e na quantidade de neutrófilos e linfócitos no local da infecção. Surpreendentemente, as atividades microbicidas dos MA de ratas obesas permaneceram semelhantes e intactas, mesmo na presença da endotoxemia.

Palavras-chave: Obesidade, Macrófagos alveolares, Óxido nítrico e Fagocitose.

Obesidade é um problema de saúde crescente em todo o mundo. Pesquisas da Organização Mundial de Saúde (OMS) revelaram que em 2005 1,6 bilhões de pessoas (com idade superior a 15 anos) apresentavam sobrepeso e por volta de 400 milhões de indivíduos eram obesos. A OMS calculou que, até 2015, aproximadamente 2,3 bilhões de adultos terão sobrepeso e mais de 700 milhões serão obesos (1).

A obesidade tem etiologia multifatorial. Distúrbios metabólicos, fatores neuroendócrinos e traços genéticos, bem como influências psicológicas e comportamentais, como o hábito de consumir alimentos excessivamente energéticos, mas pobres em micronutrientes associado à redução da atividade física, são as causas comumente apontadas como geradores dessa patologia (2, 3). Os custos da obesidade estão diretamente relacionados com aumento risco de morbidade e mortalidade pela doença (4). A morbidade associada à doença inclui Diabetes Não-Insulino-Dependente (Tipo 2), hipertensão, dislipidemias, diversos tipos de câncer e doenças cardiovasculares, além de alterações na imunocompetência (5, 6, 7).

A obesidade pode ser induzida em animais por alterações neuroendócrinas, dietéticas ou genéticas, sendo que a administração de dieta hipercalórica é o modelo mais simples para indução da obesidade e o mais análogo da obesidade humana (8). Diversos tipos de dietas tem sido utilizados com sucesso para a reprodução de modelos experimentais da obesidade (9, 10, 11).

O tecido adiposo (TA) já não possui a visão tradicional de órgão de armazenamento de energia (12). Está bem estabelecido que o TA expressa uma variedade de fatores, denominados adipocinas. Devido as diversas ações conhecidas que estas moléculas possuem, permite-se agrupá-las de acordo com a sua função principal, como: função imunológica, cardiovascular, metabólica e endócrina (12, 13).

Segundo as evidências, um elo entre tecido adiposo e células imunológicas tem sido cada vez mais reconhecido (7). O TA é conhecido por participar ativamente na regulação de processos fisiológicos e patológicos, como a inflamação e a função imunológica, devido a obesidade criar um baixo grau de inflamação crônica, indicada pelo aumento de marcadores inflamatórios (15, 16).

O lipopolissacarídeo bacteriano (LPS ou endotoxina), um constituinte das paredes celulares externas de bactérias Gram-negativas é um potente estimulante da resposta imunológica. Particularmente, o macrófago é bastante sensível aos efeitos da endotoxina. tanto que a superestimulação das vias de sinalização monocíticas por LPS pode levar a uma inflamação sistêmica, resultando em sepse ou choque (17, 18, 19). A administração intraperitoneal do LPS mimetiza vários efeitos observados na clínica, em pacientes com quadro de sepse atuando como um modelo para o estudo da endotoxemia por bactérias

Gram-negativas, pois o processo se inicia a partir do foco infeccioso ou da disseminação da endotoxina administrada na cavidade peritoneal, (20, 21).

Diante do exposto, este estudo pretendeu verificar se a obesidade produz alterações nos parâmetros do sangue periférico, no recrutamento de células imunes para o pulmão e possível dano na função de macrófagos alveolares de ratas adultas endotoxêmicas.

## **MÉTODOS**

### **Considerações éticas**

O protocolo deste estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) (Processo número 23076.055317/2010-85).

### **Animais**

Foram utilizadas 32 ratas albinas *Wistar* (21 dias) provenientes da colônia de criação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos no biotério em temperatura controlada de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , sob ciclo claro/escuro de 12 horas, com acesso livre à água e ração, segundo recomendação ética do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética do Centro de ciências Biológicas da universidade Federal de Pernambuco.

### **Manipulação nutricional**

Inicialmente, os animais foram divididos em dois grupos segundo o regime dietético a ser estabelecido. O grupo Dieta Padrão (DP) foi constituído de 16 animais alimentados com a dieta padrão do biotério Labina (Purina do Brasil S/A). O grupo Dieta Hiperlipídica (DH) foi formado por 16 animais que receberam dieta hiperlipídica e hipercalórica.

### **Dieta Hipercalórica e Hiperlipídica**

A dieta hiperlipídica empregada para induzir obesidade consistiu em uma mistura hipercalórica, contendo ração comercial Labina (Purina do Brasil S/A), amendoim torrado, chocolate ao leite e biscoito maisena, na proporção 3:2:2:1. Todos os ingredientes foram misturados até formarem uma massa, posteriormente aquecida e oferecida na forma de pletes. A densidade calórica para a dieta hipercalórica palatável foi de 4,8 kcal/g (24,5% de lipídeos), enquanto que a dieta padrão apresentou 2,7 kcal/g (4% de lipídeos).

### **Avaliação do peso corporal**

O peso dos animais foram aferidos utilizando-se uma balança eletrônica com capacidade para 4 Kg e sensibilidade 0,1g (Marte, modelo S-4000).

### **Indução da endotoxemia**

Os grupos iniciais, DP e DH, foram subdivididos em quatro: DPE e DHE (submetidos ao processo de endotoxemia) e DP e DH (não endotoxêmicos). O estímulo da endotoxemia foi realizado com aplicação de injeção intraperitoneal de LPS (sorotipo *Escherichia coli*; 055: B5, Sigma) na dose de 1mg/Kg de peso corporal, preparado com NaCl a 0,9%. Os animais sem endotoxemia receberam apenas apenas NaCl a 0,9% por via equivalente.

### **Análise das células do sangue periférico**

Vinte e quatro horas após a indução da endotoxemia (21), foram coletadas amostras de sangue de cada animal para a avaliação hematológica. Os animais foram anestesiados com cloralose-uretana (0,5 e 12,5% respectivamente) na proporção de 8 mL/kg i.p. Alíquotas de 200µL de sangue foram coletadas da veia caudal dos animais depositados em eppendorfs, previamente acrescidos de 20µL de anticoagulante (EDTA - ácido etileno diaminotetraacético a 3%) para a contagem de células. Os dados foram automatizados pelo laboratório do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Pernambuco (ULAB- HC-UFPE).

### **Lavado broncoalveolar (LBA)**

O lavado broncoalveolar (LBA) foi obtido de acordo com técnica de De Castro e cols. (22). O LBA foi coletado com a injeção de salina a 0,9% através de uma cânula plástica inserida na traquéia. Várias alíquotas de 3 mL foram injetadas e coletadas em tubos cônicos estéreis de polipropileno de 50mL (Falcon, Sigma). Recuperou-se aproximadamente 30mL de LBA para cada animal.

### **Recrutamento de células imunes para o foco infeccioso**

A contagem total das células foi realizada a partir de uma amostra do LBA, diluído de 1:10, em corante azul de trypan. A contagem diferencial foi realizada a partir de lâminas citocentrifugadas a 800rpm/10min (CytoproTM-Cytocentrifuge Wescor), coradas com o kit Panótico Rápido e lidas ao microscópio óptico com objetiva de 100x sob imersão. A partir dos dados obtidos foram calculados os valores absolutos e relativos para cada tipo de célula.

