

ROSANGELA ROSENDO DA SILVA

EFEITOS DA OBESIDADE SOBRE PARÂMETROS DA  
RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM RATOS SUBMETIDOS À  
ENDOTOXEMIA

Recife

2012

ROSANGELA ROSENDO DA SILVA

EFEITOS DA OBESIDADE SOBRE PARÂMETROS DA  
RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM RATOS SUBMETIDOS À  
ENDOTOXEMIA

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Doutor em Nutrição.

Orientadora: Célia Maria Machado  
Barbosa de Castro

Recife

2012

Catálogo na fonte  
Bibliotecária Giseani Bezerra, CRB4-1738

S586e Silva, Rosângela Rosendo da.  
Efeitos da obesidade sobre parâmetros da resposta imunológica em ratos submetidos à endotoxemia / Rosângela Rosendo da Silva. – Recife: O autor, 2012.  
155 folhas : il. ; 30 cm.

Orientador: Célia Maria Machado Barbosa de Castro.  
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Nutrição, 2012.  
Inclui bibliografia e anexos.

1. Espécies de oxigênio reativas. 2. Imunidade. 3. Obesidade. 4. Endotoxemia. 5. Ratos. I. Castro, Célia Maria Machado Barbosa de (Orientador). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2012-131)

ROSANGELA ROSENDO DA SILVA

EFEITOS DA OBESIDADE SOBRE PARÂMETROS DA RESPOSTA  
IMUNOLÓGICA EM RATOS SUBMETIDOS À ENDOTOXEMIA

Tese aprovada em: 07 de março de 2012.

BANCA EXAMINADORA

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Flávia Regina Gonçalves de Araújo, Universidade Federal de Pernambuco.

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Silvia Regina de Arruda, Universidade Federal de Pernambuco.

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maria do Amparo Andrade, Universidade Federal de Pernambuco.

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Tânia Lúcia Montenegro Stamford, Universidade Federal de Pernambuco.

---

Prof<sup>ª</sup>. Dra. Célia Maria Machado Barbosa de Castro, Universidade Federal de Pernambuco.

Às pessoas mais importantes da minha vida

Pelo amor imenso e altruísmo absoluto:

Aos meus pais **Antonio** e **Lourdes**,

Por ser meu exemplo de conduta moral e de vida...

Pelo incentivo e apoio constante... Amo vocês.

Ao meu esposo, **Augusto**, meu companheiro,

Pelo apoio, paciência, compreensão... Te amo.

Ao meu filho, **Marcus Vinícius**, minha razão de viver.

Agradeço todos os dias o privilégio de ser sua mãe... Te amo.

A vocês não dedico apenas este trabalho, mas todas as futuras conquistas da minha vida...

## AGRADECIMENTOS

*A Deus, pela oportunidade da Vida, por preservar minha esperança nesta caminhada e por sempre colocar no meu caminho pessoas que de uma forma ou de outra, me ajudam a crescer.*

*À minha família, que mesmo longe, é sempre tão presente na minha vida, me fazendo sentir o que é o verdadeiro amor.*

*Aos meus pais por todos os ensinamentos que trouxeram até este ponto da minha vida. Sem eles tudo seria mais difícil, se não impossível.*

*Ao meu esposo Augusto, pelo amor, carinho, compreensão, pela força de sempre seguir em frente e pelas conversas, mesmo não sabendo do que se tratava me escutava e me fazia sugestões e críticas, muito obrigada você é uma pessoa muito especial na minha vida.*

*A meu filho Marcus Vinícius, meu grande amor, a razão de tanta força e determinação na busca de um sonho, pelo tempo que não pude estar ao seu lado, mas em pensamento nunca estive tão perto de você... “Eu te amo até a lua... IDA E VOLTA<sup>1</sup>“.*

*Agradeço também a Maria das Graças e Joaquim, meus sogros, por todo o apoio para que eu conseguisse realizar esse trabalho.*

*A Professora Célia Castro, minha orientadora desde a iniciação científica, pelas oportunidades que me proporcionou e pela confiança que depositou em mim.*

*As pessoas que tiveram uma participação direta na realização deste trabalho: Karla Melo e Solange Porto, muito obrigada.*

*À Vanessa Oliveira, pela atenção, carinho e imprescindível auxílio durante os experimentos com animais.*

*A Bruno Sampaio, pela colaboração e disponibilidade para realização deste trabalho.*

*À Patrícia pela ajuda na realização dos experimentos no decorrer deste estudo.*

*Aos estagiários, Péricles e Etiene pelo cuidado na manutenção dos animais.*

*Aos animais, cujo sacrifício foi necessário para a concretização deste trabalho, e sem vocês nada poderia ter acontecido, muitíssimo obrigado.*

*A todos os funcionários do biotério e, em especial ao Sr. Edeones França e ao Sr. José Paulino Ventura (in memoriam) por tornarem possível a realização deste estudo.*

*Aos professores e funcionários da Pós Graduação em Nutrição, pela ajuda sempre que necessária e por ter me proporcionado atingir esta meta.*

*Ao LIKA, pela oportunidade de realização deste trabalho.*

*À FACEPE e CNPq pelo auxílio financeiro concedido.*

*... e a todos àqueles que de alguma forma participaram e contribuíram para a realização deste trabalho, e que não foram citados, mas com certeza não foram esquecidos...*

*A todos meus sinceros agradecimentos...*

---

<sup>1</sup> Do livro “Adivinha quanto eu te amo” (Sam MacBratney)

*O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.  
Caminhando e semeando, no fim terás o que colher.*

*Cora Coralina*

## RESUMO

Este estudo objetivou avaliar o efeito da obesidade na endotoxemia sobre aspectos funcionais de macrófagos alveolares em ratos adultos. Ratos machos *Wistar* (n=40) foram divididos em grupos dieta padrão (DP) constituído de 20 animais que receberam dieta padrão do biotério (Labina® - Purina do Brasil S/A) e dieta hiperlipídica (DH) formado por 20 animais que receberam dieta hipercalórica e hiperlipídica durante 18 semanas. Após esse período, os grupos foram subdivididos em endotoxêmicos (DPE E DHE) e não endotoxêmicos (DP e DH). Para obtenção dos grupos endotoxêmicos, os animais receberam injeção intraperitoneal de lipopolissacarídeo, na dose de 1mg/Kg de peso corporal. Após esse período, foi realizado o procedimento de traqueostomia para obtenção do lavado broncoalveolar (LBA) e, a partir dos macrófagos isolados desse lavado, foram realizadas contagem total e diferencial de leucócitos, além de avaliar índice de aderência, viabilidade celular, e as quantidades de superóxido e óxido nítrico (NO) produzidos pelas células isoladas. Obesidade induzida por dieta hiperlipídica associada com estados endotoxemia levou a uma redução na produção de superóxido por macrófagos alveolares. Alteração da produção de óxido nítrico também foi encontrada entre os grupos. A endotoxemia causou um aumento na produção de NO, porém, quando associado à obesidade observou-se uma redução desta produção. Mesmo com a tendência para valores mais baixos, não houve alteração no índice de aderência e viabilidade celular entre os grupos. Uma diminuição na função oxidante dos macrófagos alveolares em resposta a obesidade associada com endotoxemia mostra comprometimento da resposta imune frente a um processo infeccioso.

**DESCRITORES:** espécies reativas de oxigênio, imunidade, obesidade, endotoxemia, ratos.

## ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the effect of obesity on endotoxemia on the functional aspects of alveolar macrophages in adult rats. Male *Wistar* rats (n=40) were divided in two groups: standard diet (SD) group, composed of 20 animals that received the standard diet from the bioterium (Labina ®-Purina do Brasil S/A) and hyperlipidic diet group (HD), which consisted of 20 animals that received a hypercaloric and hyperlipidic diet during 18 weeks. After this period, the groups were subdivided into endotoxemic (SDE and HDE) and non-endotoxemic (SD and HD). In order to obtain the endotoxemic groups, the animals received an intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (1mg/Kg of body weight). The tracheostomy procedure was then done in order to obtain the bronchoalveolar lavage. From the macrophages isolated from this lavage, total and differential leukocyte count were done, as well as the evaluation of adhesion index, cellular viability and superoxide and nitric oxide (NO) produced by the isolated cells. Obesity induced by hyperlipidic diet associated with endotoxemia states caused a reduction in the macrophages production of superoxide anion. Alteration to the nitric oxide production also occurred between the groups. Endotoxemia caused an increase in NO production; obesity, on the other hand, caused the reduction of this production. Even with the tendency to lower values, there was no alteration to the adhesion index and cellular viability between the groups. A decrease in the oxidizing function of alveolar macrophages in response to obesity associated with endotoxemia shows immune response compromise when facing an infectious process.

Key words: reactive oxygen species, immunity, obesity, endotoxemia, rats.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b>	Organograma de divisão dos grupos.....	43
<b>Figura 2.</b>	Confecção da dieta hiperlipídica.....	44
<b>Figura 3.</b>	Contagem de leucócitos.....	47
<b>Figura 4.</b>	Obtenção do LBA.....	49
<b>Figura 5.</b>	Procedimento para contagem das células do LBA.....	51
<b>Figura 6.</b>	Células do LBA em cultura.....	51
<b>Figura 7.</b>	Procedimento para análise da produção de superóxido.....	53
<b>Figura 8.</b>	Procedimento para análise da produção de óxido nítrico.....	54
<b>Quadro 1.</b>	Construção de curva padrão para dosagem de óxido nítrico.....	55

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Composição da dieta Labina.....	45
<b>Tabela 2.</b>	Composição da dieta Hiperlipídica utilizada na alimentação dos animais.....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DH	Grupo dieta hiperlipídica
DHE	Grupo dieta hiperlipídica endotoxêmico
DP	Grupo dieta padrão
DPE	Grupo dieta padrão endotoxêmico
EDTA	Ácido etileno diaminotetraacético
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxido de hidrogênio
IL-1	Interleucina-1
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-18	Interleucina-18
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzida
LBA	Lavado Broncoalveolar
LPS	Lipopolissacarídios
NaCl	Cloreto de sódio
NaNO <sub>2</sub>	Nitrato de sódio
NK	Natural Killer
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superóxido
OMS	Organização Mundial da Saúde
ON	Óxido nítrico
PMA	Acetato miristato de forbol
ROIs	Intermediários reativos de oxigênio
SFM	Sistema de fagócitos mononucleares
SOD	Superóxido dismutase
TNF- $\alpha$	Fator de necrose Tumoral Alfa

## SUMÁRIO

<b>1 APRESENTAÇÃO</b> .....	13
<i>Hipótese</i> .....	18
<i>Objetivos</i> .....	18
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	19
<i>Obesidade</i> .....	20
<i>Etiologia da obesidade</i> .....	21
<i>Modelos experimentais de obesidade</i> .....	23
<i>Modelos genéticos de obesidade</i> .....	24
<i>Modelos não-genéticos de obesidade</i> .....	25
<i>Tecido adiposo</i> .....	28
<i>Leptina</i> .....	29
<i>Adiponectina</i> .....	30
<i>Interleucinas</i> .....	31
<i>Sistema imune</i> .....	32
<i>Macrófagos</i> .....	34
<i>Endotoxemia e reação inflamatória</i> .....	36
<i>Obesidade, sistema imune e doença</i> .....	38
<b>3 MÉTODOS</b> .....	42
<i>Animais</i> .....	43
<i>Grupos experimentais</i> .....	43
<i>Dietas</i> .....	45
<i>Avaliação do peso corporal</i> .....	47
<i>Consumo alimentar e calórico</i> .....	47
<i>Contagem total e diferencial de leucócitos no sangue</i> .....	48
<i>Análise das células do LBA</i> .....	49
<i>Contagem total e diferencial de leucócitos no LBA</i> .....	50
<i>Função dos macrófagos</i> .....	51
<i>Análise da produção de superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>)</i> .....	53
<i>Análise da produção de óxido nítrico (ON)</i> .....	54
<i>Análise da viabilidade celular</i> .....	57
<i>Avaliação do índice de aderência (IA)</i> .....	57
<i>Obtenção da gordura visceral</i> .....	58
<i>Análise estatística</i> .....	58
<b>4 RESULTADOS</b> .....	59
Artigo I – “Obesity and microbicidal activity of alveolar macrophages in adult rats”.....	61
Artigo II – “Endotoxemia and obesity: repercussion on functional aspects of alveolar macrophage”.....	96
<b>5 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	130
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	132
<b>ANEXOS</b> .....	151
ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	152
ANEXO B – Composição centesimal da dieta Hiperlipídica.....	153
ANEXO C – Documentação de encaminhamento do artigo “Obesity and microbicidal activity of alveolar macrophages in adult rats” ao periódico.....	154
ANEXO D – Documentação de encaminhamento do artigo “Endotoxemia and obesity: repercussion on functional aspects of alveolar macrophage” ao periódico... ..	155

# APRESENTAÇÃO

---

## 1 APRESENTAÇÃO

A obesidade é definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma patologia complexa que apresenta graves dimensões sociais e psicológicas e que afeta praticamente todas as faixas etárias e grupos socioeconômicos (WHO, 2008).

A obesidade é considerada um dos maiores problemas de saúde pública. Nas últimas décadas sua prevalência vem apresentando números cada vez mais elevados e, portanto, deixou de ser um problema restrito a alguns segmentos da sociedade para se tornar um grave problema mundial (TRASANDE et al., 2010).

De forma geral, o aumento da prevalência da obesidade tem sido explicado por alterações na alimentação (elevado consumo de alimentos ricos em gordura e de alto valor calórico além da redução na ingestão de frutas e verduras) e por mudanças no estilo de vida, como redução da atividade física cotidiana, associados à predisposição genética (MONTEIRO; CONDE; POPKIN, 2007; VAMOSI; HEITMANN; KYVIK, 2010). Contudo outros mecanismos de origem socioeconômica, cultural, emocional e comportamental também atuam, em diferentes combinações, na gênese do excesso de peso (PINE et al., 1997)

Segundo Conway e René (2004), a obesidade pode gerar prejuízo no estado normal do organismo, modificando completamente algumas das funções vitais como a cardíaca, pulmonar, endócrina e imune.

As modificações imunológicas que ocorrem devido à obesidade afetam a resposta imunológica como um todo, levando a alterações sobre a imunidade humoral, sobretudo secreção de anticorpos, como também a imunidade celular, especialmente o recrutamento de

leucócitos e subpopulações linfocitárias e proliferação de linfócitos em resposta a mitógenos (MARCOS; NOVA; MONTERO, 2003).

A endotoxemia, marcada por altos níveis de endotoxina no sangue, causa forte reação inflamatória com lesão endotelial, hipotensão, falência múltipla dos órgãos podendo levar a morte (HEWETT; ROTH, 1993). No local da injúria tecidual os fatores quimiotáticos atraem células sanguíneas que atravessam a barreira endotelial. Dentre estas células, os neutrófilos são as que estão presentes em maior número, seguidos dos monócitos que se diferenciam em macrófagos nos tecidos. Os neutrófilos e macrófagos são fagócitos com a capacidade de internalizar partículas, células alteradas do indivíduo, microrganismos e parasitas. Dessa forma, a fagocitose constitui um importante mecanismo que ocorre no processo inflamatório (SUNIL et al., 2002).

Os macrófagos pertencem ao sistema dos fagócitos mononucleares e constituem a segunda maior população celular do sistema imune. Após o contato com o agente agressor, estas células liberam citocinas que iniciam e amplificam o processo inflamatório (ROGATTO et al., 2004). A ativação dos macrófagos por endotoxinas induz a produção intracelular do ânion superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), e outras potentes substâncias microbidas que são responsáveis pela destruição dos microrganismos fagocitados (BRUNDTLAND, 2000; BORELLI et al., 2004). Essas células ativadas apresentam uma série de diferenças morfológicas, funcionais e metabólicas quando comparadas às células não ativadas. Assim, os macrófagos podem apresentar alterações, tais como: aumento de tamanho, de aderência, da velocidade de deslocamento e da atividade fagocítica (CUNNINGHAM-RUNDLES et al., 2005).

Os acontecimentos que decorrem da sepse e do choque séptico são causados por endotoxinas ou lipopolissacarídeos (LPS) produzidos por bacilos gram-negativos. Essas substâncias se localizam na parte externa da membrana bacteriana e são liberadas a partir de sua replicação ou morte (DE CASTRO et al., 1997).

A administração do LPS mimetiza a reação generalizada de defesa do organismo frente às infecções, como febre, anorexia e indução das proteínas de fase aguda no fígado (DINARELLO, 1996; PLATA-SALAMÁN, 1996). Também induz a migração de leucócitos sanguíneos para o sitio inflamatório. Assim, a aplicação do LPS funciona como um modelo adequado para o estudo das alterações fisiológicas durante infecções bacterianas, já que reproduz muitos dos sintomas observados em pacientes com septicemia por bactérias gram-negativas (KREIMER et al., 2005).

A grande similaridade e homologia entre os genomas de roedores e seres humanos tornam estes modelos animais uma grande ferramenta para estudar as condições que afetam os seres humanos, que podem ser simuladas em ratos. Além do fato de que os animais nos permitem obter respostas em um curto tempo e um maior controle das condições ambientais (VON DIEMEN; TRINDADE; TRINDADE, 2006).

Dietas hipercalóricas têm sido utilizadas com sucesso para a reprodução de modelos experimentais de obesidade (DUARTE, 2006). Em animais, os estudos apontam que a alimentação hiperlipídica é um componente importante na etiologia da obesidade, já que dietas hiperlipídicas comprovadamente levaram ao excesso de gordura corporal (WILLET, 1998; KATAN, 1999).

O desenvolvimento deste estudo sobre a influência da obesidade e endotoxemia acerca da resposta imunológica, advém da expectativa de esclarecer aspectos ainda não inteiramente evidenciados, como também levantar novos questionamentos sobre a inter-relação de tais temas. Neste contexto, o objetivo deste estudo, foi o de verificar as modificações imunológicas que possam ter relação com a obesidade e/ou endotoxemia e assim, analisar possível comprometimento no sistema imunológico. Pelo fato do pulmão ser o primeiro órgão afetado durante a endotoxemia, torna-se relevante a realização de trabalhos a fim de investigar as funções dos macrófagos alveolares nesta condição.

---

## Hipótese

---

A obesidade induzida pela utilização de uma dieta hiperlipídica associada à endotoxemia causa na vida adulta do animal alteração da função imunológica, demonstrado por distúrbios na função dos macrófagos alveolares.

---

## Objetivos

---

### *Geral:*

Investigar as consequências da obesidade induzida pela dieta hiperlipídica sobre parâmetros da resposta imunológica após endotoxemia em ratos adultos.

### *Específicos:*

- Observar a repercussão da dieta hiperlipídica sobre a evolução ponderal, consumo alimentar e gordura visceral dos animais;
- Avaliar a atividade oxidante e o índice de aderência de macrófagos alveolares;
- Analisar a viabilidade celular em cultura de macrófagos alveolares;
- Averiguar alterações na contagem celular do lavado broncoalveolar.

# REVISÃO DA LITERATURA

---

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

---

### Obesidade

---

Evidências sugerem que a prevalência do sobrepeso e da obesidade tem aumentado em taxas alarmantes. Pesquisas indicam que há aproximadamente 1,6 bilhões de pessoas com sobrepeso em todo o mundo e, aproximadamente, 400 milhões dessas pessoas são consideradas obesas. Apesar da elevada prevalência, estima-se para o ano de 2015 que no mundo haverá cerca de 700 milhões de obesos (WHO, 2005).

No Brasil, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), levantados no período de 2008-2009, o sobrepeso atinge 48% das mulheres e 50,1% dos homens acima de 20 anos, destes são considerados obesos 12,4% dos homens e 16,9% das mulheres. Vigitel (2008), encontrou uma prevalência de 13% de obesidade na população brasileira.

Mondini e Monteiro (1998) e Fisberg (2004), descreveram que a obesidade não é característica apenas dos países ricos, com dietas inadequadas, mas também é um problema presente nos países em desenvolvimento. Este evento pode ser explicado pela mudança dos hábitos de vida, como o aumento do sedentarismo e a alimentação rica em calorias. No caso do Brasil, mudanças demográficas, socioeconômicas e epidemiológicas ao longo do tempo permitiram que ocorresse a denominada transição dos padrões nutricionais, com a diminuição progressiva da desnutrição e o aumento da obesidade (MONTERIO et al., 1995; FRANCISCHI et al., 2000; FRANCISCHI et al., 2001).