### **Cultura de macrófagos alveolares**

Os macrófagos alveolares foram cultivados seguindo uma técnica previamente descrita (23). O LBA recolhido foi centrifugado a 1500 rpm durante 15 min. O *pellet* de células precipitado foi ressuspensionado em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco-Invitrogen Corporation) contendo 3% de soro fetal bovino (Gibco-Invitrogen Corporation) e antibióticos (penicilina 100U/mL e estreptomicina 100µg/mL). As células foram transferidas para placas de cultura de 35mm de diâmetro (6 poços, Falcon), onde foram dispensados 1 mL da suspensão em uma proporção de  $10^6$  células/mL de RPMI 1640 em cada poço. Após 1h na incubadora a 37°C e 5% CO<sub>2</sub>, despezou-se o sobrenadante com as células não-aderentes e adicionou-se 1 mL de meio RPMI, deixando-se as placas por mais 1h em incubadora para estabilização das células.

### **Taxa de fagocitose**

Foram utilizados fungos (*Saccharomyces cerevisiae*) para avaliar a taxa de fagocitose, de acordo com a técnica de Malagueño e cols. (24). Os fungos foram lavados duas vezes com Solução tampão de fosfato (PBS) a 0,01M; contados  $10^7$  células em 200µL de PBS e em seguida foram adicionados à suspensão de macrófagos (800µL de RPMI 1640, com  $1 \times 10^6$  células). Os fungos e os macrófagos juntos fizeram um volume final de 1mL. As células (macrófagos e fungos) foram distribuídas em lâminas para microscopia óptica e incubados a 37°C, em atmosfera úmida por um período de 1 hora. Após este período as lâminas foram lavadas com solução salina tamponada e secadas a temperatura ambiente. Para a coloração, foi utilizado o kit Panótico Rápido. As lâminas foram lidas ao microscópio óptico, com objetiva de 100 sob imersão. A taxa foi obtida como percentual de macrófagos que englobaram fungo em uma contagem total de 100 células.

### **Análise da produção de óxido nítrico (ON)**

A liberação de ON foi medida através da reação de Griess ensaio quantitativo colorimétrico. A produção de óxido nítrico foi determinada usando o sobrenadante da cultura de macrófagos, de acordo com o método descrito por Feder e Laskin (25). Após 24 horas de estímulo *in vitro* com LPS (10µg/mL), os macrófagos - estimulados e os não estimulados com LPS - foram avaliados para a liberação de ON. A absorvância do azocromóforo foi medida em 550 nm.

### **Viabilidade celular**

A viabilidade celular foi avaliada pela redução mitocondrial do 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-brometo de difenil tetrazólico (MTT) a cristais de formazam como descrito por Akao e cols. (26). Os macrófagos alveolares foram incubados com MTT (0,5 mg/mL) em meio

completo (200µl/poço) durante 60 minutos a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>. Após este período o meio foi removido e os cristais formados são diluídos após adição do DMSO mais etanol (em proporção de 1:1), produzindo uma reação colorimétrica, quantificada em leitor de ELISA com filtro de 550 nm. O percentual de viabilidade celular foi calculado pela fórmula:

Viabilidade celular = (Absorbância das células tratadas/ Absorbância das células controles x 100%).

### **Gordura Visceral**

Após a coleta do LBA, coletou-se a gordura visceral. Foi realizada uma incisão na região abdominal, todos os órgãos deste local foram retirados e as gorduras aderidas a estes foram separadas e somadas à gordura da região abdominal e o total de gordura foi, então, separado para posterior pesagem.

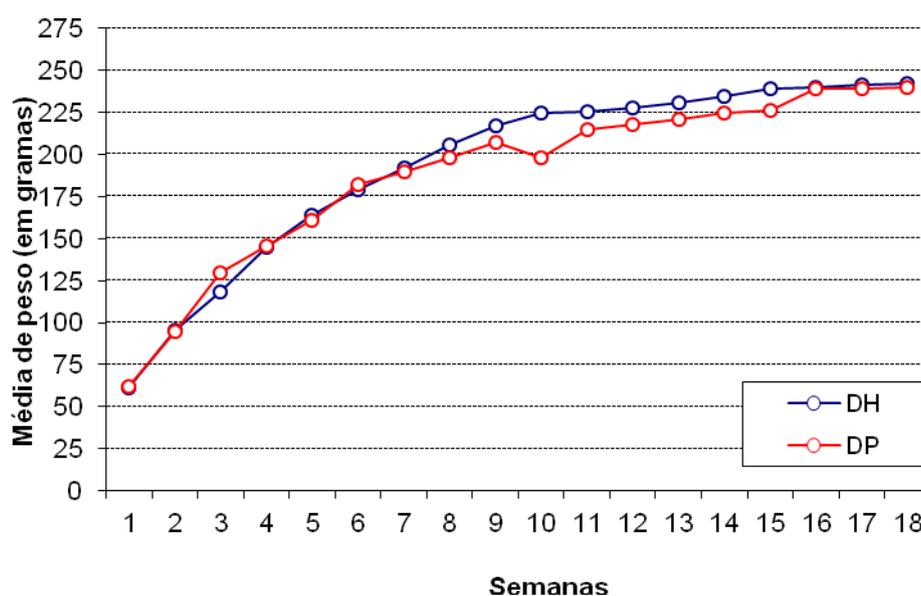
### **Análise estatística**

Na análise do acompanhamento do peso médio os grupos foram comparados utilizando um MANOVA para medidas repetidas. Na análise das comparações entre grupos foi aplicada uma ANOVA com dois fatores. As hipóteses foram testadas e analisadas considerando uma significância estatística de 5% ( $p < 0,05$ ). O software utilizado foi o STATA versão 9.0.

## **RESULTADOS**

### **Peso Corporal**

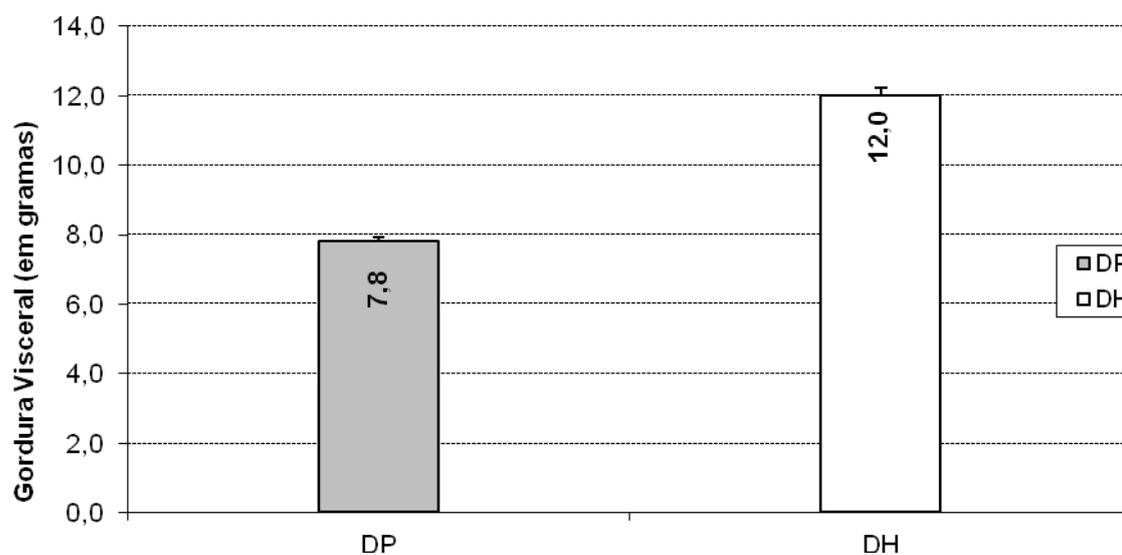
Após 18 semanas de administração de dieta, os animais que receberam dieta hiperlipídica (DH) não apresentaram diferença de peso corporal em relação aos que se alimentaram de dieta padrão (DP) (Figura 1). O peso corporal médio em ambos os grupos foi considerado semelhante (DP igual a  $240.3 \pm 5.9$  g e DH igual a  $242.0 \pm 5.5$  g) ( $p = 0,886$ ).