A presença da desnutrição, deficiência de micronutrientes, excesso de peso e outras doenças crônicas não transmissíveis coexistindo nas mesmas comunidades e, muitas vezes no mesmo domicílio, caracteriza a transição nutricional (COUTINHO et al., 2008). Diversos estudos têm demonstrado que o Brasil, assim como outros países em desenvolvimento, convive com a transição nutricional, determinada frequentemente pela má alimentação (BATISTA; RISSIN, 2003; BERMUDEZ; TUCKER, 2003). Ao mesmo tempo em que se assiste à redução contínua dos casos de desnutrição, são observadas prevalências crescentes de excesso de peso, contribuindo com o aumento das doenças crônicas não transmissíveis. A essas são associadas às causas de morte mais comuns atualmente. Segundo a OMS, a hipertensão arterial e a obesidade correspondem aos dois principais fatores de risco responsáveis pela maioria das mortes e doenças no mundo.

---

### **Etiologia da obesidade**

---

Em 1998 a OMS definiu obesidade como sendo uma “doença na qual o excesso de gordura corporal acumulou-se a tal ponto que a saúde pode ser afetada” (WHO, 2000). Esta se caracteriza como uma das doenças não transmissíveis que mais cresce em todo o mundo, pois, nas últimas décadas, tem se apresentado nas diversas faixas etárias, sendo apontada como uma verdadeira epidemia mundial (WANG; DIETZ, 2002; OLIVEIRA; FISBERG, 2003). A obesidade pode ser decorrente de fatores endógenos, provocada por causas genéticas, lesões do sistema nervoso central e endocrinopatias ou exógenas, resultantes da ingestão calórica excessiva (SOUZA et al., 2007).

A obesidade não é uma doença singular, e sim um grupo heterogêneo de condições com múltiplas causas que convergem para o fenótipo obeso (JEBB, 1999). Há consenso de que a população torna-se obesa como resultado de uma combinação de genes herdados que conferem suscetibilidade, associada ao meio ambiente favoravelmente obesogênico (SOWERS, 1998). No entanto, existem poucas evidências sugerindo que algumas populações são mais suscetíveis à obesidade por motivos genéticos, o que ressalta o fato de que a diferença na sua prevalência em diferentes grupos populacionais está muito mais atribuída aos chamados fatores ambientais (JEBB, 1999), em especial à dieta (ROLLS; SHIDE, 1992) e à atividade física (SCHULZ; SCHOELLER, 1994; HAAPANEM, 1997; POPKIN; DOAK, 1998; GRUNDY, 1998).

Sabe-se que a obesidade é resultante da ação de fatores ambientais sobre indivíduos geneticamente predispostos a apresentar excesso de tecido adiposo (POPKIN, 1998), contudo, a alimentação desequilibrada e o sedentarismo são os fatores mais frequentemente apontados como determinantes do súbito aumento dos casos de obesidade entre as populações, pois seria impossível que a genética sozinha explique o aumento maciço da obesidade, como tem ocorrido mundialmente nos últimos 20 anos (BOUCHARD, 1993).

O balanço energético positivo que ocorre, quando o valor calórico ingerido é superior ao gasto, é importante colaborador do desenvolvimento da obesidade, promovendo aumento nos estoques de energia e peso corporal (FRIEL, 2007). Assim, um estilo de vida, com baixos níveis de atividade física e elevado consumo de alimentos densos em energia, tem papel dominante para explicar o acúmulo do excesso de gordura corporal em grandes proporções na população mundial (PEREIRA, 2003).

Além disso, os processos de modernização e transição econômica, observados na maioria dos países, têm promovido alterações na industrialização da produção alimentícia que colabora para o consumo de dietas ricas em proteína e gordura (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 2008). Há indícios que o padrão de alimentação hiperlipídica, hiperproteica e hipoglicídica esteja se repetindo também no Brasil. Um estudo realizado com mulheres obesas brasileiras mostraram que mais de 30% do total calórico ingerido por esta população era proveniente de lipídeos (FRANCISCHI, 1999), o que demonstra ingestão semelhante à encontrada nos países desenvolvidos, caracterizando esta dieta como ocidentalizada.

---

### **Modelos experimentais de obesidade**

---

O estudo da obesidade em humanos, provavelmente, seria o modelo ideal para responder muitas questões. No entanto, pesquisas com humanos possuem limitações éticas, financeiras, além de estudo em animais permitir grande quantidade de análises e resultados. A possibilidade dos animais de laboratório poderem ser mantidos em condições controladas e também destes se tornarem obesos espontaneamente, se alimentando de ração comercial, ou através de outras manipulações, abriu novas áreas para pesquisa na área da obesidade. Assim, mesmo que estes modelos animais não possam ser considerados exatamente os modelos de obesidade em humanos, eles ainda são de grande valor no estudo das condições bioquímicas, fisiológicas e patológicas necessárias para o acúmulo excessivo de adiposidade (VON DIEMEN; TRINDADE; TRINDADE, 2006).

Estudos sobre as causas e tratamentos da obesidade têm sido desenvolvidos em animais que apresentam esta característica através de lesão neural, alterações endócrinas,

anormalidades genéticas e alterações alimentares (SCLAFANI; SPRINGER, 1976). Dessa forma, a obesidade pode ser induzida em animais por alterações neuroendócrinas, dietéticas ou genéticas. Os modelos mais utilizados para indução de obesidade em ratos são a lesão do núcleo hipotalâmico ventromedial através da administração de glutamato monossódico ou lesão elétrica direta, alimentação com dietas hipercalóricas e manipulação genética para a obesidade (VON DIEMEN; TRINDADE; TRINDADE, 2006).

### *Modelos genéticos de obesidade*

A obesidade pode ser herdada através de defeito de um único gene ou de múltiplos genes. No primeiro caso, a obesidade é resultado da alteração ou perda de um único peptídeo que, teoricamente, deveria ser detectado e corrigido (FESTING, 1979). Porém, casos de obesidade humana caracterizados por esta herança monogênica são raros. A determinação poligênica da obesidade é decorrente de alterações que influenciam diversos fatores, como taxa metabólica, apetite, taxa de crescimento, que, por fim, desencadeiam o quadro de obesidade. Alguns roedores (como ratos Sprague-Dawley), que são particularmente propensos a desenvolver obesidade através da dieta rica em gordura ou dieta de cafeteria, estão classificados neste grupo de obesidade poligênica (ROBINSON; DINULESCU; CONE, 2000).

Estas predisposições genéticas para o desenvolvimento da obesidade através de dietas com alta densidade energética são um modelo mais realista e apropriado para o estudo da obesidade humana do que a alteração de um único gene (FESTING, 1979; YORK, 1992). No entanto, algumas alterações encontradas na obesidade em humanos não ocorrem nestes modelos genéticos de obesidade animal. Além disto, algumas diferenças hormonais também distanciam os modelos genéticos de obesidade animal da obesidade humana.

Assim, fica evidente que o estudo da obesidade em animais com alterações genéticas possuem limitações, desse modo, alguns modelos podem ser utilizados apenas na avaliação de alterações específicas decorrentes da obesidade, podendo ser considerados inapropriados para outras investigações.

### *Modelos não-genéticos de obesidade*

Devido ao fato do rápido aumento mundial nos casos de obesidade estar relacionado ao sedentarismo (BLAIR et al., 1996; SEIDELL, 1999) e a uma maior disponibilidade de alimentos (SEIDELL, 1999), muitos estudos têm sido realizados com modelos “não-genéticos de obesidade”. Entre estes, podemos citar a indução de obesidade através da indução química e cirúrgica e de alterações na alimentação (MILLER, 1979).

Lesões hipotalâmicas podem produzir a denominada obesidade hipotalâmica, através de alterações metabólicas como hiperinsulinemia, hiperfagia e prejuízo da termogênese (INQUE, 1992). As lesões podem ser desenvolvidas quimicamente (glutamato monossódico) ou cirurgicamente. Porém, requerem muita habilidade a fim de provocarem as lesões necessárias sem provocar a morte do animal, visto que, a dose de produto necessária para promover obesidade é muito próxima da dose tóxica ao animal. Além disto, quando as lesões são feitas cirurgicamente, é muito difícil identificar se o núcleo ventro medial foi lesado total ou parcialmente (MORRISON, 1977).

Alguns autores afirmam que a obesidade humana é raramente associada a lesões hipotalâmicas, mas está estritamente relacionada à disponibilidade de alimentos palatáveis e sedentarismo e, sendo assim, a obesidade dietética em animais seria um modelo mais apropriado para o estudo da obesidade em humanos (SCLAFANI; SPRINGER, 1976).

O desenvolvimento da obesidade em ratos através de manipulação dietética é um fenômeno que tem recebido muita atenção. Estudos demonstram que, quando estes animais são alimentados desde o nascimento com grande quantidade de gordura, existe uma maior predisposição a se tornarem obesos posteriormente, assim como já demonstrado em humanos que possuem uma alimentação semelhante a esta na infância (MILLER, 1979). Assim, muitos estudos têm tentado promover obesidade em animais de laboratório apenas com alteração na ingestão alimentar, o que provocaria aumento desta ingestão, aumento de peso e obesidade. No entanto, em roedores é muito difícil aumentar a quantidade calórica ingerida voluntariamente, mesmo quando a dieta é flavorizada (SCLAFANI, 1992).

De acordo com Von Diemen et al. (2006), a administração de dieta hipercalórica é o modelo mais simples para indução da obesidade e possivelmente um dos que mais se assemelha à realidade da obesidade em seres humanos. Há vários tipos de dietas para induzir obesidade que se revelam eficazes. Algumas dietas são realizadas acrescentando hidratos de carbono e outras, aumentando a porcentagem de gorduras, a maioria delas varia de 3,7 kcal/g e 5,4 kcal/g. Todas são altamente palatáveis e induzem eficientemente à obesidade.

Assim, o desenvolvimento da obesidade em animais é possível mesmo sem aumento da quantidade de alimento ingerido. Modificações na composição de nutrientes, como também na forma da dieta podem alterar a eficiência na utilização do alimento e, conseqüentemente, aumentar os estoques de gordura. Dietas com alto teor de carboidratos e/ou alto teor de lipídios, além da dieta de cafeteria, têm sido utilizadas para desenvolver obesidade em ratos (PEREIRA et al., 2003).

A alimentação rica em gordura é comprovadamente um dos fatores indutores da obesidade, tanto em animais experimentais como em humanos (JEN et al., 2003; FEOLI et al.,

2003), ainda que não seja acompanhada por ingestão hipercalórica. Isso ocorre porque o tipo de gordura influencia funções metabólicas e leva a mudanças no peso e/ou composição corporal (GAÍVA et al., 2003). Além de induzir a obesidade, a ingestão excessiva de gorduras também favorece o aparecimento de todas as co-morbidades relacionadas a ela, como a hipertensão arterial, o diabetes *Mellitus*, as hiperlipidemias e as doenças cardiovasculares (FEOLI et al., 2003).

Em animais, os estudos apontam que a alimentação hiperlipídica é um componente importante na etiologia da obesidade, já que essas dietas comprovadamente levaram ao excesso de gordura corporal em macacos, cães, suínos, esquilos, camundongos e ratos (WILLET, 1998; WEST; YORK 1998; KATAN, 1999), sendo que as causas dessa resposta não estão claras: acredita-se que a dieta hiperlipídica conduza à hiperfagia ou cause efeitos metabólicos independentes desta (WEST; YORK 1998).

O motivo pelo qual os lipídios da dieta podem conduzir a hiperfagia deriva principalmente das suas propriedades organolépticas (PRENTICE, 1998), tais como alta palatabilidade e textura característica (ROLLS; SHIDE 1992). Inclusive em ratos, uma dieta hiperlipídica é preferencialmente consumida quando os animais podem escolher entre três rações, sendo cada uma fonte de um dos macronutrientes (MILLER, 1994). Fisiologicamente, dentre todos os outros macronutrientes, os lipídios são os que apresentam a maior densidade energética e a maior capacidade de estoque no organismo, além de possuir a menor capacidade de suprimir a fome (WHO, 2000). Alguns estudos demonstram que os carboidratos induzem muito mais à saciedade do que os lipídios (ROLLS et al., 1994; ROLLS, 1995) enquanto outros encontram efeitos semelhantes dos três macronutrientes (lipídios, carboidratos e proteínas) sobre o apetite (GRAAF, 1992).

---

## **Tecido adiposo**

---

Durante muitos anos, o tecido adiposo foi considerado um tecido simples que servia apenas para armazenamento de energia, como isolante térmico e para estruturar e sustentar órgãos do organismo. Contudo, após a descoberta em 1994 da leptina, um hormônio produzido pelos adipócitos, este tecido passou a ser considerado também um órgão endócrino (FRIEDMAN, 1997). Atualmente sabe-se que o tecido adiposo é capaz de secretar muitas substâncias e responde a uma diversidade de estímulos, caracterizando-o como um tecido de intensa atividade endócrina e metabólica (MOHAMED-ALI, 1998).

O tecido adiposo secreta vários fatores, como Interleucina-6 (IL-6), Interleucina-8 (IL-8), Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ) e leptina, que reconhecidamente contribuem para a inflamação vascular e sistêmica e que estão aumentadas na obesidade (FHÜHBECK et al., 2001; LYON et al., 2003).

Assim, pesquisas apontam a presença de um leve estado inflamatório em indivíduos obesos (CUNHA, 2010) demonstrado pelo fato dos adipócitos presentes no tecido adiposo branco produzirem citocinas inflamatórias, espécies reativas de oxigênio e leptina estando a obesidade diretamente associada com o aumento de vários desses peptídeos pró-inflamatórios (ANEJA et al., 2004; LOPES, 2007; MORRIS, 2008; MATHIEU et al., 2009). Havel (2004), também relaciona em seu estudo o processo fisiopatológico da obesidade com alterações na secreção das adipocitocinas.

As adipocitocinas atuam de modo isolado ou associadas promovendo diversos processos fisiológicos, entre eles: homeostase energética, apetite, sensibilidade à insulina, angiogênese, integridade vascular, regulação da pressão arterial e coagulação sanguínea.

Alterações na secreção de adipocitocinas, conseqüentes à hipertrofia e /ou hiperplasia dos adipócitos poderiam ser consideradas conseqüências iniciais da obesidade e suas comorbidades (HAVEL, 2004; RIBEIRO FILHO et al., 2006; GUIMARÃES et al., 2007; GNACINSKA et al., 2009).

### *Leptina*

A leptina é o fator produzido pelo adipócito mais bem estudado. Seus níveis plasmáticos se correlacionam com o total de massa de gordura corporal e são alterados por condições como jejum e superalimentação (CONSIDINE et al., 1996).

Seu receptor está expresso não somente no hipotálamo, onde regula a homeostase energética e funções neuroendócrinas (WAUTERS; CONSIDINE; VAN GAAL, 2000), mais também em todos os tipos de células da imunidade inata e adaptativa (MATARESE; MOSCHOS; MANTZOROS, 2005). Sendo assim, a leptina está envolvida em algumas funções como, o controle do apetite, controle da massa corporal, reprodução, angiogênese, imunidade e cicatrização (GUIMARÃES et al., 2007; DEMIREL et al., 2007; DICK, 2009).

A leptina influencia inúmeras respostas relacionadas à imunidade, ao ser capaz de estimular o desenvolvimento de células mielóides (MIKHAIL et al., 1997), ativar monócitos (SANTOS-ALVAREZ et al., 1999) e macrófagos (LOFFREDA et al., 1998; SANCHEZ-MARGALET et al., 2003), também possui efeito imunomodulador sobre células dendríticas (MATTIOLI et al., 2005) e células NK (ZHAO et al., 2003.) e influencia a produção de citocinas pelos linfócitos T (LORD et al., 1998; MARTIN-ROMERO et al., 2000).

Segundo Alves (2006), a hiperleptinemia causada pela obesidade associa-se a uma resistência à leptina, levando a prejuízos na resposta imune, caracterizando uma incidência

aumentada a infecções. Nesse contexto, a dessensibilização do receptor da leptina é percebida pelas células T como um estado de carência desta induzindo a uma disfunção do sistema imune semelhante à encontrada nos casos de desnutrição (FAIN et al., 2004).

Estudos em ratos com deficiência e com defeitos no receptor da leptina sugerem um papel para a leptina na regulação da função imune. Estes animais exibem redução da função fagocítica de macrófagos (TANAKA et al., 1998) e de respostas de linfócito T (MORIGUCHI et al., 1998) e atrofia dos órgãos linfóides (CHANDRA; KUTTY, 1980; HICK et al., 2006). A leptina atua também como um importante regulador inflamatório, pois o aumento na sua concentração estimula a expressão de IL-6 e TNF- $\alpha$ , consideradas citocinas inflamatórias presentes na obesidade (BELTOWSKI, 2006; GNACINSKA et al., 2009).

Atualmente, há duas hipóteses que visam explicar a relação da leptina com a obesidade: a perda do seu papel regulador, onde a leptina deixa de exercer influência sobre o controle do apetite via hipotálamo, mesmo quando há elevada concentração desta adipocitocina e a resistência à leptina, onde altas concentrações de leptina induzem a resistência pelo bloqueio do seu receptor (GUIMARÃES et al., 2007; DEMIREL et al., 2007; DICK, 2009). A presença de níveis circulantes elevados de leptina em pacientes obesos sugere a existência de resistência a leptina no quadro da obesidade (MAFFEI et al., 1995).

### *Adiponectina*

A adiponectina é uma proteína secretada pelos adipócitos cuja expressão diminui à medida que o tecido adiposo aumenta (OUCHI et al., 1999). Ou seja, a adiponectina apresenta correlação inversa com a obesidade visceral e com as dilipidemias e sua produção depende do estado nutricional (CHANDRAM et al., 2003; BERG; SCHERER, 2005; DREVON, 2005).

Recentemente a adiponectina tem sido proposta como uma adipocitocina com múltiplas ações autócrinas e parácrinas. Dentre essas se destacam a regulação do metabolismo da glicose e dos lipídeos, da função endotelial e os processos inflamatórios (SHANKAR; XIAO, 2010).

Ao contrário de outras adipocitocinas, a adiponectina possui funções imunológicas anti-inflamatórias, pois age como proteção para fatores cardiovasculares e aumenta a sensibilidade à insulina (FANTUZZI, 2005). Dessa forma, esta participa na resposta imune atuando como protetor da inflamação (RUDIN; BARZILAI, 2005), diminuindo ou inibindo a adesão de monócitos ao endotélio vascular e suprimindo a expressão de TNF- $\alpha$  induzida por essas moléculas de adesão (GOLDSTEIN; SCALIA, 2004; FANTUZZI, 2005).

Algumas citocinas, como IL-6 e TNF- $\alpha$  são poderosos inibidores da secreção e expressão de adiponectina (ALVEZ, 2006). A adiponectina, por sua vez, regula a expressão de várias citocinas pró e anti-inflamatórias, produzindo a IL-10 e IL-1, além de suprimir a síntese de TNF- $\alpha$  (TILG; MOSCHEN, 2006) e interferir na função de macrófagos (OUCHI et al., 1999). Assim, pode-se destacar que os níveis de adiponectina são inversamente correlacionados com os níveis de alguns mediadores inflamatórios, como IL-6, TNF- $\alpha$  e proteína-C-reativa (ALVEZ, 2006).

### *Interleucinas*

A IL-6 e o TNF- $\alpha$  são adipocitocinas com função imunológica. São produzidas pelos adipócitos em resposta a estímulos infecciosos ou inflamatórios contribuindo significativamente para a inflamação sistêmica (BERG; SCHERER, 2005).

A liberação de IL-6, além de ativar células do sistema imune e induzir a síntese hepática de proteínas da fase aguda, aumenta a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal, o qual participa como mediador de respostas metabólicas e imunes (YUDKIN et al., 2000). Estima-se que um terço dos níveis circulantes de IL-6 seja originado do tecido adiposo (FHÜHBECK et al., 2001). Diante da contribuição do tecido adiposo como fonte de IL-6 e do fato desta representar o maior regulador da resposta de fase aguda, considera-se que a obesidade se assemelha a um estado inflamatório de baixo grau (YUDKIN et al., 2000).

O TNF- $\alpha$  é também um fator implicado na ativação da resposta imune atuando como uma citocina pró-inflamatória (JANEWAY et al., 2005; FANTUZZI, 2005). É considerado importante mediador da resistência insulínica na obesidade, estando, desta forma, envolvido na patogênese do diabetes *Mellitus* e da hiperlipidemia (HOTAMISLIGIL; SHARGILL; SPIEGELMAN, 1993).

---

## **Sistema imune**

---

O sistema imune é uma organização de células e moléculas com funções especializadas na defesa contra infecções. A resposta coletiva e coordenada à introdução de substâncias estranhas é chamada de resposta imunológica, esta é composta por dois braços interligados: a imunidade inata ou natural e adquirida ou adaptativa (DELVES; ROITT, 2000). Esta resposta é um processo complexo de defesa efetivo no controle da expansão da infecção e da erradicação do organismo invasor (PEAKMAN; VERGANI, 2011; CHANDRA, 1997).