**Figura 1.** Comparação de peso entre os grupos com ratas *Wistar* alimentadas com dieta padrão (DP) e com dieta hiperlipídica (DH), durante as 18 semanas de regime alimentar. Dados expressos em média.

### Gordura visceral

Embora a dieta Dieta Hiperlipídica não tenha promovido aumento no peso corporal, seu consumo aumentou consideravelmente a quantidade de gordura visceral (Figura 2), sendo encontrada 1,58 vezes mais gordura nos animais nos quais a obesidade foi induzida (DH= 12.1 ± 0.7 g; DP= 7.8 ± 0.4 g) ( $p = 0,0001$ ).



**Figura 2.** Peso da gordura visceral de ratas *Wistar* alimentadas com dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (DH), após 18 semanas de utilização das dietas.  $p = 0,0001$  na comparação DP e DH.

### Parâmetros hematológicos

Os dados da contagem do sangue periférico (Tabela 1) revelam que a obesidade ocasionou num aumento significativo no número de hemácias ( $p=0,035$ ), leucócitos totais ( $p=0,024$ ) e neutrófilos ( $p=0,02$ ) no grupo DH em comparação ao grupo DP. Na presença da endotoxemia, não houve diferença na análise nos parâmetros hematológicos entre obesos (DHE) e não obesos (DPE), com exceção do número de hemácias, que esteve aumentado ( $p=0,038$ ) no animais obesos.

**Tabela 1.** Efeito da dieta hiperlipídica e da endotoxemia, sobre parâmetros do sangue periférico de ratas *Wistar*. (Anova – STATA versão 9.0) ( $p < 0,05$ ).

<b>Variáveis</b>	<b>DP</b>	<b>DH</b>	<b>DPE</b>	<b>DHE</b>
Eritrócitos ( $10^3/\text{mm}^3$ )	7,44±0,75	7,92±0,36#	7,6±1,21	8,24±0,32#
Hemoglobina (g/dL)	14,4±0,88	15,0±0,54	15,6±1,71*	15,6±0,51*
Plaquetas ( $10^3/\text{mm}^3$ )	4,91±2,38	4,99±2,16	2,83±0,95*	3,05±1,12*
Leucócitos totais ( $10^3/\text{mm}^3$ )	11,33±4,46	14,23±4,48#	18,30±4,9*	18,43±3,0*
Neutrófilos ( $10^3/\text{mm}^3$ )	1,37±0,53	3,26±0,64#	7,06±0,67*	6,32±0,59*
Eosinófilos ( $10^3/\text{mm}^3$ )	0,20±0,09	0,26±0,11	0,31±0,16	0,21±0,04
Basófilos ( $10^3/\text{mm}^3$ )	0,05±0,01	0,04±0,02	0,14±0,03*	0,07±0,02*
Monócitos ( $10^3/\text{mm}^3$ )	0,13±0,08	0,26±0,13	1,82±1,24*	1,43±0,29*
Linfócitos ( $10^3/\text{mm}^3$ )	9,75±3,21	10,31±3,84	8,97±3,52	10,2±3,22

**Tabela 1.** (#) – Efeito da dieta (análise comparativa DPxDH/ DPExDHE). (\*) - Efeito da endotoxemia (análise comparativa DPExDP/ DHExDH).

### Contagens total e diferencial de leucócitos do LBA

Os resultados da contagem total e diferencial de leucócitos do LBA (Tabela 2) indicam que a dieta hiperlipídica elevou o número de neutrófilos ( $p=0,027$ ) e linfócitos do grupo DH em relação ao grupo DP ( $p=0,014$ ). Na endotoxemia, não houve diferença significativa entre os valores de leucócitos totais e diferenciais do grupo DHE em comparação ao grupo DPE.

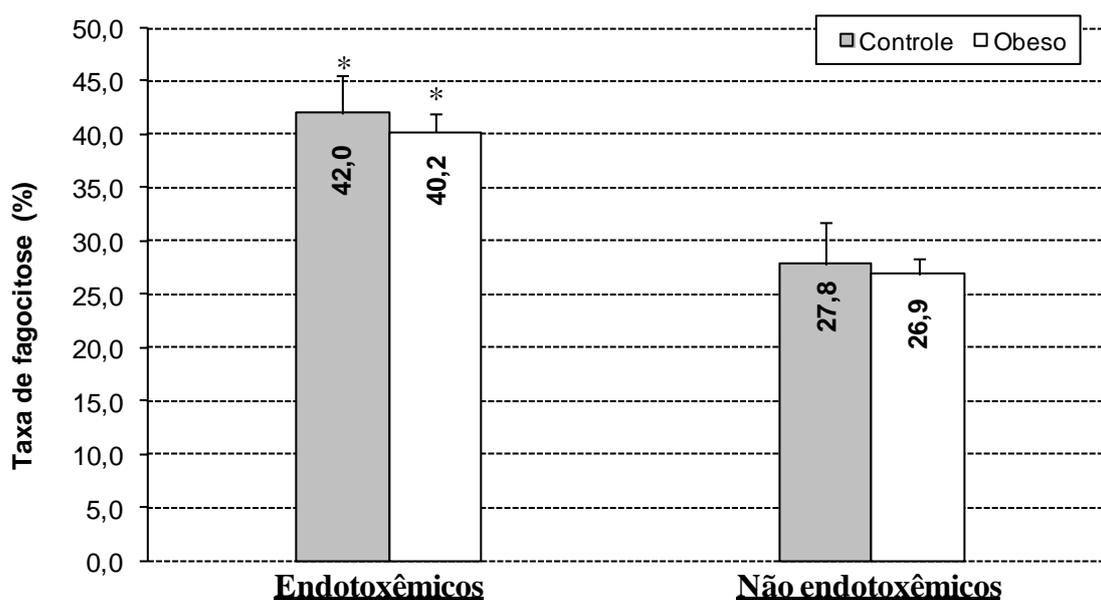
**Tabela 2.** Valores absolutos da contagem total e diferencial de leucócitos do lavado broncoalveolar de ratas *Wistar*. Resultados expressos em média  $\pm$  desvio-padrão. ( $p < 0,05$ ).

<b>Variáveis</b>	<b>DP</b>	<b>DH</b>	<b>DPE</b>	<b>DHE</b>
Leucócitos ( $10^3/\text{mm}^3$ )	110,7 $\pm$ 6,3	116,2 $\pm$ 7,4	156,3 $\pm$ 6,7*	160,4 $\pm$ 8,1*
Neutrófilos ( $10^3/\text{mm}^3$ )	5 $\pm$ 0.9	8 $\pm$ 2.2#	35 $\pm$ 2.5*	37 $\pm$ 2.9*
Eosinófilos ( $10^3/\text{mm}^3$ )	0.134 $\pm$ 0.15	0.112 $\pm$ 0.20	0.322 $\pm$ 0.54	0.351 $\pm$ 0.41
Macrófagos ( $10^3/\text{mm}^3$ )	89 $\pm$ 4.2	91 $\pm$ 3.4	128 $\pm$ 5. 3*	131 $\pm$ 6.7*
Linfócitos ( $10^3/\text{mm}^3$ )	2 $\pm$ 0.54	7 $\pm$ 1.2#	4 $\pm$ 0.78	10 $\pm$ 1.6#

(#) – Efeito da dieta (análise comparativa DPxDH/ DPExDHE). (\*) - Efeito da endotoxemia (análise comparativa DPExDP/ DHExDH).

### Taxa de Fagocitose

Não houve diferença significativa na taxa de fagocitose de macrófagos alveolares entre os grupos DP e DH, mesmo na presença de endotoxemia (DPE x DHE).



**Figura 3.** Taxa de Fagocitose em macrófagos alveolares de ratas *Wistar*. Grupos DP e DPE (Controle) e Grupos DH e DHE (Obeso). Dados expressos por média $\pm$ desvio padrão. \*( $p < 0,05$ ).

### Produção de ON

Na Tabela 3, estão presentes os resultados da análise da produção de ON. Os dados da tabela indicam que não foi encontrada diferença significativa na produção de ON pelos animais obesos (DH) em comparação aos animais não obesos (DP), mesmo na presença da endotoxemia (DHE x DPE).

**Tabela 3.** Análise da produção de óxido nítrico pelos macrófagos alveolares. Efeito da estimulação, *in vitro*, por lipopolissacarídeos (LPS) ou não (Ø). ( $p < 0,05$ ).

Grupos	Ø	LPS
DP	42,5±10,2	73,6±15,6#
DPE	73,4±5,6*	101,7±5,8#
DH	50,1±7,7	99,4±10,6#
DHE	68,2±7,0*	99,5±9,8#

Valores (nM/mL) expressos em Média±desvio-padrão; Significância estatística: Efeito da endotoxemia (\*). Efeito do LPS na cultura (*in vitro*) (#).

### Viabilidade celular

A viabilidade celular dos macrófagos alveolares em meio de cultura foi em torno de 70% e não houve diferença significativa entre os grupos. Dados não apresentados.

## DISCUSSÃO

Nossa pesquisa submeteu animais à um consumo de dieta hiperlipídica, como modelo de indução da obesidade. Mesmo após 18 semanas de consumo, o peso corporal dos animais alimentados com a dieta hiperlipídica (e hipercalórica) não foi superior ao dos animais que receberam dieta padrão normolipídica (e normocalórica). Este resultado foi semelhante à resultados obtidos em outros estudos que utilizaram dietas hiperlipídicas com o mesmo objetivo (9, 27). No entanto, alguns trabalhos apresentaram resultados diferentes aos nossos, com aumento ou diminuição do peso corporal em animais alimentados com dietas ricas em lipídeos e calorias (10, 28, 29, 30). Estas divergências de resultados podem ser explicadas pela diferença de tempo de experimentação nutricional, início de fornecimento da dieta, diferentes tipos de ingredientes usados na confecção e quantidade de lipídeos e calorias presentes nas dietas.

Nesse estudo, observou-se que o consumo de dieta hiperlipídica acarretou num aumento significativo de quantidade de gordura visceral. O aumento da adiposidade no abdômen também foi relatado por vários autores que utilizaram dieta hipercalórica (9, 10, 31). O tecido adiposo acumulado na região visceral é metabolicamente mais ativo em relação aos de outros locais de deposição, com maior atividade secretória de adipocitocinas (10). Em humanos, as complicações metabólicas e cardiovasculares estão quase que exclusivamente relacionadas aos elevados depósitos de gordura visceral (32).

Por ser reconhecidamente como uma doença de baixo grau de inflamação, diversas linhas de evidências têm apoiado um elo entre tecido adiposo e células imunológicas (7). O motivo para afirmar isso é a elevação das concentrações sistêmicas de vários marcadores inflamatórios, como as citocinas pró-inflamatórias e as proteínas de fase aguda, aumentadas em indivíduos obesos (16). Os resultados do presente estudo mostram diferenças em diversos parâmetros hemotológicos: os animais obesos apresentaram leucocitose, neutrofilia e eritrocitose. Com relação à policitemia, esta pode decorrer de aumento da liberação medular. Como o tecido adiposo é também um órgão endócrino, pode-se levantar as hipóteses da ação deste a nível medular.

Em relação ao aumento no número da população de neutrófilos, encontrada neste estudo, foi observando de forma similar em outro estudo, em mulheres, onde foi verificado maior contagem de leucócitos, monócitos e neutrófilos circulantes em obesas (34). Kim e Park (33) observaram que contagem de células periféricas está positivamente correlacionada com o total de gordura. As evidências sugerem que a obesidade, sendo uma doença de baixo grau de inflamação crônica, torna os indivíduos mais predisponentes ao Diabetes Não-Insulino-Dependente (Tipo 2), hipertensão, dislipidemias, diversos tipos de câncer, doenças cardiovasculares, doenças auto-imunes, infecções e inflamações (6). Um elevado número de leucócitos está associado a um maior risco de doenças cardiovasculares, infecção crônica e dano oxidativo (7, 35).

Os processos imunológicos, envolvidos na defesa do organismo, são afetados pelo estado nutricional. Tanto a obesidade quanto a desnutrição alteram a imunocompetência (3). Estudos clínicos e epidemiológicos mostram que a incidência e a gravidade de doenças infecciosas são maiores em indivíduos obesos quando comparado pessoas magras (36, 37, 38). Na análise do lavado broncoalveolar, mesmo com a ausência do processo infeccioso, constatamos que obesidade influenciou, especificamente a migração de neutrófilos e linfócitos para o pulmão, corroborando com um estudo previamente realizado. (11). Devido secreção de leptina estar aumentada em indivíduos obesos, pode haver uma produção linfocitária anormal, porém com reduzida capacidade funcional (39, 40). Esse resultado, no entanto, contrasta com outro estudo no qual não foi verificada diferença significativa na contagem de leucócitos no LBA de indivíduos com obesidade e obesidade mórbida comparados aos indivíduos com peso normal (4). Na presença da infecção, não foi observado comprometimento do recrutamento de fagócitos para o local da infecção (pulmão), resultado semelhante observado anteriormente (11).

Poucos estudos avaliaram o efeito da obesidade sobre a capacidade de fagocitose de macrófagos e granulócitos. No presente estudo, foi observado que a obesidade não comprometeu a capacidade de fagocitose dos macrófagos alveolares, mesmo perante ao processo de infecção sistêmica. Resultado semelhante no estudo de Sohl et al (4), que não

observou dano nesta capacidade, mesmo em pacientes com obesidade mórbida, o grau mais elevado de obesidade (1). Nosso achado não está de acordo com o estudo de Plotkin et al (41). Neste, macrófagos peritoneais de ratos obesos Zucker (rato obeso diabético – fa/fa), infectados com *Candida Albicans* apresentaram capacidade reduzida de fagocitose. Porém, estes pesquisadores utilizaram animais geneticamente incapazes de produzir de leptina.