A imunidade inata está naturalmente presente e não é influenciada por contato prévio com os agentes infecciosos. Consiste em mecanismos de defesa celulares e bioquímicos que já existiam antes do estabelecimento de uma infecção e que estão programados para responder rapidamente a infecções antes do desenvolvimento das respostas imunes adaptativas. Esses mecanismos respondem essencialmente da mesma maneira a sucessivas infecções. Os principais componentes do sistema imune inato são: barreiras físico-químicas (pele e membranas mucosas); moléculas circulantes (complemento); células fagocíticas (macrófagos e neutrófilos); célula Natural Killer (NK) e citosinas (Cs) derivadas de macrófagos (fator de necrose tumoral - TNF, interferon-alfa, interferon-beta). A imunidade natural estimula as respostas imunes adaptativas e pode influenciar a natureza das respostas adaptativas para torná-las otimamente eficazes contra diferentes tipos de microrganismos (ABBAS; LICHTMAN, 2008).

Em conjunto com a imunidade inata, existem outras respostas imunológicas que são estimuladas pela exposição a agentes infecciosos cuja magnitude e capacidade defensiva aumentam com exposições posteriores a um microrganismo em particular. Como essa forma de imunidade se desenvolve em resposta a infecções e se adapta à infecção, é chamada de imunidade adaptativa ou adquirida (PEAKMAN; VERGANI, 2011). A imunidade adaptativa acrescenta aos elementos da imunidade natural, os linfócitos B, responsáveis pela produção de anticorpos, relacionados à imunidade humoral e os linfócitos T, que medeiam à imunidade celular.

---

## Macrófagos

---

O sistema de fagócitos mononucleares (SFM) tem sido definido como uma linhagem de células hematopoiéticas derivadas de um progenitor comum na medula óssea. As células progenitoras mielóides diferenciam-se em monócitos que circulam no sangue periférico e que ao entrar nos tecidos transformam-se em macrófagos (HUME et al., 2006).

Os macrófagos são células que participam de diferentes processos no organismo, como por exemplo, remodelagem tecidual durante a embriogênese, reparação de ferimentos, remoção de células velhas e danificadas, hematopoiese e homeostase. Essas células têm um papel central no sistema imunológico defendendo o hospedeiro contra microrganismos (KLIMP et al., 2002).

Os macrófagos constituem a segunda maior população celular do sistema imune, tendo como função primária a fagocitose e podendo assumir formas morfológicas diferentes conforme sua localização. No pulmão, são encontrados os macrófagos alveolares, que possuem papel central na manutenção da estrutura normal deste órgão, e são de grande importância para a defesa contra microrganismos que comumente infectam o homem através das vias respiratórias (KAZIMIERZ et al., 2004).

A aderência dos macrófagos à superfície bacteriana é a primeira etapa da ativação dessas células e início da resposta imunológica (SEGURA; JIMÉNEZ-RUBIO, 1998). Na seqüência, as células fagocitárias destroem as bactérias utilizando sistema microbicidas dependente de oxigênio (BABIOR, 1997).

Os macrófagos também atuam como células acessórias para os linfócitos e em resposta à infecção liberam um grupo estruturalmente diferenciado de moléculas que incluem as interleucinas: IL-1, IL-6, IL-8, IL-12, IL-18 e o TNF- $\alpha$ . Essas moléculas apresentam importantes efeitos locais e sistêmicos que contribuem para a defesa do organismo (COHN, 1978; HOLGATE; CHURCH, 1996; ZAREIE et al., 2001; ALDINUCCI et al., 2003).

Os macrófagos alveolares tornam-se ativados, ou seja, aumentam sua atividade antimicrobiana, quando estimulados por determinados agentes. Essas células ativadas apresentam uma série de diferenças morfológicas, funcionais e metabólicas quando comparadas às células não ativadas. Funcionalmente, ocorre a "explosão respiratória", resultando em aumento no consumo de oxigênio e geração de metabólitos intermediários dessa molécula (WONG et al., 1990; COTRAN et al., 2010).

Uma vez ativados, os macrófagos convertem o oxigênio molecular em intermediários reativos de oxigênio (ROIs), como o ânion superóxido. A adição de um elétron ao oxigênio ( $O_2$ ) gera o ânion superóxido, o qual é rapidamente convertido a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) pela superóxido dismutase (SOD). Este peróxido formado é por si só capaz de se difundir e causar danos celulares, devendo ser neutralizado rapidamente, impedindo a produção de radicais hidroxilas, ainda mais potentes (ABBAS; LICHTMAN, 2008). Este agente oxidante atua na gênese de diversas doenças, devido à sua capacidade de oxidar lipoproteínas (DE CASTRO et al., 1995) ou alterar a transcrição gênica (BAUERLE et al., 1996), mas também, ataca microrganismos e/ou células infectadas, proporcionando a defesa do hospedeiro contra patógenos (BAUERLE et al., 1996.; PITHON-CURI et al., 2002).

Além dos ROIs, são produzidos ainda intermediários reativos de nitrogênio, principalmente óxido nítrico (ON), pela ação da enzima óxido nítrico sintase induzida

(iNOS). Esta enzima pode ser ativada por uma variedade de estímulos, tais como o contato direto com certos microrganismos, e tem sua expressão modulada por citocinas (BARBUTO, 2001).

Como já foi dito, os macrófagos exercem papel de destaque na homeostase, não apenas na resposta contra patógenos, mas também na remoção de debris celulares e no remodelamento e reparo tecidual. Essas células apresentam distribuição ubíqua nos tecidos e grande especializações de suas funções dependendo da localização anatômica (MOSSER; EDWARDS, 2008). Macrófagos têm a capacidade de expressar variados padrões de citocinas, moléculas de superfície e enzimas em resposta a diferentes estímulos e microambientes. Esse fato está relacionado à grande diversidade de fenótipos assumidos por essas células, o que reflete em diversos subtipos especializados de macrófagos, como, por exemplo, osteoclastos, células de Kupffer, macrófagos peritoniais, macrófagos alveolares, entre outros (GORDON; TAYLOR, 2005).

---

### **Endotoxemia e reação inflamatória**

---

A resposta inflamatória é geralmente causada pela ação de componentes da parede de bactérias, embora também possa ser casada por outros agentes, como fungos vírus e parasitas (PARRILLO, 1993; GLAUSER, 1994; SALOMÃO, 2002).

Os componentes da parede bacteriana são os principais desencadeadores da resposta inflamatória do hospedeiro. Entre esses se destacam, os ácidos teicóico e lipoteicóico das bactérias gram-positivas e o LPS ou endotoxina das bactérias gram-negativas (GLAUSER, 2000).

O LPS é liberado da membrana externa das bactérias durante a bipartição celular bacteriana e também na apoptose ou como resultado de tratamento com antibióticos. Após sua liberação, o LPS é reconhecido pelos macrófagos e passa a ativá-los. Como resultado, ocorre aumento na atividade fagocítica e indução da secreção de citocinas pró-inflamatórias. Embora essas citocinas possuam um papel fundamental na resposta inflamatória local, sua produção excessiva está relacionada com a resposta inflamatória sistêmica e suas repercussões (ROSENFELD; PAPO; SHAI, 2006).

As manifestações clínicas da sepse resultam da ação da endotoxina bacteriana sobre o hospedeiro, conduzindo-o a uma resposta imunológica inflamatória estereotipada com desequilíbrio da homeostase, bloqueio metabólico em vários órgãos e a resultante final é a síndrome da disfunção de múltiplos órgãos e o óbito na maioria dos casos (PARILLO, 1993, HILL; HILL, 1998, PEREIRA JR et al., 1998).

A resposta pirogênica é o efeito mais conhecido, mais apenas um dos vários efeitos produzidos por endotoxinas, elas também induzem os macrófagos do Sistema Retículo Endotelial a liberar fatores que determinam piora do quadro clínico por estarem relacionados com coagulação dentro dos capilares, liberação de prostaglandinas, óxido nítrico (indutor de vasodilatação sistêmica e hipotensão no choque endotóxico), superóxidos e enzimas lisossômicas (DINARELLO et al., 1986).

A endotoxemia aguda, caracterizada por altos níveis de endotoxina no sangue, pode causar reação inflamatória com injúria endotelial, hipotensão, falência múltipla dos órgãos e morte (UVIN, 1994; DÂMASO, 2001).

A estimulação celular com LPS, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, promove a liberação de várias substâncias, incluindo citocinas, prostaglandinas, óxido nítrico, ânion superóxido e fatores pró-coagulantes (ZIELINSKI et al., 2001; CERWINKA et al., 2002a; CERWINKA et al., 2002b).

A administração de LPS mimetiza a reação generalizada de defesa do organismo às infecções, como febre, anorexia e indução das proteínas de fase aguda no fígado (DINARELLO, 1996; PLATA-SALAMÁN, 1996). Ademais, induz a migração de leucócitos sanguíneos para o sitio inflamatório/infeccioso. Nesse particular, o pulmão é sensível aos efeitos do LPS, seguido do fígado, intestino e rim (WELBOURN; YOUNG, 1992). Assim, a aplicação do LPS funciona como um adequado modelo para o estudo das alterações fisiológicas durante infecções bacterianas, já que reproduz muitos dos sintomas clínicos observados em pacientes com septicemia por bactérias gram-negativas (LUCHI; MORRISON, 2000).

---

### **Obesidade, sistema imune e doença**

---

A obesidade apresenta-se associada a algumas morbidades como diabetes tipo II, dislipidemias, hipertensão, doença coronariana e cerebrovascular, insuficiência cardíaca, síndrome de apnéia do sono, esterilidade e alterações psicológicas (MUÑOZ; MAZURE; CULEBRAS, 2004). Além dessas complicações, os indivíduos obesos apresentam uma maior susceptibilidade a alguns tipos de câncer e infecções, tem um maior risco de bacteremia e um maior tempo de cicatrização após uma intervenção cirúrgica (LAMAS; MARTÍ;

MARTÍNEZ, 2003). Tudo isso indica que a obesidade exerce efeitos negativos sobre os componentes do sistema imune e sua funcionalidade.

Segundo Stallone (1994), a ingestão excessiva de nutrientes pode alterar a resposta imune direta ou indiretamente por afetar o estado metabólico e endócrino. Esta influencia a resposta imune inata e adaptativa, sendo observada uma tendência a deteriorização da imunidade com o avanço do grau da obesidade (SEDLITSKII et al., 1990; MARTI et al., 2001).

Trabalhos da década de 80 já descrevem, em pacientes com obesidade grave, menor taxa de maturação de monócitos em macrófagos (KRISHNAM et al., 1982) e menor capacidade bactericida de polimorfonucleares (PALMBLAD; HALLBERG; ENGSTED, 1980).

Apesar de os estudos comprovarem, à exaustão, o envolvimento de um quadro pró-inflamatório em condições como a obesidade, resistência à ação da insulina e aterosclerose, há evidências de que indivíduos obesos apresentam prejuízo na resposta imune inata, inclusive da resposta inflamatória, frente a um processo infeccioso (KARLSSON; BECK, 2010, SCHMIDT, 2011). O reconhecimento de patógenos e a conseqüente secreção de mediadores inflamatórios pelas células do sistema imune inato são fatores críticos para a elaboração de uma resposta imune efetiva e conseqüente eliminação do agente patogênico. Sendo assim, disfunções na resposta inflamatória das células da imunidade inata podem aumentar o risco e a gravidade de infecções (KARLSSON; BECK, 2010).

A obesidade está a tornar-se um motivo de preocupação em pacientes criticamente doentes. Estudos clínicos e epidemiológicos mostram que a incidência e a gravidade das

doenças infecciosas são maiores em indivíduos obesos quando comparadas a pessoas magras (FASOL et al., 1992; GOTTSCHLICH et al., 1993; MOULTON, 1994; STALLONE, 1994).

Chandra e Kutty (1980), constataram que 38% das crianças e adolescentes obesos apresentaram um comprometimento da resposta imune mediada por células, tais como: atraso na hipersensibilidade cutânea e uma redução na capacidade de leucócitos polimorfonucleares em matar bactérias intracelulares.

Estudos em seres humanos corroboram esses resultados. Indivíduos hospitalizados com índice de massa corporal (IMC) superior a 30 kg/m<sup>2</sup> têm maior risco de desenvolver infecções secundárias e complicações como sepse, pneumonia, bacteremia e infecções cutâneas. Aliado a isso, pacientes obesos apresentam maior incidência de infecções pós-cirúrgicas, aumento do tempo de internação hospitalar e maior risco de morte (CHOBAN et al., 1995; CHOBAN; FLANCBAUM, 1997; CALLE et al., 1999).

Dados na literatura também apontam diferenças na resposta imune entre indivíduos obesos e não obesos. A obesidade está relacionada com maior contagem de leucócitos (NIETO et al., 1992; NIEMAN et al., 1996; NIEMAN, 1999), neutrófilos e monócitos (NIEMAN et al., 1996; NIEMAN, 1999) e menor proliferação de linfócitos induzida por mitógeno (TANAKA et al., 1993; TANAKA et al., 2001).

Estudos em animais com obesidade induzida por dieta são considerados modelos experimentais comparáveis à obesidade em humanos, estes também exibem alterações de parâmetros imunológicos. Lamas, Martínez e Martí, (2004) observaram, em ratos com sobrepeso, redução de linfócitos, menor resposta proliferativa de esplenócitos em resposta à mitógenos e tendência à menor atividade citotóxica de células NK. Além disso, foi observada

menor produção estimulada de IL-2 (LAMAS; MARTÍNEZ; MARTÍ, 2002). Ratos com obesidade induzida por dieta também apresentam alteração na resposta de hipersensibilidade por contato (KATAGIRI et al., 2007).

Outros estudos em roedores com obesidade induzida pela dieta constaram uma redução da imunocompetência na vigência de infecções virais e bacterianas (AMAR et al., 2007; SMITH et al., 2007). Nesse contexto, camundongos obesos infectados pelo vírus *influenza* apresentam redução da citotoxicidade de células natural killer, retardo na indução da expressão gênica de citocinas pró-inflamatórias (IL-1b, IL-6 e TNF- $\alpha$ ), além de aumento de mais de seis vezes na mortalidade decorrente da infecção (SMITH et al., 2007). Soma-se a isso o fato de que a infecção por *Porphyromonas gingivalis*, resulta em redução da resposta inflamatória em camundongos submetidos à ração hiperlipídica (AMAR et al., 2007).

O conhecimento acerca do papel dos macrófagos na inflamação característica dos estados de obesidade e de resistência à ação da insulina advém de muitos estudos envolvendo macrófagos infiltrados no tecido adiposo (KANDRA et al., 2006; WEISBERG et al., 2006; FERRANTE, 2007; LUMENG; BONDIZIN; SALTIEL, 2007; CAVE et al., 2008; DAVIS et al., 2008; MURANO et al., 2008). Contudo, considerando que parte do conhecimento atual sobre a biologia dos macrófagos é proveniente do estudo de macrófagos alveolares, torna-se relevante a investigação do comportamento dessas células em indivíduos obesos ou em roedores alimentados com ração hiperlipídica (GHOSN et al., 2010). Além disso, o uso de macrófagos alveolares apresenta importantes vantagens, como fácil acesso e a possibilidade de obter quantidades expressivas de células.

# MÉTODOS

---

### 3 MÉTODOS

---

#### **Animais**

---

Foram utilizados 40 ratos machos, albinos, da linhagem *Wistar*, com 21 dias de idade, provenientes da colônia de criação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os animais foram mantidos no biotério (temperatura de  $23 \pm 20^{\circ}\text{C}$  e ciclo claro/escuro de 12 horas, com luzes acesas às 6 horas), recebendo *ad libitum* as respectivas rações e água). Os experimentos seguiram as recomendações éticas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pernambuco (CCEA/UFPE), sob protocolo n° 23076,0014698/2008-28. (Anexo A).

---

#### **Grupos experimentais**

---

*Segundo a manipulação nutricional:*

Após o desmame os animais foram divididos em dois grupos conforme o regime dietético empregado:

- Grupo Dieta padrão (DP): constituído por 20 animais que receberam ração comercial utilizada como padrão do biotério: Labina ® - Purina do Brasil S/A.

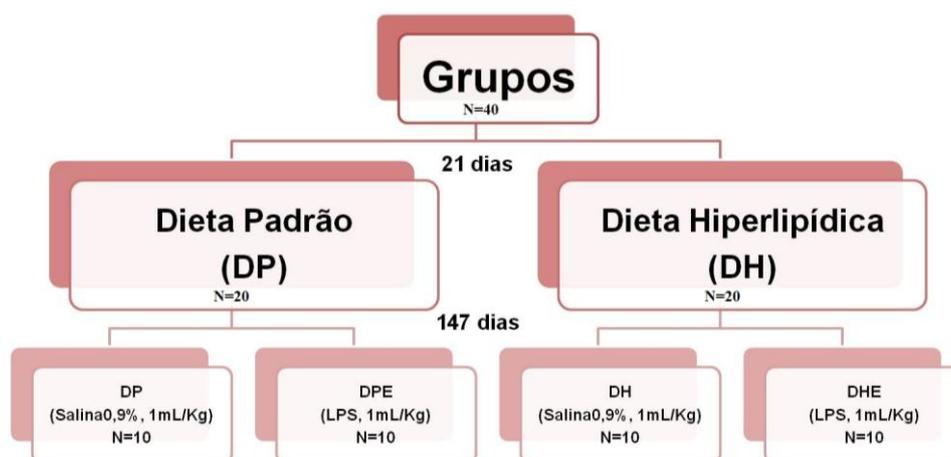
- Grupo Dieta Hiperlipídica (DH): constituído por 20 animais que receberam dieta hiperlipídica após desmame.

*Segundo a administração de lipopolissacarídeo (LPS):*

Aos 147 dias de idade, após terem recebido as respectivas dietas por 18 semanas, os animais de cada grupo foram subdivididos em endotoxêmicos e não endotoxêmicos (Figura 1).

Para obtenção dos grupos endotoxêmicos, os animais receberam injeção intraperitoneal (*i.p.*) de LPS (sorotipo *Escherichia coli*; 055: B5, Sigma) na dose de 1mg/Kg de peso corporal. Os demais grupos receberam, pela mesma via, NaCl a 0,9% em igual proporção. Vinte e quatro horas após a administração do LPS ou da salina, foi coletado o lavado broncoalveolar (LBA) de cada animal para estudo.

Ao final dos procedimentos supracitados, obtivemos os seguintes grupos experimentais:



**Figura 1- Organograma de divisão dos grupos**

---

## Dietas

---

### *Composição e análise centesimal das dietas*

A dieta padrão consistiu de ração comercial para ratos (Labina<sup>®</sup> - Purina do Brasil S/A). Esta ração apresenta os elementos necessários aos requerimentos nutricionais do rato não sendo necessária qualquer suplementação. (tabela 1).

A dieta hiperlipídica consistiu de uma mistura normoprotéica e hiperlipídica previamente padronizada (ESTADELLA et al., 2004), foi constituída de uma mistura de alimentos hipercalóricos contendo ração comercial (Labina<sup>®</sup> - Purina do Brasil S/A), amendoim torrado, chocolate ao leite e biscoito maisena, na proporção 3:2:2:1. Esses ingredientes foram moídos, misturados e oferecidos na forma de péletes (Figura 2). A composição centesimal da dieta está apresentada em valores aproximados na tabela 2.



**Figura 2- Confecção da dieta hiperlipídica**

Fonte: Melo (2010).

**TABELA 1. Composição da dieta Labina\*.**

<b>ENRIQUECIMENTO (Kg de ração)</b>		<b>COMPOSIÇÃO CENTESIMAL** (g%)</b>	
Vitamina A	20000UI	Proteínas	23,0
Vitamina D <sub>3</sub>	6000 UI	Carboidratos	63,0
Vitamina E	30 UI	Lipídeos	4,0
Vitamina K	6 mg	Cinzas	-
Vitamina B <sub>12</sub>	10 µg	Fibras	5,0
Vitamina B <sub>2</sub>	8 mg	Kcal%	275,0
Pantotenato de Cálcio	24 mg		
Niacina	95 mg		
Tiamina	4 mg		
Colina	2000 mg		
Piridoxina	6 mg		
Biotina	0.1 mg		
Ácido Fólico	0.5 mg		
Manganês	50 mg		
Iodo	2 mg		
Ferro	65 mg		
Zinco	35 mg		
Cobre	26 mg		
Antioxidante	100 mg		

\* COMPOSIÇÃO BÁSICA (*Segundo a AgribRANDS do Brasil Ltda*): Milho, Farelo de Trigo, Farelo de Soja, Farinha de Carne, Farelo de Arroz Cru, Carboneto de Cálcio, Fosfato Bicálcico, Sal, Pré-mix.