Finalmente, em relação à produção de ON, são raros os estudos publicados acerca dos efeitos da obesidade sobre a atividade oxidativa de células imunológicas. Neste estudo, verificamos que não houve diferença na produção de ON nos animais sem infecção. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por Santos (42), que estudando os efeitos da obesidade sobre a função imune de animais sedentários e animais submetidos à atividade física, observou que não houve alteração na produção de ON por influência da dieta hiperlipídica nos animais que não praticaram atividade física. Este achado não está de acordo com o obtido por Nieman et al (7), o qual verificou um aumento na a atividade oxidativa de monócitos e granulócitos em indivíduos obesos. Além disso, não foi observada também diferença na produção de ON por macrófagos alveolares dos ratos endotoxêmicos. Acredita-se que a obesidade pode aumentar o risco de desenvolvimento de infecções pulmonares, no entanto os resultados são bastante divergentes (43). Estudando pacientes obesos e com obesidade mórbida, El Sohl et al. (4) não observaram comprometimento da atividade microbicida de macrófagos alveolares nesses pacientes. Silva (44), por outro lado, observou menor produção de ON em resposta à infecção por LPS nos animais obesos.

Em síntese, nosso trabalho demonstrou que a obesidade acarretou em alterações nas contagens de células do sangue periférico e do lavado broncoalveolar, o que significa em maior risco de doenças secundárias da obesidade. Todavia, não comprometeu, de acordo com as nossas análises, as atividades imunológicas frente à endotoxemia. Talvez, à maior susceptibilidade à infecções notadas no âmbito da clínica sejam consequências das próprias co-morbidades associadas à obesidade e das limitações nos cuidados e tratamento de pacientes obesos (45).

## **CONCLUSÃO**

Concluimos que a utilização da dieta hiperlipídica promoveu obesidade representada pelo aumento dos depósitos de gordura visceral na região abdominal dos animais que a consumiram. A ingestão desse tipo de dieta alterou a contagem de alguns parâmetros hematológicos, em virtude do estado de inflamação crônica baixo grau, representando risco para o surgimento de diversas doenças. O recrutamento de células imunes para o pulmão e

as funções de macrófagos alveolares avaliadas, como a taxa de fagocitose e a produção de ON ficaram preservados nos animais obesos, perante o processo infeccioso sistêmico. Talvez o aumento da taxa de infecções observadas em estudos na clínica possam simplesmente um reflexo de co-morbidades e condições associadas à obesidade ou realmente são resultado de uma perturbação nos componentes da resposta imune inata. Isto exige mais investigações, pois na literatura, os resultados ainda são bastante controversos.

## REFERÊNCIAS

1. World Health Organization (2006) Fact sheet No. 311 - Obesity and Overweight. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>, (accessed March 2012).
2. Jebb S. (2004) Obesity: causes and Consequences. *Women's Health Medicine* **1**: 38-41.
3. Samartín S., Chandra R.K. (2001) Obesity, overnutrition and the immune system. *Nutrition Research* **21**: 243-262.
4. El Sohl A., Porhomayona J., Szarpab K. (2009) Proinflammatory and phagocytic functions of alveolar macrophages in obesity. *Obesity Research & Clinical Practice* **3**: 203-207.
5. Ahemed M.L., Ong K., Morrel D., Cox L., Drayer N., Perry L., et al (1999) Longitudinal study of leptin concentrations during puberty: sex differences and relationship to changes in body composition. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **84**: 899-905.
6. Lash M.M., Armstrong A. (2009) Impact of obesity on women's health. *Fertility and Sterility* **91**: 1712-1716.
7. Nieman D.C., Henson D.A., Nehlsen-Cannarella S.L., Ekkens M., Utter A.C., Butterworth D.E., Fagoaga O.R. (1999) Influence of obesity on immune function. *Journal of the American Dietetic Association* **99**: 294-299.
8. Diemen V.V., Trindade E.N., Trindade M.R.M. (2006) Experimental model to induce obesity in rats. *Acta Cirúrgica Brasileira* **21**: 425-429.
9. Estadella D., Oyama, L.M., Dâmaso, A.R., Ribeiro, R.B., Nascimento, C.M.O. (2004) Effect of Palatable Hyperlipidic Diet on Lipid Metabolism of Sedentary and Exercised Rats. *Basic Nutritional Investigations* **20**: 218-224.
10. Duarte A.C.G.O., Fonseca D.F., Manzoni M.S.J., Soave C.F., Sene-Fiorese M., Dâmaso A.R., Cheik, N.C. (2006) Dieta hiperlipídica e capacidade secretória de insulina em ratos. *Revista de Nutrição* **19**: 341-348.
11. Silva K.M.F. (2010) *Efeitos da obesidade sobre parâmetros imunológicos, hematológicos e bioquímicos em ratos endotoxêmicos. Thesis (Masters)*. Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

12. Ahima R.S., Flier J.S. (2000) Adipose tissue as an endocrine organ. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **11**: 327-332.
13. Matarese G., La Cava A. (2005) Immune responses in obesity models. *Drug Discovery Today: Disease Models* **2**: 177-181.
14. Das U.N. (2010) Obesity: Genes, brain, gut, and environment. *Nutrition* **26**: 459-473.
15. German A.J., Ryan V.H., German A.C., Wood I.S., Trayhurn P. (2010) Obesity, its associated disorders and the role of inflammatory adipokines in companion animals. *The Veterinary Journal* **185**: 4-9.
16. Robert R., Spitzer J.A. (1997) Effects of Female Hormones (17 $\beta$ -Estradiol and Progesterone) on Nitric Oxide Production by Alveolar Macrophages in Rats. *NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry* **1**: 453-462.
17. Abbas A.K., Lichtman A.H., Pillai, S. (2008) *Imunologia celular e molecular*. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier.
18. Wai P.Y., Kuo P.C. (2004) Nitric oxide and endotoxin-mediated sepsis: the role of osteopontin. *Gene Therapy and Molecular Biology* **8**: 501-508.
19. Benjamim C.F. (2001) Atualização sobre mediadores e modelos experimentais de sepse. *Medicina* **34**: 18-26.
20. Melo J.F., Macedo E.M.C., Silva R.P.P., Viana M.T., Silva W.T.F., De Castro C.M.M.B. (2010) Atividade antioxidante de macrófagos alveolares em ratos endotoxêmicos. *Pesquisa Veterinária Brasileira* **30**: 358-362.
21. De Castro C.M.M.B., De Castro R.M., Andrade A.D., Brandt C.T. (1997) LPS bacteriano: um mediador de inflamação. *Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco* **42**: 78-83.
22. De Castro C.M., Bureau M.F., Nahori M.A., Dumarey C.H., Vargafitig B.B., Bachelet M. (1995) Modulation by dexamethasone of phospholipase A<sub>2</sub> activities in endotoxemic guinea pig. *Journal of Applied Physiology* **79**: 1271-1277.
23. De Castro C.M.M.B., Castro R.M., Medeiros A.F., Santos, Q.; Silva, W.T.F. Lima Filho J.L. (2000) Effect of stress on the production of O<sub>2</sub> in alveolar macrophages. *Journal of Neuroimmunology* **108**: 68-72.
24. Malagueño E., Albuquerque C., De Castro C.M.M.B., Gadelha M., Irmão J.I., Santana J.F. (1998) Effect of *Biomphalaria straminea* plasma in the phagocytosis of *Biomphalaria glabrata* hemolymph cells. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **93**: 301-302.
25. Feder L.S., Laskin D.L. (1994) Regulation of hepatic endothelial cell and macrophage proliferation and nitric oxide production by GM-CSF, M-CSF, and IL-1 beta following acute endotoxemia. *Journal of Leukocyte Biology* **55**: 507-513.
26. Akao N., Sugimoto N., Thu A.M., Kondo K., Tsuda Y., Fujita K. (2003) A tetrazodium dye (MTT) assay for testing Larval viability using second-stage larvae of *Toxocara canis*. *Japanese Journal of Parasitology* **44**: 109-117.
27. Franco L.D.P., Campos J.A.D.B., Demonte A. (2009) Teor lipídico da dieta, lipídios séricos e peso corporal em ratos exercitados. *Revista de Nutrição*, **22**: 359-366.

28. Pauli J.R., Ropelle E.R., Cintra D.E., Souza, C.T. (2009) Efeitos do exercício físico na expressão e atividade da AMPK $\alpha$  em ratos obesos induzidos por dieta rica em gordura. *Revista Brasileira de Medicina do Esporte* **15**: 98-103.
29. Bernardes D., Manzoni M.S.J., Souza C.P., Tenório, N., Dâmaso A.R. (2004) Efeitos da dieta hiperlipídica e do treinamento de natação sobre o metabolismo de recuperação ao exercício em ratos. *Revista Brasileira de Educação. Física e Esporte* **18**: 191-200.
30. Santos R.S., Vianna L.M. (2007) Dieta hipercalórica agrava a hipertensão arterial em ratos espontaneamente hipertensos. *Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição* **32**: 1-9.
31. Gaíva M.H.G., Couto R.C., Oyama, L.M., Silveira, V.L.F., Ribeiro, E.B., Nascimento, C.M.O. (2001) Polyunsaturated fatty acids rich diets: effect on adipose tissue metabolism in rats. *British Journal of Nutrition* **86**: 371-377.
32. Formiguera X., Canto'n A. (2004) Obesity: epidemiology and clinical aspects. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* **18**: 1125-1146.
33. Kim J.A., Park H.S.. (2008) White blood cell count and abdominal fat distribution in female obese adolescents. *Metabolism Clinical and Experimental* **57**: 1375-1379.
34. Nieman D.C., Nehlsen-Cannarella S.I., Henson D.A., Butterworth D.E., Fagoaga O.R., Warren B.J., Rainwater M.K.. (1996) Immune responses to obesity and moderate weight loss. *International Journal of Obesity* **20**: 353-360.
35. Sweetnam P.M., Hugh F.T., Yarnell J.W.G., Baker I.A., Elwood P.C. (1997) Total and Differential Leukocyte Counts as Predictors of Ischemic Heart Disease: The Caerphilly and Speedwell Studies American. *Journal of Epidemiology* **145**: 416-421.
36. Womack J., Tien P.C., Feldman J., Shin J.H., Fennie K., Anastos K., Cohen M.H., Bacon M.C., Minkoff H. (2007) Obesity and immune cell counts in women. *Metabolism Clinical and Experimental* **56**: 998-1004.
37. Fasol R, Schindler M., Schumacher B., Schlaudraff K., Hannes W., Seitelberger R., Schlosser V. (1992) The influence of obesity on perioperative morbidity: retrospective study of 502 aortocoronary bypass operation. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* **40**: 126-129.
38. Gottschlich M.M., Mayes T., Khoury J., Warden G. (1993) Significance of obesity on nutritional, immunologic, hormonal and clinical outcome parameters in burns. *Journal of the American Dietetic Association* **93**: 1261-1268.
39. Juge-Aubry C.E., Meier C.A. (2002) Immunomodulatory actions of leptin. *Molecular and Cellular Endocrinology* **194**: 1-7.
40. Silveira M.R., Frollini A.R., Verlengia, R., Cavaglieri, C.R. (2009) Correlação entre obesidade, adipocinas e sistema imunológico. *Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano* **11**: 466-472.
41. Plotkin B.J., Paulson D., Chelich A., Jurak D., Cole J., Kasimos J., Burdick J.R., Casteel N. (1996) Immune responsiveness in a rat model for type II diabetes (Zucker rat, fa/fa): susceptibility to *Candida albicans* infection and leucocyte function. *Journal of Medical Microbiology* **44**: 277-283.

42. Santos P.C.P. (2012) *Repercussões do treinamento físico moderado nos parâmetros imunológicos em ratas obesas. Thesis (Masters)*. Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
43. Mancuso P. (2010) Obesity and lung inflammation. *Journal of Applied Physiology* **108**: 722-728.
44. Silva, R.R. (2012) *Efeitos da obesidade sobre parâmetros da resposta imunológica em ratos submetidos à endotoxemia. Thesis (Doctorate)*. Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
45. Fálagas, M.E., Kompoti, M. (2006) Obesity and infection. *Lancet Infect Disease* **6**: 438–446.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS DA DISSERTAÇÃO

- Os nossos resultados reforçam que o consumo crônico de dieta hiperlipídica gera consequências negativas na homeostase energética de um organismo. A dieta rica em gorduras e caloridas fornecida aos animais, apesar de ter resultado em aumento considerável de peso comparado ao peso de animais alimentados com dieta saudável, promoveu a obesidade representada pelo acúmulo anormal de adiposidade na região visceral. Em humanos, o acúmulo de gordura nessa região está primariamente implicado aos riscos de desenvolvimento de doenças do sistema imunológico.
- As alterações correspondentes aos parâmetros imunológicos distorcidos revelam que a obesidade promoveu uma redistribuição dos componentes celulares do sangue, possivelmente explicada pelo conseqüente do estado de inflamação sistêmica do organismo, através de modulação da doença sobre o sistema imune.
- Com relação ao recrutamento de células imunes para o pulmão e ao comprometimento das capacidades essenciais ao combate aos processos infecciosos de macrófagos alveolares, não verificamos comprometimento das funções de fagocitose e atividade microbicida destas células. Na literatura, os achados são bastante controversos. Talvez o aumento da taxa de infecções observadas em estudos na clínica possam simplesmente um reflexo das comorbidades e condições associadas à obesidade ou realmente são resultado de uma perturbação nos componentes da resposta imune inata.
- Evidenciamos a importância de novos estudos com este tema. Tem-se como perspectiva a realização de novos trabalhos com ratas fêmeas, aplicando o modelo de indução da obesidade com dieta similar, com novas análises: bioquímicas (glicogênese, gliconeogênese, lipogênese e lipólise); análises hormonais; estudos das citocinas; consumo alimentar, administração de diferentes períodos de administração da mesma dieta; corporais análises do sistema de coagulação, dentre outros.

## REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H.; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

AHEMED, M.L. et al. Longitudinal study of leptin concentrations during puberty: sex differences and relationship to changes in body composition. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 84, p. 899–905, 1999.

AHIMA, R.S.; FLIER, J.S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 11, p. 327-332, 2000.

AKAO, N. et al. A tetrazodium dye (MTT) assay for testing Larval viability using sccond-stage larvae of toxocara canis. **Japanese Journal of Parasitology**, v. 44, p.109-117, 2003.

ALVES, M.N.R. Os efeitos da obesidade na resposta imune. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 21, n. 4, p. 316-319, 2006.

BENATTI, F.B., LANCH JR, A.H. Leptina e exercício físico aeróbio: implicações da adiposidade corporal e insulina. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v. 13, n. 4, p. 263-269, 2007.

BENJAMIM, C.F. Atualização sobre mediadores e modelos experimentais de sepse. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 34, p. 18-26, 2001.

BENSON et al. Effects of obesity on neuroendocrine, cardiovascular, and immune cell responses to acute psychosocial stress in premenopausal women. **Psychoneuroendocrinology**, v. 34, p. 181-189, 2009.