\*\* Fonte: Melo (2010).

**TABELA 2. Composição da dieta Hiperlipídica utilizada na alimentação dos animais.**

<b>INGREDIENTES (Kg de ração)</b>		<b>Composição centesimal (g%)*</b>	
Labina (Purina do Brasil S/A)	375g	Proteínas	17,93
Amendoim torrado	250g	Carboidratos	47,18
Chocolate ao leite	250g	Lipídeos	24,50
Biscoito maisena	125g	Cinzas	3,62
		Umidade e substâncias voláteis	6,77
		Kcal%	480,94

\* Fonte: Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos (LEAAL), DN/UFPE (Anexo B).

---

### **Avaliação do peso corporal**

---

O peso corporal de todos os animais foi aferido diariamente do primeiro dia de vida até o final do período de aleitamento (21 dias), a fim de identificar possíveis anormalidades de peso corporal antes da imposição das dietas. A partir do desmame até o final da administração da dieta o peso corporal dos animais foi aferido em dias alternados até o 147º dia de vida. A pesagem foi realizada em balança eletrônica digital (Marte, modelo S-4000) com capacidade para 4Kg e sensibilidade de 0,1g.

---

### **Consumo alimentar e calórico**

---

Com a finalidade de identificar o consumo alimentar dos grupos, os animais foram acondicionados em gaiolas metabólicas próprias para este fim e pesados diariamente. A dieta disponibilizada, o rejeito limpo e o rejeito sujo também eram pesados diariamente. Para cálculo do consumo alimentar foi aplicada a seguinte fórmula:

$$\text{Consumo} = \text{dieta oferecida} - \text{dieta rejeitada (rejeito limpo + rejeito sujo)}.$$

O consumo calórico foi identificado com base no do consumo alimentar diário e na quantidade de calorias de cada dieta.

## Contagem total e diferencial de leucócitos no sangue

Na extremidade da cauda de cada animal anestesiado foi realizado um corte usando um bisturi e 0,2 mL de sangue foram coletados em tubo de ensaio contendo EDTA a 3%.

### *Contagem total de leucócitos*

A contagem total dos leucócitos foi realizada a partir de amostras diluídas a 1:20 em ácido acético glacial a 3% e azul de metileno (solução de Turk). Os leucócitos foram contados em câmara de Neubauer ao microscópio de luz (Olympus optical BX41TF, Japão Co Ltda.), sendo realizada a contagem de todos os leucócitos encontrados nos quatro campos marcados em L (Figura 3), O resultado final foi obtido após a aplicação da seguinte fórmula:

$$\text{Leucócitos/mm}^3 \text{ de sangue periférico} = n \times 20 \times 10/4$$

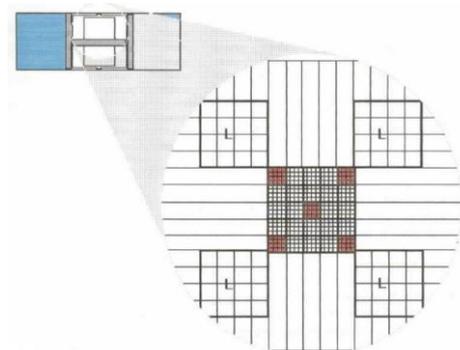
Onde:

n: número de leucócitos contados

4: fator de conversão para  $1\text{mm}^2$

20: fator de conversão da diluição utilizada

10: fator de conversão para  $1\text{mm}^3$



**Figura 3- Contagem de leucócitos**

### *Contagem diferencial de leucócitos*

A contagem diferencial de leucócitos foi realizada utilizando-se a técnica do esfregaço sangüíneo. Dessa forma, uma pequena amostra não diluída foi utilizada para esfregaço sangüíneo em lâminas citológicas. As preparações foram fixadas, coradas (Kit Panótico Rápido LB – Laborclin Ltda., Brasil), e examinadas ao microscópio de luz (Olympus optical BX41TF, Japão Co Ltda.) com lente de imersão. Os diferentes tipos de glóbulos brancos foram quantificados em um contador eletrônico de células sangüíneas (Kacil, mod. CC502).

---

### **Análise das células do LBA**

---

#### *Obtenção do LBA*

O LBA foi obtido de acordo com a técnica desenvolvida por De Castro et al., (1995). Os animais, aos 147 dias, foram anestesiados com uma solução de cloralose e uretana, em concentrações respectivas de 0,5 e 12,5% (Sigma-Aldrich, SP Brasil), via injeção intraperitoneal, na proporção de 1mL/100g de peso corporal, em seguida, foi efetuado o procedimento cirúrgico de traqueostomia, para coleta do LBA.

Inicialmente, foi realizada 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 obter acesso à traquéia. Com uma pequena pinça, isolou-se a traquéia e, com uma tesoura, realizado um pequeno orifício entre dois anéis traqueais na porção ventral da mesma.

Foi inserida uma cânula plástica acoplada a uma seringa contendo 3mL de NaCl a 0,9% à temperatura ambiente. Várias alíquotas de solução fisiológica foram então injetadas e aspiradas. O material recolhido (LBA) foi depositado em tubo tipo falcon estéril. O procedimento de coleta do material foi realizado até se obter cerca de 30mL de LBA por animal, este permaneceu armazenado em banho de gelo e ao abrigo da luz até o início da próxima etapa (Figura 4).



**Figura 4- Obtenção do LBA.**

Fonte: Queirós-Santos (2000); Melo (2010).

---

### **Contagem total e diferencial de leucócitos no LBA**

---

#### *Contagem total de leucócitos*

Os leucócitos totais do LBA foram contados ao microscópio de luz a partir de uma amostra diluída na proporção de 1:10 em corante Azul Tripán a 0,05%. Foi utilizada, para isto, uma câmara de volume conhecido a Câmara de Neubauer.

### *Contagem diferencial de leucócitos*

Para contagem diferencial dos 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. As preparações foram, então, fixadas e coradas com o Kit Panótico Rápido (Laborclin Ltda). As lâminas, depois de secas à temperatura ambiente, foram lidas ao microscópio de luz com a objetiva de imersão (100x), pela contagem de 200 leucócitos. Os diferentes tipos destas células foram quantificados em um contador eletrônico da marca Kacil, com teclas correspondentes a cada tipo de glóbulo branco.

---

### **Função dos macrófagos**

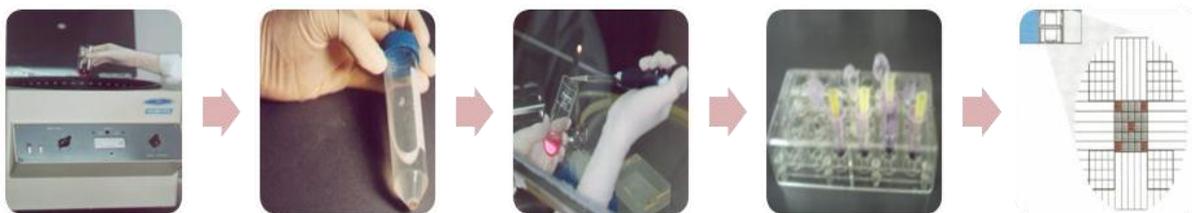
---

#### *Cultura dos macrófagos alveolares*

O LBA recolhido foi centrifugado a 1500rpm durante 15 minutos. Concluída a centrifugação, o precipitado, que corresponde às células, foi ressuspenso em um meio de cultura para células (RPMI 1640, Gibco-Invitrogen Corporation) suplementado com soro fetal bovino (3%, Gibco-Invitrogen Corporation) e antibióticos (penicilina 100U/mL e estreptomicina 100 µg/mL) (Sigma-Aldrich, SP Brasil).

Dessa suspensão foi realizada a contagem em Câmara de Neubauer, acrescentando-se uma alíquota de 10µL da suspensão de células e 90µL do corante azul tripan a 0,05%, na diluição de 1:10. O azul tripan é um corante vital que tem a propriedade de

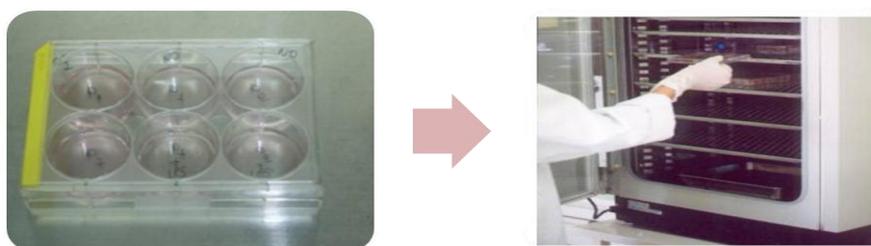
corar as células mortas, excluindo-a das células vivas. Esse corante é utilizado para avaliar a viabilidade e fazer ao mesmo tempo a contagem das células (Figura 5).



**Figura 5- Procedimento para contagem das células do LBA.**

Fonte: Queirós-Santos (2000)

Os macrófagos alveolares foram cultivados como descrito em De Castro *et al*, (2000). Após a contagem as células foram transferidas para placas de cultura tipo Falcon, com 6 poços de 35 mm de diâmetro cada, onde foram dispensados em cada poço, 2 mL da suspensão em uma proporção de  $2,0 \times 10^6$  células para 2mL de meio RPMI 1640. Após 1 hora na estufa para cultura de células a  $37^{\circ}\text{C}$  e com 5% de  $\text{CO}_2$ , foi realizada uma lavagem de cada poço, com RPMI 1640, para retirada das células não aderentes. Posteriormente, adicionou-se 2mL de meio RPMI 1640, em cada poço, deixando-se as placas por mais 1 hora em estufa para estabilização das células (Figura 6).



**Figura 6- Células do LBA em cultura.**

Fonte: Queirós-Santos (2000)

---

### **Análise da produção de superóxido ( $O_2^-$ )**

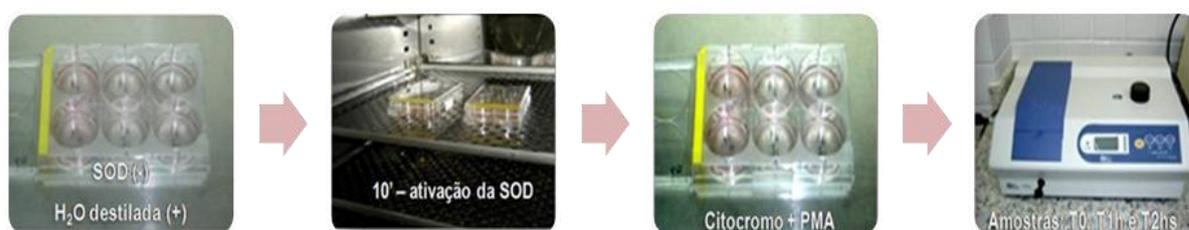
---

O ânion superóxido pode ser detectado por sua habilidade em reduzir quimicamente um composto aceptor de elétrons. Para isso, neste estudo utilizou-se o Citocromo c (30mg/mL em HBSS,  $2.4 \times 10^{-3} M$ , *ferrocitocromo c* de mitocôndria de coração de cavalo, tipo IV, Sigma), também foi necessária a utilização de uma enzima, a superóxido dismutase (enzima superóxido dismutase de eritrócitos bovinos – SOD, Sigma) contendo 3000 U/mg de proteína em solução final de 3mg por mL de água destilada, para a avaliação da produção de ânion superóxido formado.

As culturas de células foram preparadas em dois sistemas de análise descontínua com uma primeira avaliação 1 hora após o início da estimulação das células com acetato miristato de forbol (PMA, Sigma) e uma segunda avaliação, no final de um período de 2 horas. Para o preparo desses sistemas foram utilizados macrófagos em cultura ( $2 \times 10^6$  células por 2mL de RPMI 1640), sendo a um deles adicionado 29  $\mu L$  de SOD (controle negativo) e ao outro, a mesma quantidade de água destilada (controle positivo). Estes foram mantidos em estufa com atmosfera úmida de 5% de  $CO_2$  e a  $37^\circ C$ , por 10 minutos (ativação da SOD). Ao meio foram acrescentados 143 $\mu L$  de Citocromo c a PMA. O PMA foi preparado em solução concentrada de 3000 $\mu g/mL$  em dimetil sulfoxido de sódio (DMSO, Sigma) diluído para uma concentração de 2 $\mu g/mL$  em 2145mL de HBSS (solução salina balanceada de Hanks, Gibco-Invitrogen Corporation) e colocado em cada um dos poços da placa de cultura.

Amostras foram retiradas de cada sistema e colocadas em tubos Eppendorf. A primeira alíquota recolhida correspondia ao tempo “zero” de cada sistema e as amostras subsequentes foram coletadas em intervalos regulares de tempo. Para determinação

espectrofotométrica, ao término da última coleta as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 min em microcentrífuga Tomy-TX 160. O sobrenadante foi levado para determinação do grau de redução de citocromo c (proporcional à produção do radical superóxido) em comprimento de onda de 550 nm (Figura 7). A curva de  $O_2^-$  foi obtida pela conversão dos valores de absorbância para nanomoles de  $O_2^-$ /min utilizando-se a fórmula:  $[O_2^-] = 205,49 \times \text{valor da absorbância} \times \text{volume da amostra coletada}$  (JOHNSTON, 1984).



**Figura 7 – Procedimento para análise da produção de superóxido.**

Fonte: Queirós-Santos (2000); Melo (2010).

---

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

---

A produção de ON por macrófagos em cultura foi determinada segundo o método descrito por Feder e Laskin, em 1994. Após 24 horas de estímulo *in vitro* com LPS (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), os macrófagos estimulados e não estimulados com LPS foram avaliados quanto à liberação de ON.

As células foram distribuídas em uma concentração de  $2 \times 10^6$  células/mL por poço da placa tipo Falcon, em estufa, com tensão de 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) a 37° C por um período de 24 horas.

Para quantificação de nitrato e nitrito, foram retirados 100µL do sobrenadante das culturas e acrescentado 50µL do reagente de Griess (1,5% de sulfanilamida em 5% de ácido fosfórico – H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0,1% de naftiletileno diamino diidrocloreto em H<sub>2</sub>O). Após um repouso de 15 minutos à temperatura ambiente, realizou-se a leitura em leitor de ELISA (Ensaio Imunoenzimático) com filtro de 550 nm (Figura 8). A concentração de nitrito foi calculada através de valores médios de uma curva padrão de nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>) e os dados foram expressos em mM de nitrito/mL.



**Figura 8- Procedimento para análise da produção de óxido nítrico.**

Fonte: Queirós-Santos (2000); Melo (2010).

#### *Construção da curva padrão*

Para efetuar a dosagem de ON através da quantificação dos níveis de nitrito e nitrato das amostras foi necessário realizar uma curva padrão (QUADRO 1).

Para a construção desta foram utilizados reagentes a base da solução de Nitrato de sódio ( $\text{NaNO}_2$ ) 1mM (Solução padrão), meio de cultura RPMI 1640 e reagente de Griess (Solução de revelação) em volumes pré-estabelecidos conforme descrição a seguir:

QUADRO 1 – Construção de curva padrão para dosagem de óxido nítrico

<b>Tubo</b>	<b>Concentração de <math>\text{NaNO}_2</math> (<math>\times 10^6</math> M)</b>
1	0,5
2	1
3	2
4	4
5	5
6	6
7	10
8	12,5
9	20
10	25
11	37,5
12	50
13	100

*Processo de revelação da curva padrão e das amostras*

A determinação dos níveis de nitrito e nitrato da curva padrão, assim como daqueles liberados nas amostras experimentais 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 liberados pelas células dos animais dos diferentes grupos.

---

### **Análise da viabilidade celular**

---

A viabilidade celular foi avaliada pela redução mitocondrial de 3 - [4, 5-dimethylthiazol-2-il] -2, 5-difenil tetrazolium brometo (MTT) a cristais de formazan, tal como descrito (AKAO Y COL. 1995). Os macrófagos alveolares foram incubados com MTT (0,5 mg / mL) em meio completo (200 µL/poço) por 60 minutos a 37°C em 5% de CO<sub>2</sub>. Depois desse período o meio é removido e o DMSO é adicionado mais etanol (em uma proporção de 1:1). O sobrenadante é então coletado das placas de cultura a absorvância é lida em leitor de ELISA com filtro de 550 nm. O percentual de viabilidade celular foi expresso pela fórmula:

Viabilidade celular = (Absorbância de células tratadas/ Absorbância de células controle) x 100%

---

### **Avaliação do índice de aderência (IA)**

---

Após o período de 1 hora das células em cultura, foram retiradas alíquotas do sobrenadante contendo células não aderentes e estas adicionadas ao corante azul Tripan na diluição de 1:10 e levadas para contagem das células em hemocítômetro. O IA foi calculado através da fórmula descrita por De La Fuente (1991):

IA = 100 – células não aderidas/mL divididas por n.º inicial de células/mL x 100.

---

### **Obtenção da gordura visceral**

---

A coleta da gordura visceral foi realizada após todo o procedimento cirúrgico de traqueostomia e coleta do LBA. Assim, com o animal anestesiado, realizou-se uma incisão na região abdominal, todos os órgãos deste local foram retirados, as gorduras aderidas a estes foram separadas e somadas à gordura da região abdominal. O total de gordura foi então separado para posterior pesagem.

---

### **Análise estatística**

---

Na análise dos dados foi utilizado o teste t de Student para os dados paramétricos e o teste de Mann-Whitney para os dados não paramétricos. Os resultados foram representados em média  $\pm$  erro-padrão. Para isto foi utilizado o Software SigmaStart 2.0. A significância foi definida para  $p < 0,05$ .

# RESULTADOS

---

## 4 RESULTADOS

---

### Artigos Originais

---

No presente trabalho de tese, foram examinadas as conseqüências da obesidade induzida pela dieta hiperlipídica sobre parâmetros da resposta imunológica após endotoxemia em ratos adultos. Dois artigos científicos originais foram submetidos a revistas.

O primeiro artigo “**Obesity and microbicidal activity of alveolar macrophages in adult rats**”, foi submetido como artigo original à revista **Nutrition**. É classificada como qualis B1 pela CAPES e possui fator de impacto igual a 2.726. (ANEXO C)

O segundo artigo “**Endotoxemia and obesity: repercussion on functional aspects of alveolar macrophage**”, foi submetido como artigo original à revista **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** é classificada como qualis A2 pela CAPES e possui fator de impacto igual a 1.150 (ANEXO D).

## ARTIGO I

Title: Obesity and microbicidal activity of alveolar macrophages in adult rats

Running head: Obesity and microbicidal activity of macrophages

Authors:

Rosangela Rosendo da Silva<sup>1</sup>

Karla Melo Ferreira da Silva<sup>2</sup>

Solange Maria Magalhães da Silva Porto<sup>3</sup>

Bruno Sampaio<sup>4</sup>

Vanessa de Oliveira Santana<sup>5</sup>

Célia Maria Machado Barbosa de Castro<sup>6</sup>

<sup>1,2,3,5</sup> Department of Nutrition, Center for Health Sciences - Federal University of Pernambuco.

<sup>4</sup> Department of Tropical Medicine - Federal University of Pernambuco.

<sup>6</sup> Department of Tropical Medicine, Vice-coordinator of Nutrition Graduation, Center for Health Sciences - Federal University of Pernambuco.

Word count: 4922

Number of figures and tables: 7

Corresponding author

Departamento de Nutrição, CCS, UFPE, Av. Professor Moraes Rego, s/n, CEP 50670-901, Cidade Universitária, Recife/PE, Brazil. Tel.: +55 81 2126 8470; fax: +55 81 2126 8473.

E-mail address: rosangelarosendo@yahoo.com.br

## Abstract

**Objective:** To evaluate the effect of obesity on microbicidal activity through the adhesion index, cellular viability and the oxidant activity of alveolar macrophages in adult rats. **Methods:** Male Wistar rats (n=40) were divided into the following groups: standard diet (SD) group, composed of 20 animals that received the standard diet from our bioterium (Labina ® -Purina do Brasil S.A) and the hyperlipidic diet (HD) group, which consisted of 20 animals that received a hypercaloric and hyperlipidic diet for 18 weeks. Bronchoalveolar lavage (BAL) of the animals was then done through tracheostomy procedure and the adhesion index, cellular viability and superoxide and nitric oxide dosage were evaluated from the isolated macrophages. In order to compare the groups, the Student's t-test was used for the parametric data and the Mann-Whitney test for the non-parametric data. **Results:** The obesity induced by the hyperlipidic diet caused a reduction in the superoxide anion production in the HD group in comparison to the SD. Although a tendency for lower values could be seen, no relationship between the adhesion index and cellular viability between the groups was found. **Conclusions:** The decrease in the production of superoxide anion and nitric oxide by the macrophages showed that those cells activity was compromised, thus weakening the host's response to an infectious process.

**Keywords:** Hyperlipidic diet, alveolar macrophages, nitric oxide, superoxide and obesity

## Introduction

In the last years obesity has been prevalent, showing increasing numbers, not only being a problem restrict to part of the population, but becoming a worldwide public health problem. It is a chronic disease in which the positive energy balance, associated to the adipose system, is a result of genetic factors, social environment and individual behaviors [1,2].

Nowadays it is known that 1.6 billion people in the world have excess weight, and approximately 400 million of those are obese. Despite the high prevalence, it is estimated that in 2015 there will be 700 million obese people in the world [3].

Obesity has been related not only to a great variety of endocrine and metabolic comorbidities, but also to immune system dysfunction [4]. It influences the innate and adaptive immune responses, with an impairing tendency related to the obesity level progression [4,5].

The immunological modifications that occur because of obesity affect the immune response as a whole, altering the humoral immunity, mainly antibodies secretion, cell-mediated immunity, leucocytes and lymphocytary subpopulations recruiting and the lymphocyte proliferation response to mitogens [6].

The macrophages constitute the second bigger cell population of the immune system, phagocytosis being their primary function and also being capable of assuming morphologically different forms depending on their location. In the lung, the alveolar macrophages are found, which are of great importance in the defense against microorganisms that commonly affect people through their respiratory airways [7].

Obesity impairs immunity, so it can also compromise the alveolar macrophages function [8]. These cells develop an essential role in the host's immune response to inflammatory and infectious process, as well as in the repair process [9].

The macrophages adhesion to bacteria surfaces is the first stage of the activation of those cells and the beginning of the immune response [10]. In the next step the phagocytary cells destroy the bacteria using a microbicidal system that depends on oxygen, made of lethal oxidants [11].

Once stimulated, the macrophages secrete a variety of substances, amongst them some reactive oxygen species (ROS), nitric oxide and cytokines that have important roles in their main functions, like bacteria deaths and immune-inflammatory response regulation [8].

In this study the alterations caused by obesity – induced by long-period administration of a hypercaloric and hyperlipidic diet in rats – on the function of alveolar macrophages were verified. In this context, the objective of this study will be to evaluate possible obesity-related modifications in the innate immune response, specially the microbicidal activity.

## Methods

### Animals and experimental groups

Male Wistar rats (n=40) with 21 days of age were used. The animals were maintained in a temperature of  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , in a 12-hour light/dark cycle (with the lights on at 6 o'clock), receiving water and rations *ad libitum*. This study was approved by the Federal University of Pernambuco Animal Experimentation Committee (CEEA/UFPE) and followed the ethical recommendations of the Brazilian Animal Experimentation College (COBEA).

The experimental groups were divided according to the diet offered to them. The standard diet group (SD) was fed with the bioterium standard diet: Labina<sup>®</sup> - Purina do Brasil S.A., whereas the hyperlipidic diet group (HD) was fed with a hyperlipidic diet.

### Diets

The standard diet was made of a commercial ration for rats, which had (per kilogram) 23.0% of proteins, 63.0% of carbohydrates and 4.0% of lipids, with 2.75 Kcal/g. The hyperlipidic diet consisted of a mix of hypercaloric food, containing Labina, roasted peanuts, milk chocolate and cornstarch cookies, on a 3:2:2:1 ratio, respectively, with 17.93% proteins, 47.18% carbohydrates, 24.50% lipids with 4.81 Kcal/g. These ingredients were milled, mixed and offered in the form of pellets.

## Body weight

The animals' body weight was registered using an electronic digital scale (Marte S-4000) with capacity for 4000g and sensitivity of 0.1g.

## Food consumption and caloric intake

Food consumption for each animal was assessed on a daily basis and calculated through the difference between the amounts of given and rejected food. Caloric consumption was identified based on the daily food consumption and the amount of calories in each diet.

## Bronchoalveolar lavage (BAL)

The bronchoalveolar lavage was done according to the technique described by De Castro et al. [13]. The animals were anesthetized with a solution of 0.5% chloralose and 12.5% uretana, 1mL/100g (intraperitoneal). In the tracheostomy procedure a plastic cannula was inserted, attached to a syringe containing 0.9% NaCl. Various aliquots were injected and collected in tubes (falcon, Sigma). Approximately 30mL BAL per animal was obtained.

The bronchoalveolar lavage was centrifuged at 1500 rpm during 15 minutes. The resulting precipitated was resuspended in a culture medium (RPMI 1640, Gibco<sup>®</sup> - Invitrogen Corporation), supplemented with fetal bovine serum (3%, Gibco<sup>®</sup> - Invitrogen Corporation) and antibiotics (penicillin 100U/mL and streptomycin 100µg/mL).

## Culture of alveolar macrophages

The alveolar macrophages were cultivated as described by De Castro et al. [13]. The cells were resuspended in RPMI-1640 culture medium (Sigma<sup>®</sup> Chemical Company, St. Louis, MO), supplemented with 10% fetal bovine serum, 100U/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin. The alveolar macrophages were then transferred to Falcon<sup>™</sup> 6-well 35mm culture plates, 2mL of the suspension in a  $2.0 \times 10^6$  cells for 2mL of medium being dispensed in each well. The cells that did not adhere were removed with RPMI 1640.

## Measurement of superoxide

The superoxide anion was induced by the addition of Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma<sup>®</sup>) in a  $2\mu\text{g/mL}$  Hanks solution (HBSS Gincó<sup>®</sup>-Invitrogen Corporation). Two discontinuous analysis systems were prepared, with 1 evaluation each hour, for a total period of 2 hours. The specificity of the assay was guaranteed by the addition of superoxide dismutase (SOD) of bovine erythrocytes (Sigma<sup>®</sup> –) containing 3000 U/mg of protein in final solution of 3mg/mL of distilled water. Macrophages in culture were used in order to prepare these systems ( $2 \times 10^6$  cells per 2mL of RPMI 1640), 29 mL of SOD being added to one of them. The systems were maintained in a greenhouse at  $37^\circ\text{C}$ , with humid atmosphere, 5% of  $\text{CO}_2$  for 10 minutes (SOD activation). Cytochrome c type IV of mitochondria from the heart of a horse (30mg/mL in HBSS,  $2.4 \times 10^{-3}$  M Sigma<sup>®</sup>) was added to the cells in order to quantify the  $\text{O}_2$  formation.

Samples were extracted from each system, the first aliquot corresponding to time “zero” and the subsequential samples were collected on regular time intervals.

Spectrophotometric measurements were done on 550nm in order to determine the degree of cytochrome c reduction of the supernatants. The  $O_2^-$  curve was obtained by the conversion of the absorbance values to  $O_2^-$ /min nanomoles, using the formula:  $[O_2^-] = 205.49 \times \text{absorbance value} \times \text{collected sample volume}$  [14].

#### Nitric oxide (NO) assay

The nitric oxide liberation was measured through Griess Reaction colorimetric quantitative assay. The production of nitric oxide was determined by macrophages supernatant culture, according to the method described by Feder and Laskin [15]. After 24 hours of in vitro stimulus with LPS (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), the macrophages – both the stimulated and the non-stimulated with LPS – were evaluated for NO liberation. The absorbance of the azochromophore was measured at 550 nm.

#### Cell viability assay

Cellular viability was evaluated through mitochondrial reduction of 3 - [4, 5-dimethylthiazol-2-il] -2, 5-difeniltetrazolium brometo (MTT) to formazan crystals, as described by AKAO et al. [16]. The alveolar macrophages were incubated with MTT (0.5 mg/mL) in complete medium (200  $\mu\text{l}/\text{well}$ ) for 60 minutes at 37°C in 5% of  $\text{CO}_2$ . After this period the medium is removed and DMSO with ethanol are added in a 1:1 ratio, in 200 mL of volume. The supernatant is then collected from the culture plates and the absorbance is read in a ELISA reader with 550 nm filter. The cell viability

percentage is expressed by the formula: Cell viability = (Treated cells absorbance/Control cells absorbance) x 100%.

#### Adhesion index (AI)

The adhesion index evaluation is done 1 hour after the macrophages culture. Supernatant aliquots are extracted for non-adherent cells counting in 1/10 trypan blue dilutions, being read and counted in a hemocytometer right after. IA was calculated by using the formula described by De La Fuente et al. [17]:  $IA = 100 - \text{non-adherent cells/mL} \times 100 / \text{initial number of cells/mL}$ .

#### Visceral fat

Visceral fat was collected after the tracheostomy surgical procedure and BAL. With the animal anesthetized, an incision on the abdominal region was done, all the organs were extracted, the fat attached to these organs was separated, summed up to the abdominal fat and put away for posterior weighting.

#### Statistical analysis

In order to compare the groups, Student's t-test was used for parametric data and the Mann-Whitney test for the non-parametric. Significance level was defined as  $p < 0.05$ . The analysis of data was performed using sigma Stat 2.0 software.

## Results

After 18 weeks of diet administration the animals that received hyperlipidic diet (HD) showed significant body weight increase in relation to the rats that fed on standard diet (SD). Figure 1 shows body weight gain of the rats during the entire period of diet administration. As expected, body weight of the rats from the HD group was higher than of the rats from the SD group (SD=383.80 ± 12.86 g; HD=437.45 ± 8.15; p=0.009).

Regarding food consumption, a significant reduction in the HD group was observed, in comparison to the SD group. Calorie intake, however, was 12.75 Kcal higher in the HD (Table1).

The consumption of high fat diet increased the amount of visceral fat, this study found three times more visceral fat in the HD group (14.5 ± 0.8;) compared to SD (4.8 ± 0.3) (Figure 2).

The adherence index was expressed in percentage (%). In spite of the fact that the HD group showed lower values, there was no significant difference between the groups (SD= 93.64 ± 1.30%; HD= 88.10 ± 2.14%) (Figure 3).

Even if there was a tendency to reduction in alveolar macrophages viability in the HD group when compared to the SD group (Figure 4), it was observed that at least 80% of the cells were viable.

Superoxide production in the macrophages culture supernatant showed reduced (p=0.001) in HD group animals in relation to the SD animals 2h after the macrophages stimulation with PMA. At the first hour there was a difference in superoxide liberation between the groups (SD=0.94 ± 0.07 e HD = 0.65 ± 0.01; p<0.001). At the second hour,

the superoxide liberation remained unchanged when comparing the groups ( $SD=1.18 \pm 0.09$ ), being higher on the HD group ( $0.93 \pm 0.08$ ,  $p<0.001$ ) (Figure 5).

In the supernatant with macrophages culture that was not stimulated with in vitro LPS no reduction in the NO production was seen on the HD group, when compared to the SD group ( $SD=5.77 \pm 0.28$ ;  $HD=5.19 \pm 0.32$ ). In the supernatant from the macrophages culture stimulated with in vitro LPS there was a reduction ( $p> 0.05$ ) in the production of NO in the HD animals when compared to the SD group ( $SD= 8.14 \pm 0.34$ ;  $HD= 6.57 \pm 0.49$ ,  $p= 0.027$ ) (Figure 6).

## Discussion

Obesity is associated with immune system compromising. Clinical findings point out to a higher susceptibility of obese individuals to the development of infectious diseases and cancer (24, 25).

Hyperlipidic and hypercaloric diets have been used with success to reproduce experimental models of obesity. Some studies demonstrated that rats that underwent palatable hyperlipidic diet showed, from three weeks on, an increase in retroperitoneal and epididymal adipose tissue quantity [18]. In this research it was possible to observe that rats that underwent hypercaloric and hyperlipidic diet for a prolonged time showed higher weight gain, in comparison to rats that received standard diet.

The results related to the effects of the diet on body weight are divergent in literature. This fact can be explained by the different periods of diet consumption and types of ingredients used in its making [18, 19].

Some authors found results similar to ours, like body weight gain in rats that fed on hyperlipidic diet [18, 20-22]. Some other studies, however, presented decrease in body weight in the group fed with hyperlipidic diet [12, 23].

About food consumption, it was seen that the HD group ingested less ration (in grams). But, when calculating these values according to the ingested energy density (Kcal/day), it could be seen that daily caloric consumption was still higher than that from the HD group. There is divergence between the results of different works found in literature, fact that can be due to the period the rats maintained in an established diet and the right moment of the beginning of the treatment [24, 25]. Confirming this study, Kretschmer et al. [26] showed a reduction in ration consumption in animals that received a diet fat-rich diet.

Even showing lower food consumption, it was observed that hyperlipidic diet significantly increased the visceral fat quantity, so that three times more fat was found in the HD group. This visceral adipose system increase in rats from group HD is an important finding, as the abdominal fat has been reported by some authors to be a determinant factor for developing insulin resistance [27, 28]. Previous studies also showed the hyperlipidic diet efficiency in increasing body weight [12, 18, 20, 29, 30].

The increase in visceral fat induced by the consumption of hyperlipidic ration is frequently exacerbated by the developing of a hyperphagic behavior, which is defined as excessive energy intake increase, not necessarily by the increase in consumed ration [31-33].

There are evidences that the higher body fat increase is due to the consumption of hypercaloric and hyperlipidic diets and may be associated to a higher efficiency to induce weight gain per kilogram of consumed ration. This means that the consumption of this kind of food predisposes the organism to positive energy balance and to lipid deposition on tissues, especially on adipose tissue [34-36].

Womack et al. [37] described that the immunologic processes involved in defending the organism are strongly compromised by the nutritional state. The immunologic repercussions – and the complex interaction between them – may, in a certain way, alter the obese individual's immune response [38]. Besides, there are evidences that demonstrate a connection between adipose system and immunocompetent cells. This interaction is well characterized in obesity, as studies demonstrate the influence of excess adiposity on immune function in genetically obese humans and rats [39].

In general, clinical and epidemiological data reinforce the evidence that the incidence and severity of specific types of infectious diseases are higher in obese

patients, when compared to slim individuals, together with the occurrence of weak antigen response in overweight individuals [4]. Moreover, the simple adoption of a fat-rich diet is enough to promote a partial impairment of the immune response, and increasing infection risk [40].

There are not, in literature, researches correlating obesity with adhesion index. From the results obtained, it was demonstrated that obese animals showed a tendency to lower adhesion indices when compared to control animals.

Considering that adhesion capacity is an essential cell functionality, as it is the first step in the phagocytic process [10, 17, 41], we observed that it is impaired in this obesity model.

Measuring oxidant substances produced by macrophages is considered a sensible and convenient way to evaluate their function [42, 43]. In order to quantify the liberated superoxide from macrophages in culture, the phorbol 12-myristate 13-acetate (or PMA) was used as a stimulus. This product works via protein kinase C and unleashes a respiratory explosion. This stimulus may generate other reactive radicals, thus the specificity of superoxide production occurs through the usage of SOD as negative control [43].

In this study, it was demonstrated that obesity caused a reduction in superoxide production in adult animals. De la Puerta et al. [8] also showed in their study a reduction in superoxide production by macrophages in obese animals. Besides that, our results disagree with other animal model experimental studies, in which has been described that a lipid-rich diet caused an increase in superoxide production [44]. These different results may be justified by the different types of diet used, feeding time and animals' age.

In this study, superoxide production in alveolar macrophages supernatant culture grew from the first to the 1<sup>st</sup> to the 2<sup>nd</sup> hour of incubation in all of the groups evaluated. This increase is justified by previous studies about the kinetics of liberation of this radical [45].

As happened to superoxide synthesis, obesity also impaired the liberation of nitric oxide (NO) from the alveolar macrophages culture [46].

The NO production is one of the fastest and most effective in the defense against infections [47]. The macrophages of obese rats showed a reduction in the synthesis of NO when compared to control animals. It can thus be observed that the NO production was weakened by the usage of hyperlipidic diet. Previous studies also showed a reduction in the nitric oxide production in rats fed with HD ration [47, 48].

A reduction of the alveolar macrophages functionality may partially explain the immune compromising observed in obese rats. This fact is of extreme importance, as there is a worldwide tendency for dietary pattern evolution (Western dietary pattern) and the increase in the proportion of obese [49].

Clinical and epidemiologic studies showed that the incidence and the gravity of infectious diseases are higher in obese individuals [48-51]. It was evidenced that in this study the macrophages function presented itself significantly reduced in the obese animals. Because of this impairment of the immunologic response, obesity is seen as a worrying reason.

## Conclusions

We could observe that the administration of a hyperlipidic diet caused an impairment of some functions of the innate immune system. The decrease in alveolar macrophages nitric oxide and superoxide anion production in response to obesity shows that it reduces the oxidant activity and, consequently, damages immune response. The results obtained fortify the hypothesis that obesity reduces alveolar macrophages capacity in order to elaborate an adequate microbicidal response.

## Acknowledgements

This work was supported by Foundation of Science and Technology of Pernambuco State/FACEPE and The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq)/Brazil.

## References

- [1] Vanzelli AS, Castro CT, Pinto MS, Passos SD. Prevalência de sobrepeso e obesidade em escolares da rede pública do município de Jundiaí, São Paulo. *Ver Paul Pediatr* 2008;26 (1):48-53.
- [2] Trasande L, Cronk C, Durkin M, Weiss M, Schoeller DA, Gall EA, et al. Environment and Obesity in the National Children's Study. *Environ Health Perspect*. 2009;117:159–166.
- [3] ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Obesity and Overweight. [acesso em 18/07/2011]. Disponível em:  
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>
- [4] Marti A, Marcos A, Martínez JA. Obesity and immune function relationships. *Obes Rev* 2001;2:131-40.
- [5] Sedletskii L, Mirchuk KK, Koreshkin IA. The immune status of patients with obesity. *Vrachebnoe Delo* 1990;9:71-3.
- [6] Marcos A, Nova E, Montero A. Changes in the immune system are conditioned by nutrition. *Eur J Clin Nutr* 2003;57(1):66-9.

[7] Kazimierz W. Caspase-8 activation precedes alterations of mitochondrial membrane potential during monocyte apoptosis induced by phagocytosis and killing *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun* 2004;72(5):2590-7.

[8] de La Puerta R, Marquez-Martin A, Fernandez-Arche A, Ruiz-Gutierrez V. Influence of dietary fat on oxidative stress and inflammation in murine macrophages. *Nutrition*. 2009;25:548–54.

[9] Trowbridge HO. Immunological aspects of chronic inflammation and repair. *J Endod* 1990;16:54-61.

[10] Segura JJ, Jiménez-Rubio A. Effect of eugenol on macrophage adhesion in vitro to plastic surfaces. *J Endod* 1998;24:229-31.

[11] Babior BM. Superoxide: a two-edged sword. *Braz J Med* 1997;30: 141-55.

[12] Estadella D, Oyama LM, Dâmaso AR, Ribeiro EB, Oller Do Nascimento C.M. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition* 2004;20(2):218-24.

[13] De Castro CMMB, Bureau MF, Nahori MA, Dumarey CH, Vargaftig BB, Bachelet M. Modulation by dexamethasone of phospholipase A<sub>2</sub> activities in endotoxemic guinea pigs. *J Appl Physiol* 1995;79:1271-7.

- [14] Johnston Jr RB. Measurement of O<sub>2</sub>- secreted by monocytes and macrophages. *Methods in enzymology* 1984;105:365-9.
- [15] Feder LS, Laskin DL. Regulation of hepatic endothelial cell and macrophage proliferation and nitric production by GM-CSF, M-CSF and IL-1 b following acute endotoxemia. *J Leukoc Biol* 1994;55:507-13.
- [16] Akao N, Sugimoto N, Thu AM, Kondo K, Tsuda Y, Fujita K. A tetrazodium dye (MTT) assay for testing Larval viability using scond-stage larvae of *toxocara canis*. *Jpn J Parasitol* 1995;44:1-5.
- [17] De La Fuente M, Del Rio M, Ferrandez MD, Hernanz A. Modulation of phagocytic function in murine peritoneal macrophages by bombesin, gastrin-releasing peptide and neuromedin. *C Immunol* 1991;73:205-11.
- [18] Duarte ACGO, Fonseca DF, Manzoni MSJ, Soave CF, Sene-Fiorese M, Dâmaso AR, et al. Dieta hiperlipídica e capacidade secretória de insulina em ratos. *Rev Nutr* 2006;19(3):341-8.
- [19] Mendonça AC, Carneiro EM, Bosqueiro, Jr, Crepaldi-Alves SC, Boscher, AC. Development of the insulin secretion mechanism in fetal and neonatal rat pancreatic B-cells: response to glucose, K<sup>+</sup>, theophylline, and carbamylcholine. *Braz J Med Biol Res* 1998;31(6):841-6.