BERG, A.H.; SCHERER, P.E. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. **Circulation Research**, v. 96, n. 9, p. 939-949, 2005.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response. **Nature immunology**, v. 2, n. 10, p. 907-916, 2001.

BULLÓ, M. et al. Systemic inflammation, adipose tissue tumor necrose factor and Leptin expression. **Obesity Research**, v. 11, n. 4, p. 525-531, 2003.

CAMPFIELD, L.A. et al. Recombinant mouse OB protein: evidence for a peripheral signal linking adiposity and central neural networks. **Science**, v. 269, p. 546-549, 1995.

CHANDRA, R.K. Nutrition and the immune system: an introduction. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 66, p. 460-463, 1997.

CHENG, Z.W. et al. Pulmonary inflammatory cell response to sustained endotoxin administration. **Journal of Applied Physiology**, v. 76, n. 2, p. 516-522, 1994.

COSTA, J. V.; DUARTE, J.S. Tecido adiposo e adipocinas. **Acta Médica Portuguesa**, v. 19, p. 251-256, 2006.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S.L. **Robins – Patologia Estrutural e Funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000.

CRESPO, E. et al. Melatonin inhibits expression of the inducible NO synthase II in liver and lung and prevents endotoxemia in lipopolysaccharide-induced multiple organ dysfunction syndrome in rats. **The FASEB Journal**, v. 13, p. 1537-1546, 1999.

DAS, U.N. Obesity: Genes, brain, gut, and environment. **Nutrition**, v. 26, p. 459–473, 2010.

DE CASTRO, C.M.M.B. et al. LPS bacteriano: um mediador de inflamação. **Anais da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pernambuco**, Recife, v. 42, p. 78-83, 1997.

DE CASTRO, C.M.M.B. et al. Effect of stress on the production of O<sub>2</sub> in alveolar macrophages. **Journal of Neuroimmunology**, v. 108, p. 68-72, 2000.

DIEMEN, V.V.; TRINDADE, E.N.; TRINDADE, M.R.M. Experimental model to induce obesity in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, n. 6, p. 425-429, 2006.

DOSSETT, L.A. et al. Obesity and Site-Specific Nosocomial Infection Risk in the Intensive Care Unit. **Surgical Infections**, v. 10, p. 137-142, 2009.

DUARTE, A.C.G.O. et al. Dieta hiperlipídica e capacidade secretória de insulina em ratos. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 3, p. 341-348, 2006.

ESTADELLA, D. et al. Effect of Palatable Hyperlipidic Diet on Lipid Metabolism of Sedentary and Exercised Rats. **Basic Nutritional Investigations**, v. 20, p. 218-224, 2004.

FAGGIONI, R.; FEINGOLD, K.R.; GRUNFELD, C. Leptin regulation of the immune response and the immunodeficiency of malnutrition. **The FASEB Journal**, Vol. 15, P. 2565-2571, 2001.

FÁLAGAS, M.E.; KOMPOTI, M. Obesity and infection. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 6, p. 438-446, 2006.

FANTUZZI, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 5, n. 115, p. 911-919, 2005.

FASOL, R. et al. The influence of obesity on perioperative morbidity: retrospective study of 502 aortocoronary bypass operation. **The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery**, v. 40, p. 126-129, 1992.

FEDER, L.S.; LASKIN, D.L. Regulation of hepatic endothelial cell and macrophage proliferation and nitric oxide production by GM-CSF, M-CSF, and IL-1 beta following acute endotoxemia. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 55, n. 4, p. 507-513, 1994.

FLEGAL, K.M. et al. Prevalence and Trends in Obesity Among US Adults, 1999-2008. **The Journal of the American Medical Association (JAMA)**, v. 303, n. 3, p. 235-241, 2010.

FOGG, D.K. et al. A Clonogenic Bone Marrow Progenitor Specific for Macrophages and Dendritic Cells. **Science**, v.311, p. 83, 2006.

FONSECA-ALANIZ, M.H. et al. O tecido adiposo como centro regulador do metabolismo. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia e Metabiologia**, v. 50, n. 2, p. 216-229, 2006.

FORMIGUERA, X.; CANTOÑ, A. Obesity: epidemiology and clinical aspects. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 18, n. 6, p. 1125-1146, 2004.

GAGNON, E. et al. Endoplasmic Reticulum-Mediated Phagocytosis Is a Mechanism of Entry into Macrophages. **Cell**, v. 110, n. 1, p. 119-131, 2002.

GAÍVA, M.H.G. et al. Polyunsaturated fatty acids rich diets: effect on adipose tissue metabolism in rats. **British Journal of Nutrition**, v. 86, p. 371-377, 2001.

GERKHE, J.; PEREIRA, R.Z. Associação do Fator de Necrose Tumoral-ALFA (TNF- $\alpha$ ) com a obesidade. **Revista Brasileira de Obesidade, Nutrição e Emagrecimento**. v. 1, n.1, p. 1-10, 2007.

GERMAN, A.J. et al. Obesity, its associated disorders and the role of inflammatory adipokines in companion animals. **The Veterinary Journal**, v. 185, p. 4-9, 2010.

GOTTSCHLICH, M.M. et al. Significance of obesity on nutritional, immunologic, hormonal and clinical outcome parameters in burns. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 93, p. 1261-1268, 1993.

GUIMARÃES, D.E.D. et al. Adipocitocinas: uma nova visão do tecido adiposo. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 20, n. 5 p. 549-559, 2007.

GUTIERREZ, F.R.S. et al. The effects of nitric oxide on the immune system during Trypanosoma cruzi infection. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, s. I, p. 236-245, 2009.

HAM, A.W.; CORMACK, D.H. Histologia. 9 Ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. 1991.

HARKNESS, J.E. Biologia e manejo. In **Biologia clínica de coelhos e roedores**. Roca, cap. 2, p.9-55, 1993. FISHBECK, K.L., RASMUSSEN, K.M. Effect of repeated cycles on maternal nutritional status, lactational performance and litter growth in ad libitum-fed and chronically food-restricted rats. **Journal of Nutrition**, Bethesda, v.117, n.11,p. 1967-1975, 1987.

HAVEL, P.J. Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. **Diabetes**, v. 53, s. 1, p. 143-151, 2004.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Pesquisa de orçamento familiar (POF), 2008/2009. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>.

JAMES, W.P.T. The epidemiology of obesity: the size of the problem. **Journal of Internal Medicine**, p. 1365-2796, 2008.

JEBB, S. Obesity: causes and Consequences. **Women's Health Medicine**, v. 1, n. 1, p. 38-41, 2004.

JUGE-AUBRY, C.E.; MEIER, C.A. Immunomodulatory actions of leptin. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 194, p. 1-7, 2002.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2004.

LASH, M.M.; ARMSTRONG, A. Impact of obesity on women's health. **Fertility and Sterility**, v. 91, n. 5, p. 1712-1716, 2009.

LEITE, L.D; ROCHA, E.D.M.; BRANDÃO-NETO, J. Obesidade: uma doença inflamatória. **Revista Ciência & Saúde**, Porto Alegre, v. 2, n. 2, p. 85-95, 2009.

MAFRA, D.; FARAGE, N.E. O papel do tecido adiposo na doença renal crônica. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, São Paulo, v. 28, n. 2, 2006.

MALAGUEÑO, E. et al. Effect of Biomphalaria straminea Plasma in the Phagocytosis of Biomphalaria glabrata Hemolymph Cells. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 93, n. 1, p. 301-302, 1998.