- [20] Bernardes D, Manzoni MSJ, Souza CP, Tenório N, Dâmaso AR. Efeitos da dieta hiperlipídica e do treinamento de natação sobre o metabolismo de recuperação ao exercício em ratos. *Ver. bras. Educ. Fís. Esp* 2004;18(2):191-200.
- [21] Santos RS, Vianna LM. Dieta hipercalórica agrava a hipertensão arterial em ratos espontaneamente hipertensos. *Nutrire Rev Soc Bras Aliment Nutr* 2007;32:1-9.
- [22] Pauli JR, Ropelle ER, Cintr, DE, Souza CT. Efeitos do Exercício Físico na Expressão e Atividade da AMPK $\alpha$  em Ratos Obesos Induzidos por Dieta Rica em Gordura. *Ver. Bras. Med. Esporte* 2009;15:98-103.
- [23] Franco LDP, Campos JADB, Demonte A. Teor lipídico da dieta, lipídios séricos e peso corporal em ratos exercitados. *Rev. de Nutr* 2009;22:359-66.
- [24] Kusunoki M, Storlien LH, Macdessi J, Oakes ND, Kennedy C, Crisholm DJ, et al. Muscle glucose uptake during and after exercise is normal in insulin-resistant rats. *Am J Physiol* 1993;264:167-72.
- [25] Kim CH, Youn JH, Park JY, Hong SK, Park KS, Park SW. Effects of high fat diet and exercise training on intracellular glucose metabolism in rats. *Am J Physiol* 2000;278:977-84.
- [26] Kretschmer BD, Schelling P, Beier N, Liebscher C, Treutel S, Krüger N, et al. Modulatory role of food, feeding regime and physical exercise on body weight and insulin resistance. *Life Sci* 2005;76(14):1553-73.

[27] Perez-Martin A, Raynaud E, Mercier J. Insulin resistance and associated metabolic abnormalities in muscle: effects of exercise. *Obes Rev* 2001;2(1):47-59.

[28] Lange LA, Norris JM, Langefeld CD, Nicklas BJ, Wagenknecht LE, Saad MF, et al. Association of adipose tissue deposition and beta-2 adrenergic receptor variants: the IRAS family study. *Int J Obes* 2005;29(5):449-57.

[29] Bellaver L, Vital MA, Arruda AM, Bellaver C. Efeitos da dietilpropiona, energia da dieta e sexo sobre o ganho de peso corporal, peso dos órgãos e deposição de tecidos em ratos. *Arq Bras Endocrinol Metab* 2001;45(2):167-72.

[30] Gaíva MHG, Couto RC, Oyama LM, Couto GEC, Silveira VLF, Ribeiro EB, et al. Polyunsaturated fatty acids rich diets: effect on adipose tissue metabolism in rats. *Br J Nutr* 2001;86:371-7.

[31] Harrold JA, Widdowson PS, Clapham JC, Williams G. Individual severity of dietary obesity in unselected Wistar rats: relationship with hyperphagia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2000;279(2):340-7.

[32] Dourmashkin JT, Chang GQ, Gayles EC, Hill JO, Fried SK, Julien C, et al. Different forms of obesity as a function of diet composition. *Int J Obes* 2005;29(11):1368-78.

[33] Fam BC, Morris MJ, Hansen MJ, Kebede M, Andrikopoulos S, Proietto J, et al. Modulation of central leptin sensitivity and energy balance in a rat model of diet-induced obesity. *Diabetes Obes Metab* 2007;9:840-52.

[34] Bennett C, Reed GW, Peters JC, Abumrad NN, Sun M, Hill JO. Short-term effects of dietary-fat ingestion on energy-expenditure and nutrient balance. *Am J Clin Nutr* 1992;55(6):1071-7.1992

[35] Flatt JP. Body-composition, respiratory quotient, and weight maintenance *Am J Clin Nutr* 1995;62(5):1107-17.

[36] Grundy SM. The optimal ratio of fat-to-carbohydrate in the diet. *Annu Rev Nutr* 1999;19:325-41.

[37] Womack J, Tien PC, Feldman J, Shin JH, Fennie K, Anastos K, et al. Obesity and immune cell counts in women. *Metab. Clin. and Expe* 2007;56:998–1004.

[38] Alves MNR. Os efeitos da obesidade na resposta imune. *Ver. Bras. Nutr. Clin* 2006;21(4):316-9.

[39] Emilsson V, Thorleifsson G, Zhang B, Leonardson AS, Zing F, Zhu J, et al. Genetics of gene expression and its effect on disease. *Nature* 2008;452(7183):423-U2.

[40] Davis JE, Gabler NK, Walker-Daniels J, Spurlock ME. Tlr-4 deficiency selectively protects against obesity induced by diets high in saturated fat. *Obesity* 2008;16(6):1248-55.

[41] Murano I, Barbatelli G, Parisani V, Latini C, Muzzonigro G, Castellucci M, et al. Dead adipocytes detected as crown-like structures are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. *J Lipid Res* 2008;49(7):1562-8.

[42] Nieman DC, Henson DA, Nehlsen-Cannarella SL, Ekkens M, Utter AC, Butterworth DE, et al. Influence of obesity on immune function. *J Am Diet Assoc* 1999;99:294-9.

[43] Doherty DE, Haslett C, Tonnesen MG, Menson PM. Human monocyte adherence: a primary effect of chemotactic factors on the monocyte to stimulate adherence to human endothelium. *J Immunol* 1987;138:1762-70.

[44] Mayo LA, Curnutte JT. Kinetic microplate assay for SP by neutrophils and other phagocytic cells. *Methods Enzymol* 1990;186:567-75.

[45] De Castro CMMB, Manhães-De-Castro R, Medeiros AF, Queirós-Santos A, Ferreira e Silva WT, Lima Filho JL. Effect of stress on the production of O<sub>2</sub><sup>-</sup> in alveolar macrophages. *J. Neuroimmunol* 2000;108(1/2):68-72.

[46] Yaqoob P, Calder P. Effect of Dietary Lipid manipulation upon inflammatory mediator production by murine macrophage. *Cell Immunol* 1995;163:120-8.

[47] Borges M. C. Efeito da ração hiperlipídica e do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) sobre a composição corporal e sobre a resposta inflamatória de macrófagos peritoneais de ratos Wistar [Dissertação de mestrado]. Univ. de São Paulo, São Paulo, 2011

[48] Porto SMMS. Efeito do treinamento físico moderado em parâmetros metabólicos e imunológicos de ratos adultos obesos [Tese de doutorado]. Univ. Federal de Pernambuco, Recife, 2011.

[49] Agarwal S, Busse PJ. Innate and adaptative immunosenescence. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2010;104(3): 183-90.

[50] Fasol R, Schindler M, Schumacher B, Schlaudraff K, Hannes W, Seitelberger R, et al. The influence of obesity on perioperative morbidity: retrospective study of 502 aortocoronary bypass operations. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992;40:126-9.

[51] Gottschlich MM, Mayes T, Khoury JC, Warden GD. Significance on nutritional, immunologic, hormonal, and clinical outcome parameters in burns. *J Am Diet Assoc* 1993;93:1261-8.

[52] Moulton M J, Creswell L L, Mackey M E, Cox J L, Rosenbloom, M. Obesity is not a risk factor for significant adverse outcomes after cardiac surgery. *Circulation* 1994 94:87-92.

[53] Stallone DD. The influence of obesity and its treatment on the immune system.

Nutr. Rev 1994;52:37-50.

Figure 1

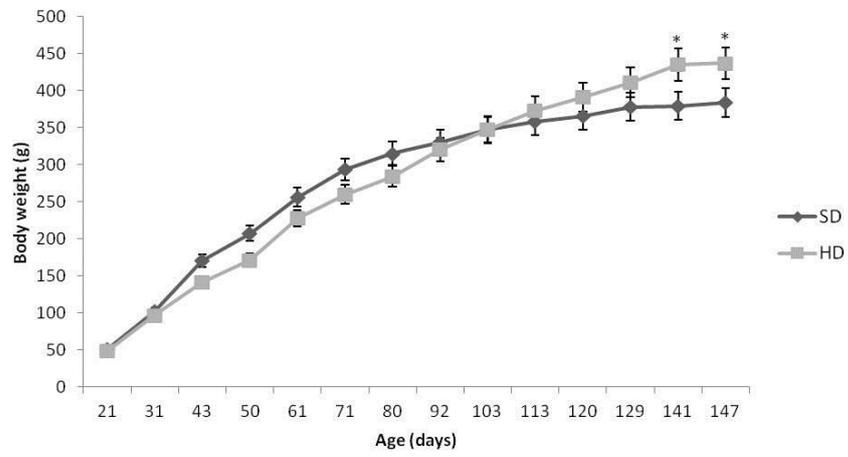


Table 1 - Food consumption and caloric intake

GROUPS	Food consumption	caloric intake
SD	22,0 ± 3,2	59,4 ± 3,49
HD	15,0 ± 1,4*	72,15 ± 2,78*

SD, standard diet group); HD, hyperlipidic diet group  
Data are expressed as mean ± SE.

\* p < 0.05 in the comparison between the SD and HD groups.

Figure 2

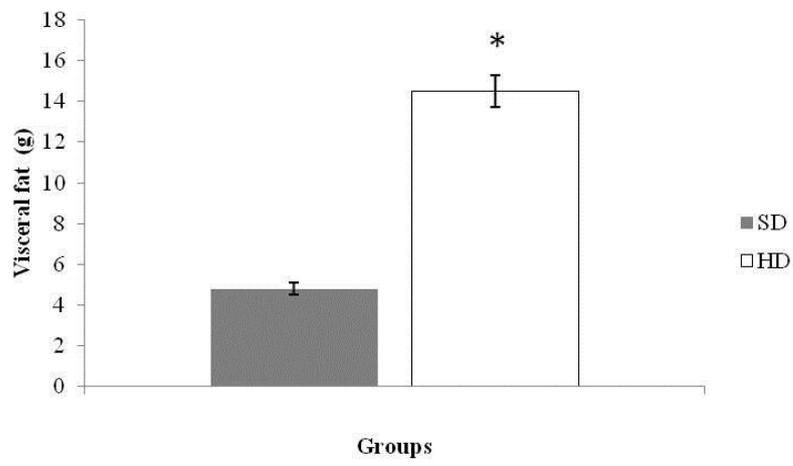


Figure 3

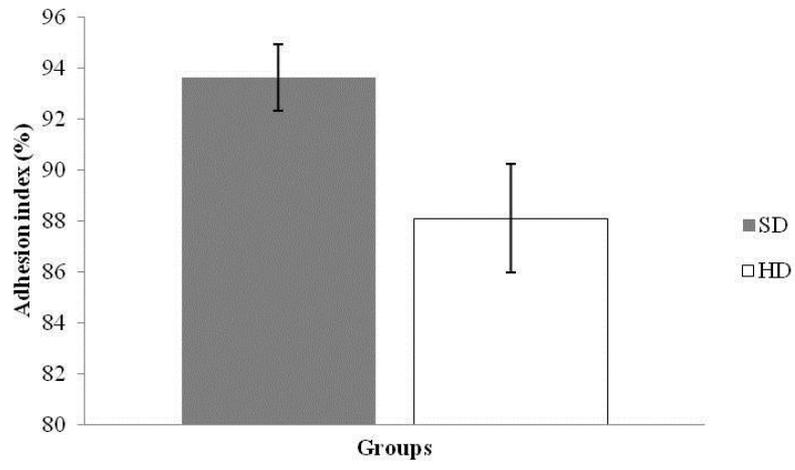


Figure 4

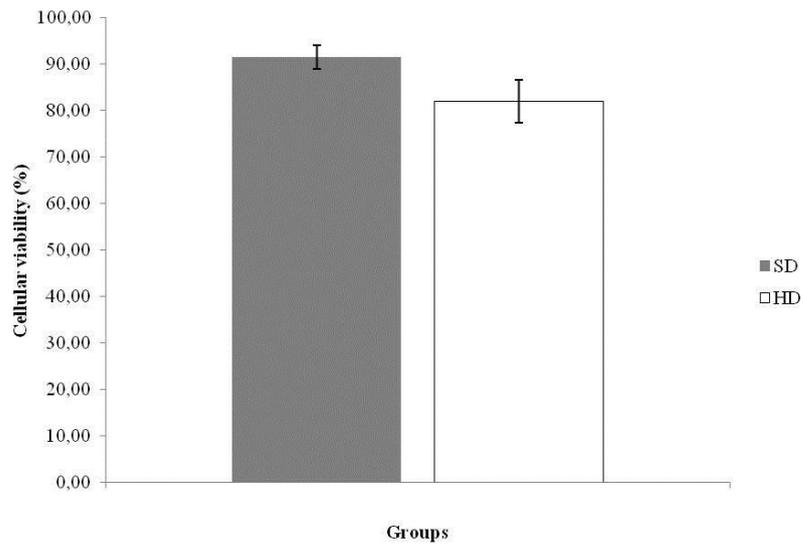


Figure 5

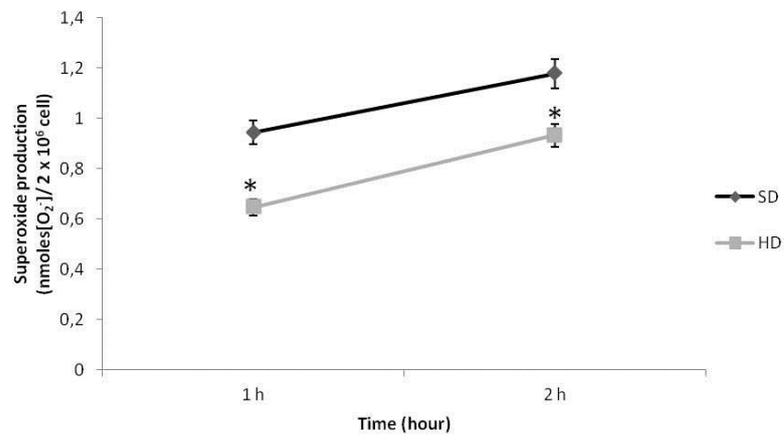
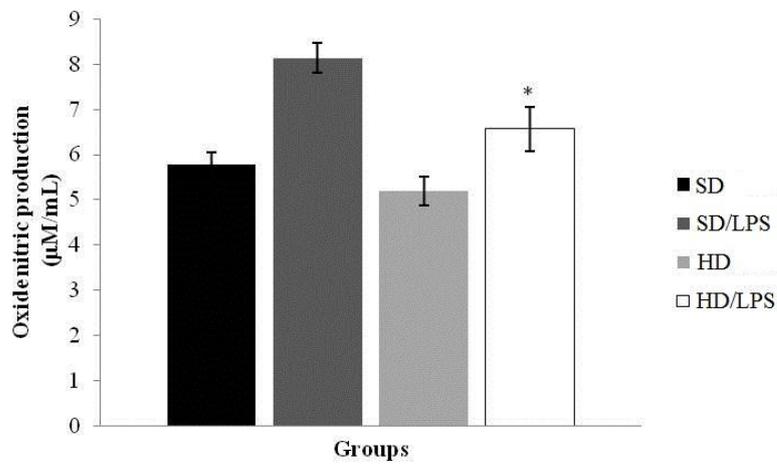


Figure 6



## Legends for the figures

Figure 1 – Evolution of body weight in rats that underwent standard diet or hypercaloric diet during 18 weeks. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  in the comparison between the SD and HD groups.

Figure 2 – Visceral fat after 18 weeks consuming their specific diets. Data are expressed by mean  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  in the comparison between the SD and HD groups.

Figure 3 – Adhesion index for alveolar macrophages. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  in the comparison between the groups.

Figure 4 – Alveolar macrophages availability. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM \*  $p < 0,05$  in the comparison between groups.

Figure 5 – Superoxide production after the stimulation with PMA. The superoxide was measured in alveolar macrophages culture supernatant at 1h and 2h periods. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  when comparing the SD and HD groups.

Figure 6 – oxide nitric production in alveolar macrophages culture supernatant. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  when comparing the SD and HD groups.

## **ARTIGO I I**

Title: Endotoxemia and obesity: repercussion on functional aspects of alveolar macrophage

Running head: Endotoxemia, obesity and alveolar macrophage

Authors:

Rosangela Rosendo da Silva<sup>1</sup>

Karla Melo Ferreira da Silva<sup>2</sup>

Solange Maria Magalhães da Silva Porto<sup>3</sup>

Bruno Sampaio<sup>4</sup>

Vanessa de Oliveira Santana<sup>5</sup>

Célia Maria Machado Barbosa de Castro<sup>6</sup>

<sup>1,2,3,5</sup> Department of Nutrition, Center for Health Sciences - Federal University of Pernambuco.

<sup>4</sup> Department of Tropical Medicine - Federal University of Pernambuco.

<sup>6</sup> Department of Tropical Medicine, Vice-coordinator of Nutrition Graduation, Center for Health Sciences - Federal University of Pernambuco.

Corresponding author

Departamento de Nutrição, CCS, UFPE, Av. Professor Moraes Rego, s/n, CEP 50670-901, Cidade Universitária, Recife/PE, Brazil. Tel.: +55 81 2126 8470; fax: +55 81 2126 8473

E-mail adress: rosangelarosendo@yahoo.com.br

## Abstract

This study investigated the effect of obesity on endotoxemia on the functional aspects of alveolar macrophages in adult rats. Male *Wistar* rats (N=40) were divided in two groups: standard diet (SD) group, composed of 20 animals that received the standard diet from the bioterium (Labina ® -Purina do Brasil S/A) and hyperlipidic diet group (HD), which consisted of 20 animals that received a hypercaloric and hyperlipidic diet during 18 weeks. After this period, the groups were subdivided into endotoxemic (SDE and HDE) and non-endotoxemic (SD and HD). In order to obtain the endotoxemic groups, the animals received an intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (1mg/Kg of body weight). The tracheostomy procedure was then done in order to obtain the bronchoalveolar lavage. From the macrophages isolated from this lavage, total and differential leukocyte count were done, as well as the evaluation of adhesion index, cellular viability and superoxide and nitric oxide (NO) produced by the isolated cells. Obesity induced by hyperlipidic diet associated with endotoxemia states caused a reduction in the macrophages production of superoxide anion. Alteration to the nitric oxide production also occurred between the groups. Endotoxemia caused an increase in NO production; obesity, on the other hand, caused the reduction of this production. Even with the tendency to lower values, there was no alteration to the adhesion index and cellular viability between the groups. A decrease in the oxidizing function of alveolar macrophages in response to obesity associated with endotoxemia shows immune response compromise when facing an infectious process.

Key words: reactive oxygen species, immunity, obesity, endotoxemia, rats.

## Introduction

The acute endotoxemia manifestations are caused by high blood endotoxin levels that result in a stereotyped inflammatory reaction with endothelial injury (1). Homeostatic imbalance may occur, as well as metabolic blockage in many organs, with a final outcome of multiple organ dysfunction syndrome and death in the majority of cases (2-3).

Chemotaxis produced by tissue injury focus attracts blood cells. Amongst them, neutrophils are of the highest number, followed by monocytes, which differentiate into macrophages in the tissues. These cells have the capacity to internalize inert particles, altered cells, microorganisms and parasites within the host (4).

The inflammatory response is generally caused by the action of components from the bacteria walls, like lipopolysaccharides (LPS) (from the gram-negative bacteria) or teichoic acid (from the gram-positive) (5-7).

Cell stimulation with LPS, either *in vivo* or *in vitro*, promote the liberation of various substances, including cytokines, prostaglandins, nitric oxide (NO), superoxide anion and pro-coagulative factors (8-10).

The parenteral administration of LPS mimics the generalized defense reaction of the organism to infections, fever, anorexia and acute-phase protein induction in the liver (11). It also induces blood leucocyte migration to the infectious/inflammatory site. Lungs are very sensitive to the effects of LPS, followed by the liver, intestine and kidneys (12). The application of LPS therefore works as an adequate model for studying the physiological alterations during bacterial infections, as it reproduces many of the clinical symptoms observed in patients with gram-negative bacteria septicemia (13).

According to Conway and René (14), obesity may debilitate the organism, completely modifying some vital functions like cardiac, pulmonary, endocrine and immune.

The immunological modifications that occur due to obesity affect the immune response as a whole, altering both humoral (mainly the antibodies secretion) and cell-mediated (specially the recruiting of leucocytes and lymphocytary subpopulations) immunity, as well as the proliferation of lymphocytes in response to mitogens (15).

Even having the studies exhaustively proved the proinflammatory reaction in conditions like obesity, insulin resistance and atherosclerosis, there are evidences that obese individuals show impairment of innate immune response, including the inflammatory response, when facing an infectious process (16,17).