MARTÍ, A., MARCOS, A., MARTINEZ, J.A. Obesity and immune function relationships. **Obesity Reviews**, v. 2, p. 131-140, 2001.

MÁRTON, I.J.; KISS, C. Protective and destructive immune reactions in a apical periodontitis. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 5, p. 139-150, 2000.

MATARESE, G.; LA CAVA, A. Immune responses in obesity models. **Drug Discovery Today: Disease Models**, v. 2, n. 3, p. 177-181, 2005.

MATARESE, G. et al. Regulatory T cells in obesity: the leptin connection. **Trends in Molecular Medicine**, v. 16, p. 247-256, 2010.

MELO, F.M. et al. Atividade antioxidante de macrófagos alveolares em ratos endotoxêmicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 4, p. 358-362, 2010.

MIRANDA, V.R.M.; CORTEGUERA, R.L.R. Óxido Nítrico/Sepsis. Controversias en su metabolismo, funciones y utilización. **Revista Cubana de Pediatría**, v. 71, n. 4, p. 238-244, 1999.

MOULTON, M.J. et al. Obesity is not a risk factor for significant adverse outcomes after cardiac surgery. **Circulation**, v. 94, p. 87-92, 1994.

NIEMAN, D.C. et al. Influence of obesity on immune function. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 99, p. 294–299, 1999.

O'KEEFE, R.J. et al. Osteoclasts constitutively express regulators of bone resorption: an immunohistochemical and in situ hybridization study. **Laboratory Investigation**, v. 76, n. 4, p. 457-465, 1997.

OTERO, M. et al. Leptin, from fat to inflammation: old questions and new insights. **FEBS Letters**, v. 579, n. 2, p. 295-301, 2005.

OUCHI, N. et al. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. **Circulation**, v. 100, n. 25, p. 2473-2476, 1999.

PEAKMAN, M, VERGANI, D. **Imunologia básica e clínica**. Ed. Guanabara Koogan. Rio de Janeiro, 1999.

PETSCH, D.; ANSPACH, F.B. Endotoxin removal from protein solutions. **Journal of Biotechnology**, v. 16, p. 97-119, 2000.

PINHEIRO, A.R.O.; FREITAS, S.F.T; CORSO, A.C.T. Uma abordagem epidemiológica da obesidade. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.17, n. 4, p. 523-533, 2004.

PRINS, J.B. Adipose tissue as an endocrine organ. **Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 16, n. 4, p. 639-651, 2002.

ROBERT, R.; SPITZER, J.A. Effects of Female Hormones (17 $\beta$ -Estradiol and Progesterone) on Nitric Oxide Production by Alveolar Macrophages in Rats. **NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry**, v. 1, n. 6, p. 453–462, 1997.

ROMERO, C.E.M.; ZANESCO, A. O papel dos hormônios leptina e grelina na gênese da obesidade. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, n. 1, p. 85-91, 2006.

RUBINS, J.B. Alveolar Macrophages Wielding the Double-Edged Sword of Inflammation. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 167, n. 2, p. 103-104, 2003.

RUDIN, E.; BARZILAI, N. Inflammatory peptides derived from adipose tissue. **Immunity and Ageing**, v. 2, p. 1-3, 2005.

SAMARTÍN, S.; CHANDRA , R.K. Obesity, overnutrition and the immune system. **Nutrition Research**, v.21, p. 243-262, 2001.

SANTOS, R.S., VIANNA, L.M. Dieta hipercalórica agrava a hipertensão arterial em ratos espontaneamente hipertensos. **Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, v. 32, n. 1, p. 1-9, 2007.

SEIDELL, J.C. Epidemiology and health economics of obesity. **Medicine**, v. 34, n. 12, p. 506-509, 2006.

SILVA, K.M.F. **Efeitos da obesidade sobre parâmetros imunológicos, hematológicos e bioquímicos em ratos endotoxêmicos.** UFPE. 2010. *Dissertação* (Mestrado em Nutrição) – Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

SILVEIRA, M.R. et al. Correlação entre obesidade, adipocinas e sistema imunológico. **Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano**, v. 11, n. 4, p. 466-472, 2009.

SHILLS, M.A. et al. *Modern Nutrition in Health and Disease*, 10th Edition. **Lippincott Williams & Wilkins**, 2006.

SOUTO, P.C.M.C. **Caracterização da reação inflamatória induzida pelo veneno de serpente *Bothrops insularis*: influxo leucocitário, liberação de mediadores inflamatórios e mecanismos envolvidos nesses efeitos.** USP. 2009. *Dissertação* (Mestrado em Farmacologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

STALLONE, D.D. The influence of obesity and its treatment on the immune system. **Nutrition Reviews**, v. 52, p. 37-50, 1994.

STOHLAWETZ, P et al. Effects of endotoxemia on thrombopoiesis in men. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 81, n. 4, p. 613-617, 1999.

SWEETNAM, P.M. et al. Total and Differential Leukocyte Counts as Predictors of Ischemic Heart Disease: The Caerphilly and Speedwell Studies American. **Journal of Epidemiology**, v. 145, n. 5, p. 416-421, 1997.

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

TAPPER, H. The secretion of preformed granules by macrophages and neutrophils. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 59, 613-622, 1996.

TILG, H.; MOSCHEN, A.R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and Immunity. **Nature Publishing Group**, v. 6, p. 772-783, 2006.

TURVEY, S.E.; BROIDE, D.H. Innate immunity. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 125, n. 2, p. 24-32, 2010.

WAI, P.Y.; KUO, P.C. Nitric oxide and endotoxin-mediated sepsis: the role of osteopontin. **Gene Therapy and Molecular Biology**, v. 8, p. 501-508, 2004.

WELBOURN, C.R.B.; YOUNG, Y. Endotoxin, septic shock and acute lung injury: neutrophils, macrophages and inflammatory mediators. **British Journal of Surgery**, v. 79, p. 998-1003, 1992.

WHO Consultation on Obesity, *Obesity: preventing and managing the global epidemic.* **World Health Organization.** Technical Report Series 894, Geneva, 2000.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity: preventing and managing the global epidemic. **World Health Organization**, 2005.

WHO. Fact sheet No. 311 - Obesity and Overweight. Acesso: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>, 14/03/2012. **World Health Organization**, 2006.

WOMACK, J. et al. Obesity and immune cell counts in women. **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 56, p. 998–1004, 2007.

XU, H. et al: Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 112, n. 12, p. 1821-1830, 2003.

YOKOTA, T. et al. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. **Blood**, v. 96,p. 1723-1732, 2000.

ZHANG, Y. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. **Nature**, v. 372, p.425-432, 1994.

## ANEXO 1 – Aprovação do Projeto pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal

Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n  
50670-420 / Recife - PE - Brasil  
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351  
fax: (55 81) 2126 8350  
www.ccb.ufpe.br



Recife, 16 de fevereiro de 2011.

Ofício nº 355/11

Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE  
Para: **Profa. Maria do Amparo Andrade**  
Departamento: Departamento de Fisioterapia /  
Processo nº 23076.055317/2010-85

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado, "**Efeitos da obesidade sobre parâmetros imunológicos de ratas fêmeas submetidas à endotoxemia.**"

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Observação: Origem dos animais: Biotério de Nutrição da UFPE; Animais: Ratos; Sexo: Fêmeas; Linhagem: Wistar; Idade: 126 dias; N° de animais previstos no projeto: 32 animais.

Atenciosamente,

 Prof. Maria Teresa Jansen  
Presidente do CEEA