Pathogen recognition and the consequent secretion of inflammatory mediators by the innate immune system cells are critical factors for the elaboration of an effective inflammatory response with consequent pathogen elimination. Dysfunctions in the inflammatory response of innate immunity cells may thus increase the risk and the gravity of infections (16).

The objective of this study will be to verify immunological modifications that may be related to endotoxemia and obesity, analyzing a innate immune response. Considering that the lung is the first organ to be hit by the endotoxemia, it turns out to be of extremely importance the realization of experimental works aiming to investigate the alveolar macrophages functions in this condition.

## Methods

### Animals and experimental groups

Male Wistar rats (n=40) with 21 days of age were used. The animals were maintained in a temperature of  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , in a 12-hour light/dark cycle (with the lights on at 6 o'clock), receiving water and rations *ad libitum*. This study was approved by the Federal University of Pernambuco Animal Experimentation Committee (CEEA/UFPE) and followed the ethical recommendations of the Brazilian Animal Experimentation College (COBEA).

The experimental groups were divided according to the diet offered to them. The standard diet group (SD) was fed with the bioterium standard diet: Labina<sup>®</sup> - Purina do Brasil S.A. (n=20), whereas the hyperlipidic diet group (HD) was fed with a hyperlipidic diet (n=20).

After 18 weeks of consumption of the diet, when the animals were with 147 days of age, half the rats in each group were subdivided into endotoxemic and non-endotoxemic. To obtain the endotoxemic groups, animals received intraperitoneal injection of LPS (*Escherichia coli* serotype, 055: B5, Sigma), at a dose of 1mg/kg body weight. The other groups received the same way, 0.9% NaCl. Twenty-four hours after LPS administration was collected bronchoalveolar lavage (BAL) of study animals.

### Diets

The standard diet was made of a commercial ration for rats, which had (per kilogram) 23.0% of proteins, 63.0% of carbohydrates and 4.0% of lipids, with 2.75

Kcal/g. The hyperlipidic diet consisted of a mix of hypercaloric food, containing Labina®, roasted peanuts, milk chocolate and cornstarch cookies, on a 3:2:2:1 ratio, respectively, with 17.93% proteins, 47.18% carbohydrates, 24.50% lipids with 4.81 Kcal/g. These ingredients were milled, mixed and offered in the form of pellets.

#### Body weight

The animals' body weight was registered using an electronic digital scale (Marte S-4000) with capacity for 4000g and sensitivity of 0.1g.

#### Total and differential leukocyte count in blood

The tips of the tails of anesthetized animals were cut with a scalpel, and 0.2 mL of blood was collected in glass tubes containing 3% EDTA. Total leukocyte counting was done in a Neubauer counting chamber. The differential counting was done using blood smear slides, with the same methodology as that for Bronchoalveolar lavage (BAL).

#### Bronchoalveolar lavage

The Bronchoalveolar lavage was done according to the technique described by De Castro et al. [19]. The animals were anesthetized with a solution of 0.5% chloralose and 12.5% uretana, 1mL/100g (intraperitoneal). In the tracheostomy procedure a plastic cannula was inserted, attached to a syringe containing 0.9% NaCl. Various aliquots were injected and collected in tubes (falcon, Sigma). Approximately 30mL BAL per animal was obtained.

The bronchoalveolar lavage was centrifuged at 1500 rpm during 15 minutes. The resulting precipitated was resuspended in a culture medium (RPMI 1640, Gibco® - Invitrogen Corporation), supplemented with fetal bovine serum (3%, Gibco® - Invitrogen Corporation) and antibiotics (penicillin 100U/mL and streptomycin 100µg/mL, Sigma-Aldrich, SP Brasil).

#### Total and differential leukocyte count in bronchoalveolar lavage fluid

The total leukocyte count in the BAL fluid was analyzed in a Neubauer counting chamber connected to a light microscope. The samples were diluted 1:20 in 3% glacial acetic acid and methylene blue.

For differential leukocyte counting in the BAL fluid, slides were made using samples that were diluted in 0.9% NaCl and cytocentrifuged. The slides were fixed, stained (Kit Panótico Rápido LB – Laborclin Ltda ®), and examined using a light microscope equipped with an immersion lens. The different types of white globules were quantified by an electronic counter.

#### Culture of alveolar macrophages

The alveolar macrophages were cultivated as described by De Castro et al. [19]. The cells were resuspended in RPMI-1640 culture medium (Sigma® Chemical Company, St. Louis, MO), supplemented with 10% fetal bovine serum, 100U/mL penicillin and 100 mg/mL streptomycin. The alveolar macrophages were then transferred to Falcon™ 6-well 35mm culture plates, 2mL of the suspension in a 2.0 x

$10^6$  cells for 2mL of medium being dispensed in each well. The cells that did not adhere were removed with RPMI 1640.

#### Measurement of superoxide

The superoxide anion was induced by the addition of Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, Sigma<sup>®</sup>) in a 2 $\mu$ g/mL Hanks solution (HBSS Ginc<sup>®</sup>-Invitrogen Corporation). Two discontinuous analysis systems were prepared, with 1 evaluation each hour, for a total period of 2 hours. The specificity of the assay was guaranteed by the addition of superoxide dismutase (SOD) of bovine erythrocytes (Sigma<sup>®</sup>) containing 3000 U/mg of protein in final solution of 3mg/mL of distilled water. Macrophages in culture were used in order to prepare these systems ( $2 \times 10^6$  cells per 2mL of RPMI 1640), 29 mL of SOD being added to one of them. The systems were maintained in a greenhouse at 37°C, with humid atmosphere, 5% of CO<sub>2</sub> for 10 minutes (SOD activation). Cytochrome c type IV of mitochondria from the heart of a horse (30mg/mL in HBSS,  $2.4 \times 10^{-3}$  M Sigma<sup>®</sup>) was added to the cells in order to quantify the O<sub>2</sub> formation.

Samples were extracted from each system, the first aliquot corresponding to time “zero” and the subsequential samples were collected on regular time intervals. Spectrophotometric measurements were done on 550nm in order to determine the degree of cytochrome c reduction of the supernatants. The O<sub>2</sub><sup>-</sup> curve was obtained by the conversion of the absorbance values to O<sub>2</sub><sup>-</sup>/min nanomoles, using the formula:  $[O_2^-] = 205.49 \times \text{absorbance value} \times \text{collected sample volume}$  [20].

### Nitric oxide (NO) assay

Nitric oxide liberation was measured through Griess Reaction colorimetric quantitative assay. The production of NO was determined by macrophages supernatant culture, according to the method described by Feder and Laskin [21]. After 24 hours of in vitro stimulus with LPS (10 µg/mL), the macrophages – both the stimulated and the non-stimulated with LPS – were evaluated for NO liberation. The absorbance of the azochromophore was measured at 550 nm.

### Cell viability assay

Cellular viability was evaluated through mitochondrial reduction of 3 - [4, 5-dimethylthiazol-2-il] -2, 5-difeniltetrazolium brometo (MTT) to formazan crystals, as described by AKAO et al. (22). The alveolar macrophages were incubated with MTT (0.5 mg/mL) in complete medium (200 µl/well) for 60 minutes at 37°C in 5% of CO<sub>2</sub>. After this period the medium is removed and DMSO with ethanol are added in a 1:1 ratio, in 200 mL of volume. The supernatant is then collected from the culture plates and the absorbance is read in a ELISA reader with 550 nm filter. The cell viability percentage is expressed by the formula: Cell viability = (Treated cells absorbance/Control cells absorbance) x 100%.

### Adhesion index (AI)

The adhesion index evaluation is done 1 hour after the macrophages culture. Supernatant aliquots are extracted for non-adherent cells counting in 1/10 trypan blue

dilutions, being read and counted in a hemocytometer right after. The adhesion index was calculated by using the formula described by De La Fuente et al. (23):  $IA = 100 - \frac{\text{non-adherent cells/mL} \times 100}{\text{initial number of cells/mL}}$ .

#### Statistical analysis

In order to compare the groups, Student's t-test was used for parametric data and the Mann-Whitney test for the non-parametric. Significance level was defined as  $p < 0.05$ . The analysis of data was performed using sigma Stat 2.0 software.

## Results

After 18 weeks of diet administration, the animals that received the hyperlipidic diet (HD) showed body weight difference in comparison to the ones that fed on standard diet (SD). Figure 1 shows the body weight gain of the rats in the final period of diet administration. The weight of the rats from the HD group was higher than of the rats from the SD group (SD=383.80 ± 12.86 g; HD=437.45 ± 8.15; p=0.009).

The comparison between the SD and HD groups showed no statistical difference significant, SD = 11.8 ± 1.5; DH = 8.2 ± 1.1, despite the tendency of the obese lower values of leukocytes. The group that received standard diet and was gone to Submit endotoxemia had significantly higher total number of leukocytes in relation to the HD group, an increase which reached 30%. SDE = 19.6 ± 3.1 (P =0.035), HDE = 13.9 ± 2.0.

In relation to neutrophils, groups receiving LPS exhibited greater absolute number of these cells, both fed on standard diet and those fed a diet rich in lipids. In comparing these two groups endotoxemic, the increase resulting infection was significantly lower in the obese group. However, when compare the two groups who did not receive LPS (SD and HD), no significant difference (Table 1).

As for the total leukocytes number in the LBA, there was no difference between the groups, but the HD group showed higher values (SD= 107.5 ± 3.8; HD= 120.0 ± 7.3). The endotoxemia caused an increase in the total leukocytes number in both groups (SDE= 154.5 ± 18.9; HDE= 177.5 ± 9.5).

Endotoxemia also produced an increase in macrophages on both groups (SD= 98.0 ±3.2 and SDE= 139.0± 11.2; p= 0.014; HD= 93.0 ±6.2 and HDE= 137.0±6.7; p= 0.001).

The number of neutrophils also increased in the endotoxemia groups when compared to their controls (SD=  $7.0 \pm 1.2$  e SDE=  $29.0 \pm 3.2$ ;  $p= 0.001$ ; and HD=  $14.0 \pm 4.4$  e HDE=  $29.0 \pm 3.9$ ;  $p= 0.001$ ). In relation to the groups that did not receive LPS, the HD group showed a significant increase in neutrophils number in comparison to the SD group ( $p=0.028$ ) (Table 2).

In all of the studied groups it was observed that at least 80% of the cells remained viable. The adhesion index was expressed in percentage (%). Even with the tendency to lower values in the obesity groups, there was no significant difference between the groups (SD=  $93.64 \pm 1.30$ ; SDE=  $94.11 \pm 1.80$ ; HD=  $88.10 \pm 2.14$ ; HDE=  $92.33 \pm 1.42$ ) (Figure 2).

The superoxide production in macrophages culture supernatant was reduced ( $P=0.001$ ) in HD animals in relation to the SD animals, 2 hours after the macrophages stimulus with PMA. At the first hour, there was a difference in superoxide liberation between the groups (SD=  $0.94 \pm 0.72$  and HD =  $0.65 \pm 0.10$ ,  $p=0.036$ ). On the second hour, superoxide liberation continued altered when comparing the groups, being higher in the HD group (SD=  $1.18 \pm 0.09$ ; HD=  $0.93 \pm 0.08$ ,  $p=0.0023$ ).

Endotoxemia only caused an increased superoxide production in the SDE group, in comparison to the SD group at the first hour (SD=  $0.94 \pm 0.72$  and SDE =  $1.29 \pm 0.17$ ,  $p=0.042$ ) and this increase persisted on the second hour (SD=  $1.18 \pm 0.09$  and SDE =  $1.74 \pm 0.22$ ,  $p=0.031$ ). Amongst the endotoxemic groups, the HDE ( $0.90 \pm 0.08$ ) showed reduced values in comparison to the SDE ( $1.29 \pm 0.17$ ) at the first hour – this reduction also continuing on the second hour (HDE=  $1.33 \pm 0.06$  and SDE =  $1.74 \pm 0.22$ ,  $p=0.004$ ) (Figure 3).

In the non-stimulated (with LPS *in vitro*) macrophages culture supernatant there was an alteration in the endotoxemic animals NO production, a higher production

occurring in the SDE ( $7.35 \pm 0.87$ ) group in relation to the SD ( $5.77 \pm 0.28$ ) group,  $p=0.031$ . On the other hand, we could observe in the HDE group a reduction in the NO production (HD= $5.19 \pm 0.32$  and HDE =  $4.23 \pm 0.24$ ,  $p=0.030$ ).

In the macrophages culture supernatant stimulated with LPS *in vitro* there was a reduction ( $p>0.05$ ) in the NO production in the HD animals when compared to the SD (SD =  $8.14 \pm 0.34$ ; HD=  $6.57 \pm 0.49$ ,  $p= 0.011$ ). We could also observe a higher production in the SDE ( $10.38 \pm 0.80$ ) group when compared to the SD ( $8.16 \pm 0.34$ ) group (Table 3).

## Discussion

Obesity is associated with immune system compromising. Clinical findings point out to a higher susceptibility of obese individuals to the development of infectious diseases and cancer (24,25).

Hyperlipidic and hypercaloric diets have been used with success to reproduce experimental models of obesity. Some studies demonstrated that rats that underwent palatable hyperlipidic diet showed, from three weeks on, an increase in retroperitoneal and epididymal adipose tissue quantity (26). In this research it was possible to observe that rats that underwent hypercaloric and hyperlipidic diet for a prolonged time showed higher weight gain, in comparison to rats that received standard diet.

Some authors found results similar to ours, like body weight gain in rats that fed on hyperlipidic diet (26, 29, 30). Some other studies, however, presented decrease in body weight in the group fed with hyperlipidic diet (18, 31).

There is divergence between the results of different works found in literature, fact that can be due to the period the rats maintained in an established diet and the right moment of the beginning of the treatment (26, 27).

The immunological processes involved in the organism defense are affected by nutritional state (28). According to Alves (29), the immunological repercussions added to the complex interaction between them may induce the obese organism to modify its immune response, both innate and acquired. Along with that, evidences of studies with animals defend that fat-rich diets, particularly saturated fat, impairs that response by affecting the immune cells (macrophages, dendritic cells and T lymphocytes) activity (30).

At the present moment, however, few studies evaluated the lung inflammatory response in obese animals. Based on the existing data in literature it can be said that our research is one of the existing few that evaluate diet-induced obesity in rats that underwent endotoxemia.

Studies have shown that macrophages and neutrophils contribute to the physiopathology of the lung lesion induced by the LPS (4,31). The macrophages are normally present in the tissues and the neutrophils, in response to LPS stimulus, migrate to the lungs (5).

Even though recent data demonstrated that the hyperlipidic ration consumption results in higher persistence and graveness of bacterial infections and that this is associated with alveolar macrophages inflammatory response suppression (32), there are few studies at the moment evaluating the obesity effect induced by the utilization of this kind of diet on the function of these cells in endotoxemia conditions.

The measurement of oxidant substances produced by macrophages is considered a sensitive and convenient way of evaluating its function (33,34). In order to quantify the superoxide produced by the alveolar macrophages in culture, Phorbol 12-myristate 13-acetate (or PMA) was used as a stimulus. This product works as an antigenic stimulus, as it activates the NADPH oxidase via protein kinase C and unleashes a respiratory explosion. This stimulus may generate other reactive radicals, so that the specificity of the superoxide production is done through the utilization of superoxide dismutase (SOD) as a negative control (34).

In this study it was demonstrated that obesity induced a reduction in the superoxide production in adult animals. De la Puerta et al. (35) also demonstrated in their study a reduction in the superoxide production by macrophages in obese animals. Besides that, our results disagree with data from other experimental researches

describing that a lipid-rich diet caused an increase in superoxide production (36). Those different results may be justified by the utilization of different diets, feeding time and the animals' age.

In this study, the superoxide production in alveolar macrophages culture supernatant grew higher from the 1<sup>st</sup> to the 2<sup>nd</sup> hour of incubation in all of the evaluated groups. This increase is justified by previous studies about the liberation kinetics for this radical (34).

Endotoxemia caused an increase in the  $O_2^-$  production and this increase was less strong in the obese groups, therefore demonstrating that diet-induced obesity resulted in impaired microbicidal function of alveolar macrophages. As a consequence, these macrophages from obese animals did not respond with the same intensity or in the same way of those originated from normal animals, thus favoring the development of infectious processes.

The NO increase in the endotoxemia models induced by LPS is related to the organism response when facing this stimulus (37). In our study the nitrite dosages in the alveolar macrophages culture occurred 24 hours after the injection of LPS. According to Tracey et al. (38), the nitric oxide production in endotoxemia is significantly increased in murino model after 20 hours of LPS injection and is related to the increase in the inducible NO (iNOS) enzyme expression.

Obesity also caused a reduction in the NO production in the alveolar macrophages culture. The produced NO is one of the most efficient and fastest defense mechanisms against infections (39). The macrophages from obese rats showed a reduction in NO synthesis when compared to control animals. It can therefore be observed that the NO production was impaired by the utilization of hyperlipidic diet.

Previous studies also found a reduction in the nitric oxide production in rats that fed on hyperlipidic ration (39,40).

There are not, in literature, researches relating obesity to the adhesion index. The results obtained in this study demonstrated that the animals from the obese groups had a tendency to lower adhesion indexes when compared to control animals. Considering that the adhesion capacity is an essential cellular function, as it is the first step in the phagocytosis process (23,40), we observed that it was impaired in this obesity model.

These results suggest that hyperlipidic ration consumption may harm the microbicidal capacity of alveolar macrophages in response to bacterial products stimuli and, consequently, to elaborate an adequate inflammatory response. Along with that, the productions of NO and O<sub>2</sub><sup>-</sup> are fast and efficient mechanisms in the defense against infections. This reduction in macrophages functionality is even more impaired when obesity is associated with endotoxemia situations.

## Conclusions

In our experimental conditions, obesity induced by hyperlipidic and hypercaloric diet compromises some phagocytic functions. Reduction in the nitric oxide and superoxide anion production by alveolar macrophages in response to obesity demonstrates the oxidant activity impairment in these cells. This decrease in alveolar macrophages microbicidal capacity and the evidence that this state worsens when in an endotoxemia situation result in inadequate immune response when facing pathogenic microorganisms and their products with consequent damage from infectious processes.

## Acknowledgements

This work was supported by Foundation of Science and Technology of Pernambuco State/FACEPE and The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq)/Brazil.

## References

- (1) Hewett JA, Roth RM. Hepatic and extrahepatic pathobiology of bacterial lipopolysaccharide. *Pharmacol Rev* 1993;45:382-411.
- (2) Hill AG, Hill GL. Metabolic response to severe injury. *Br J Surg, Bristol*, v85, n7, p884-90, 1998.
- (3) Pereira Júnior GA, Marson F, Abeid M, Ostini FM, Souza SH, Basile-Filho A. Fisiopatologia da sepse e suas implicações terapêuticas. *Medicina, Ribeirão Preto*, 31: 349-362, 1998.
- (4) Sunil VR, Connor AJ, Zhou P, Gordon MK, Laskin JD, Laskin DL. Activation of adherent vascular neutrophils in the lung during acute endotoxemia. *Respir Res* 2002;3(1):21.
- (5) Glauser MP, Heumann D, Baumgartner JD, Cohen J. Pathogenesis and potential strategies for prevention and treatment of septic shock: an update. *Clin Infect Dis* 1994;18:205-16.
- (6) Sands KE, Bates DW, Lanken PN, Graman PS, Hibberd PL, Kahn KL, Parsonnet J, Panzer R, Orav EJ, Snyderman DR. Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. Academic Medical Center Consortium Sepsis Project Working Group. *Jama*, v278, n3, p234-40, 1997.

- (7) Salomao R, Brunialti MK, Kallas EG, Martins PS, Rigato O, Freudenberg M. Lipopolysaccharide-cell interaction and induced cellular activation in whole blood of septic patients. *J Endotox Res* 2002; v8, n5, p371-9.
- (8) Zielinski T, Wachowicz B, Saluk-Juszczak J, Kaca W. The generation of superoxide anion in blood platelets in response to different forms of proteus mirabilis lipopolysaccharide: effects of staurosporin, wortmannin, and indomethacin. *Thromb Research*. 2001; 103:149-55.
- (9) Cerwinka WH, Cooper D, Kriegelstein CF, Feelisch M, Granger DN. Nitric oxide modulates endotoxin-induced platelet-endothelial cell adhesion in intestinal venules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002a; 282(3):H1111-17.
- (10) Cerwinka WH, Cooper D, Kriegelstein CF, Ross CR, McCord JM, Granger DN. Superoxide mediates endotoxin-induced platelet-endothelial cell adhesion in intestinal venules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002b; 284:H535-41.
- (11) Plata-Salamán CR. Anorexia during acute and chronic disease. *Nutrition* 1996;12:69-78.
- (12) Welbourn CRB, Young Y. Endotoxin, septic shock and acute lung injury: neutrophils, macrophages and inflammatory mediators. *Br J Surg* 1992;79:998-1003.

- (13) Luchi M, Morrison DC. Comparable endotoxic properties of lipopolysaccharides are manifest in diverse clinical isolates of Gram-negative bacteria. *Infect Immun* 2000;68:1899-1904.
- (14) Conway B, René A. Obesity as a disease: no lightweight matter. *Obes Rev* 2004;5, n.3, p.145-151,.
- (15) Marcos A, Nova E, Montero A. Changes in the immune system are conditioned by nutrition. *Eur J Clin Nutr* 2003;57:66-9.
- (16) Karlsson EA, Beck MA. The burden of obesity on infectious disease. *Experimental Biology and Medicine* 2010;235(12):1412-24.
- (17) Schmidt MI, Duncan BB, Azevedo e Silva G, Menezes AM, Monteiro CA, Barreto SM, et al. Chronic non-communicable diseases in Brazil: burden and current challenges. *Lancet* 2011;377(9781):1949-61.
- (18) Estadella D, Oyama LM, Dâmaso AR, Ribeiro EB, Oller Do Nascimento C.M. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. *Nutrition* 2004;20:218-24.
- (19) De Castro CMMB, Bureau MF, Nahori MA, Dumarey CH, Vargaftig BB, Bachelet M. Modulation by dexamethasone of phospholipase A<sub>2</sub> activities in endotoxemic guinea pigs. *J Appl Physiol* 1995;79:1271-7.

(20) Johnston Jr RB. Measurement of O<sub>2</sub>- secreted by monocytes and macrophages. *Methods in enzymology* 1984;105:365-9.

(21) Feder LS, Laskin DL. Regulation of hepatic endothelial cell and macrophage proliferation and nitric production by GM-CSF, M-CSF and IL-1 b following acute endotoxemia. *J Leukoc Biol* 1994;55:507-13.

(22) Akao N, Sugimoto N, Thu AM, Kondo K, Tsuda Y, Fujita K. A tetrazodium dye (MTT) assay for testing Larval viability using scond-stage larvae of *toxocara canis*. *Jpn J Parasitol* 1995;44:1-5.

(23) De La Fuente M, Del Rio M, Ferrandez MD, HERNANZ A. Modulation of phagocytic function in murine peritoneal macrophages by bombesin, gastrin-releasing peptide and neuromedin. *C Immunol* 1991;73:205-11.

(24) Cantürk Z, Cantürk NZ, Cetinarslan B, Utkan NZ, Tankun I. Nosocomial infections and obesity in surgical patients. *Obes Surg* 1999;9:229-34.

(25) Calle EE, Kaaks R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. *Nat Rev Cancer*. v.4, p.579-591, 2004.

(26) Duarte ACGO, Fonseca DF, Manzoni MSJ, Soave CF, Sene-Fiorese M, Dâmaso AR, Cheik NC. Dieta hiperlipídica e capacidade secretória de insulina em ratos. *Rev Nutr* 2006;19(3):341-8.

- (27) Mendonça AC, Carneiro EM, Bosqueiro, Jr, Crepaldi-Alves SC, Boscher, AC. Development of the insulin secretion mechanism in fetal and neonatal rat pancreatic B-cells: response to glucose, K<sup>+</sup>, theophylline, and carbamylcholine. *Braz J Med Biol Res* 1998;31(6):841-6.
- (28) Womack J, Tien PC, Feldman J, Shin JH, Fennie K, Anastos K, Cohen MH, Bacon MC, Minkoff H. Obesity and immune cell counts in women. *Metab. Clin. and Expe* 2007;56:998–1004.
- (29) Alves MNR. Os efeitos da obesidade na resposta imune. *Ver. Bras. Nutr. Clin* 2006;21(4):316-9.
- (30) Wolowczuk I, Verwaerde C, Viltart O, Delanoye A, Delacre M, Pot B, Grangette C. Feeding our immune system: impact on metabolism. *Clin dev Immunol* 2008;639803:1-19.
- (31) Williams JH Jr, Patel SK, Hatakeyama D, Arian R, Guo K, Hickey TJ, Liao SY, Ulich TR. Activated pulmonary vascular neutrophils as early mediators of endotoxin-induced lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1993;8:134-44.
- (32) Amar S, Zhou QD, Shaik-dasthagirisaheb Y, Leeman S. Diet-induced obesity in mice causes changes in immune response and bone loss manifested by bacterial challenge. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2007;104(51):20466-71.

- (33) Mayo LA, Curnutte JT. Kinetic microplate assay for SP by neutrophils and other phagocytic cells. *Methods Enzymol* 1990;186:567-75.
- (34) De Castro CMMB, Manhães-De-Castro R, Medeiros AF, Queirós-Santos A, Ferreira e Silva WT, Lima Filho JL. Effect of stress on the production of  $O_2^-$  in alveolar macrophages. *J. Neuroimmunol* 2000;108(1/2):68-72.
- (35) de La Puerta R, Marquez-Martin A, Fernandez-Arche A, Ruiz-Gutierrez V. Influence of dietary fat on oxidative stress and inflammation in murine macrophages. *Nutrition*. 2009;25:548–54.
- (36) Yaqoob P, Calder P. Effect of Dietary Lipid manipulation upon inflammatory mediator production by murine macrophage. *Cell Immunol* 1995;163:120–8.
- (37) Hollenberg SM, Cunnion RE, Zimmerberg J. Nitric oxide synthase inhibition reverses arteriolar hyporesponsiveness to catecholamines in septic rats. *Am J Physiol* 1993;264(2):660-3.
- (38) Tracey WR, Tse J, Carter G. Lipopolysaccharide-induced changes in plasma nitrite and nitrate concentrations in rats and mice: pharmacological evaluation of nitric oxide synthase inhibitors. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;272(3):1011-5.
- (39) Borges M. C. Efeito da ração hiperlipídica e do extrato aquoso de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) sobre a composição corporal e sobre a resposta inflamatória de

macrófagos peritoneais de ratos Wistar [Dissertação de mestrado]. Univ. de São Paulo, São Paulo, 2011.

(40) Porto SMMS. Efeito do treinamento físico moderado em parâmetros metabólicos e imunológicos de ratos adultos obesos [Tese de doutorado]. Univ. Federal de Pernambuco, Recife, 2011

Figure 1

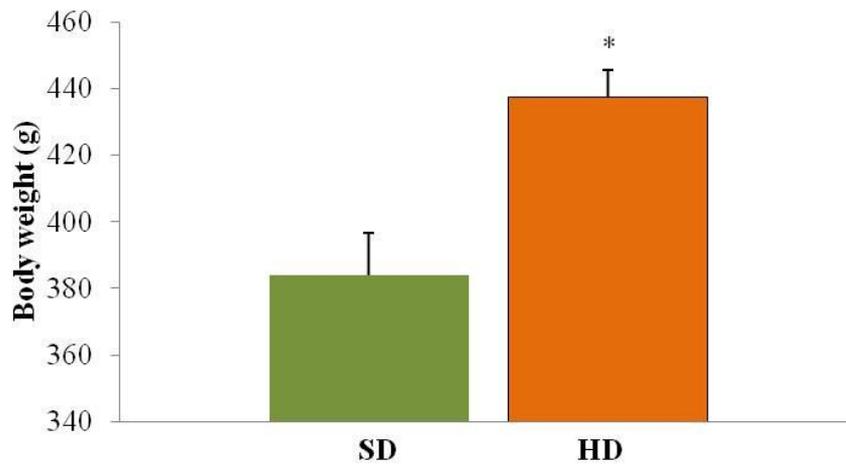


Table 1

Table 1 – Total and differential leukocytes number in the blood.

GRUPOS	Total	Monocytes		Neutrophilis	
	leukocytes	Absolute values	Relative values	Absolute values	Relative values
	( $10^3/\text{mm}^3$ )	( $10^3/\text{mm}^3$ )	(%)	( $10^3/\text{mm}^3$ )	(%)
SD	11.8 ± 1.5	0.85 ± 0.22	6.3	2.4 ± 0.27	22.3
SDE	19.6 ± 3.1*	0.81 ± 0.24	4.1	11.16 ± 2.29*	54.4
HD	8.2 ± 1.1	0.48 ± 0.14	5.4	2.74 ± 0.46	31.8
HDE	13.9 ± 2.0	0.47 ± 0.09	3.9	9.13* ± 1.9**	62.4

Data are expressed as mean ± SEM.

\* p < 0,05 in the comparison between the SD and HD groups.

\*\*p < 0,05 in the comparison between the SD and SDE groups

\*\*\* p < 0,05 in the comparison between the HD and HDE groups.

Table 2

Table 2 – Total and differential leukocytes number in the BAL

GRUPOS	Total	Macrophage		Neutrophilis	
	leukocytes	Absolute values	Relative values	Absolute values	Relative values
	(10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	(10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	(%)	(10 <sup>3</sup> /mm <sup>3</sup> )	(%)
SD	107.5 ± 3.8	98 ± 3.2	91.0	7.0 ± 1.2*	6.0
SDE	154.5 ± 18.9*	139 ± 11.2*	80.0	29.0 ± 3.2	17.0
HD	120.0 ± 7.3	93 ± 6.2	78.0	9.0 ± 4.4***	16.0
HDE	177.5 ± 9.5**	137 ± 6.7**	78.0	29.0 ± 3.9**	16.0

Data are expressed as mean ± SEM.

\* p <0,05 in the comparison between the SD and HD groups.

\*\*p <0,05 in the comparison between the SD and SDE groups

\*\*\* p <0,05 in the comparison between the HD and HDE groups.

Figure 2

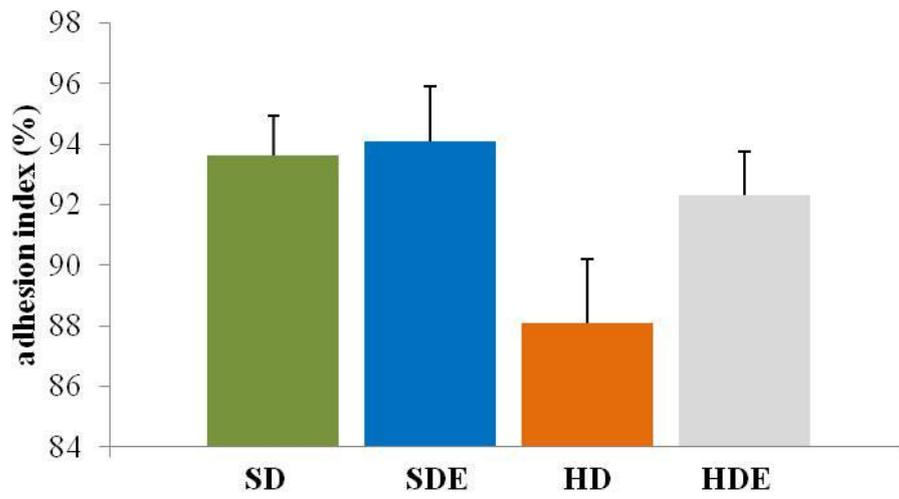


Figure 3

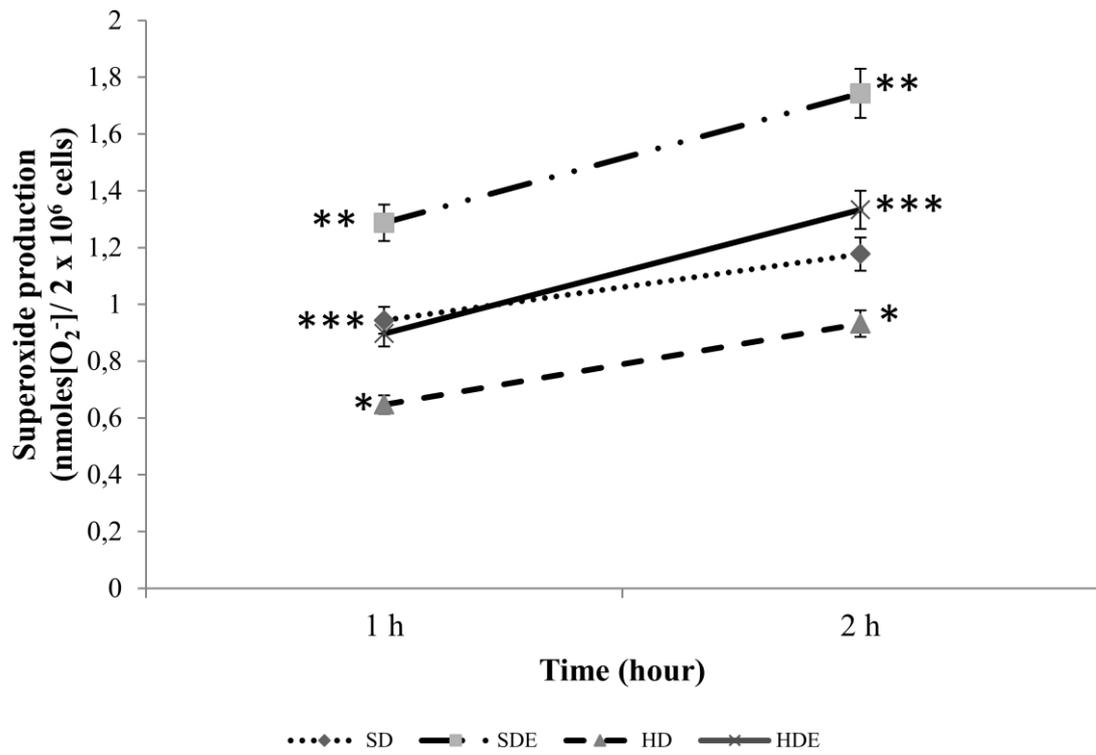


Table 3

Table 3 – Nitric oxide production in culture supernatants of alveolar macrophages.

Groups	NO production non-stimulated with LPS (mM/mL)	NO production stimulated with LPS (mM/mL)
SD	5,77 ± 0,28	8,14 ± 0,34
SDE	7,35 ± 0,87**	10,38 ± 0,80**
HD	5,19 ± 0,32	6,57 ± 0,49*
HDE	4,23 ± 0,24***	6,20 ± 0,57

Data are expressed as mean ± SEM.

\* p < 0,05 in the comparison between the SD and HD groups.

\*\*p < 0,05 in the comparison between the SD and SDE groups

\*\*\* p < 0,05 in the comparison between the HD and HDE groups.

### Legends for the figures

Figure 1 – Effect of high-fat diet on body weight after 18 weeks of consumption of the respective diets. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  in the comparison between the SD and HD groups.

Figure 2– Adhesion index for alveolar macrophages. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  in the comparison between the groups.

Figure 3 – Superoxide production after the stimulation with PMA. The superoxide was measured in alveolar macrophages culture supernatant at 1h and 2h periods. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  when comparing the SD and HD groups. \*\*  $p < 0.05$  when comparing the DP and DPE groups. \*\*\*  $p < 0.05$  when comparing the DPE and groups.

# CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Utilizando modelo de obesidade induzida por dieta hiperlipídica, nossos resultados nos permitem concluir que:

A ingestão por período prolongado de ração hiperlipídica, mesmo na ausência de hiperfagia, foi capaz de influenciar no peso e na evolução ponderal dos animais, resultando em aumento da gordura corporal. Assim podemos afirmar que a dieta hiperlipídica utilizada foi útil em promover obesidade visceral nos ratos, uma vez que a gordura dessa região foi superior nos ratos alimentados com a dieta hiperlipídica.

Também se observou um efeito negativo da obesidade sobre o sistema imune ficando evidente quando os animais obesos foram incapazes de estimular de forma eficiente a produção do ânion superóxido e de óxido nítrico pelos macrófagos alveolares.

A endotoxemia levou a formação de uma resposta inflamatória pulmonar em ratos adultos demonstrada pelo aumento do recrutamento de neutrófilos para o pulmão.

Neste modelo de obesidade, a endotoxemia contribuiu de forma intensa para maior prejuízo na resposta imunológica do organismo, podendo ser demonstrado pela redução na capacidade microbicida de macrófagos alveolares, levando a prejuízo na atividade oxidante e conseqüentemente, dano na resposta imune.

Essa comprovação de que esse estado se agrava em situação de endotoxemia fortificam a hipótese de que a obesidade reduz a capacidade dos macrófagos alveolares em elaborar uma resposta microbicida adequada frente a organismos patogênicos e seus produtos com conseqüente prejuízo frente aos processos infecciosos.

## REFERÊNCIAS

---

**REFERÊNCIAS**

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H; PILLAI S. Células e tecidos do Sistema Imunológico. In: \_\_\_\_\_ **Immunologia Celular e Molecular**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008.
- AKAO, N.; SUGIMOTO, N.; THU, A. M.; KONDO, K; TSUDA, Y; FUJITA K. A tetrazodim dye (MTT) assay for testing larval viability using second-stage larvae of *Toxocara canis*. **Jpn J Parasitol**. v. 44, p. 1-5, 1995.
- ALDINUCCI, C.; GARCIA, J. B.; PALMI, M. The effect of strong magnetic field on lymphocytes. **Bioelectromagnetics**. v. 24, p.109-117, 2003.
- ALVEZ, M. N. R. Os efeitos da obesidade na resposta imune. **Rev Bras Nutr Clin**. v. 21, n. 4, p.316-319, 2006.
- AMAR, S.; ZHOU, Q. D.; SHAIK-DASTHAGIRISAHEB, Y.; LEEMAN, S. Diet-induced obesity in mice causes changes in immune response and bone loss manifested by bacterial challenge. **PNAS**. v. 104, n. 51, p. 20466-20471, 2007.
- ANEJA, A.; EL-ATAT, F.; MCFARLANE, S. I; SOWERS, JR. Hypertension and obesity. **Recent Prog Hormone Res**. v. 59, p. 169-205, 2004.
- BABIOR, B. M. SUPEROXIDE: A TWO-EDGED SWORD. **Braz J Med**. v. 30, p. 141-155, 1997.
- BATISTA FILHO, M.; RISSIN, A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. **Cad Saúde Pública**. v. 1, p. 181-191, 2003.
- BAUERLE, P. A.; RUPEC, R. A.; PAHL, H. L. Reactive oxygen intermediates as second messengers of a general pathogen response. **Pathol Biol**. v. 44, n. 1, p. 29-35, 1996.
- BELTOWSKI, J. Leptin and atherosclerosis. **Atheroscler**. v. 189, p. 47-60, 2006.
- BERG, A. H., SCHERER, P. E: Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. **Circ Res**. v. 96, n. 9, p. 939-949, 2005.

- BERMUDEZ, O. I.; TUCKER, K. L. Trends in dietary patterns of Latin American populations. **Cad Saúde Pública**. v.1, p.87-99, 2003.
- BLAIR, S. N.; HORTON, E.; LEON, A. S.; LEE, I. M.; DRINKWATER, B. L.; DISHMAN, R. K. L. Physical activity, nutrition, and chronic disease. **Med Sci Sports Exerc**. v. 28, p. 335-349, 1996.
- BORELLI, P.; BLATT, S. L.; ROGERO, M. M.; FOCK, R. A. Haematological alterations in protein malnutrition. **Rev Bras hematol hemoter**. v. 26, p. 49-56, 2004.
- BOUCHARD, C.; PÉRUSSE, L. Genetics of obesity. **Ann Rev Nutr**. v. 13, p. 337-354, 1993.
- BRUNDTLAND, G. H. Nutrition and infection: malnutrition and mortality in public health. **Nutr Rev**. v. 58, p. 1-4, 2000.
- CALLE, E. E.; THUN, M.J.; PETRELLI, J.M.; RODRIGUEZ, C.; HEATH, C.W. Body-mass index and mortality in a prospective cohort of US adults. **N Engl J Med**. v. 314, n. 15, p.1097-1105, 1999.
- CAVE, M. C.; HURT, R. T; FRAZIER, T. H.; MATHESON, P. J.; GARRISON, R. N.; MCCLAIN, C. J.; MCCLAVE, S.A. Obesity, inflammation and the potential application of pharmaconutrition. **Nutr Clin Pract**. v.23, n. 1, p.16-34, 2008.
- CERWINKA, W. H.; COOPER, D.; KRIEGLSTEIN, C. F.; FEELISCH, M.; GRANGER, D. N. Nitric oxide Modulates endotoxin-induced platelet-endothelial cell adhesion in intestinal Venules. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. v. 282, n. 3, p. H1111-H1117, 2002a.
- CERWINKA, W. H.; COOPER, D.; KRIEGLSTEIN, C. F.; ROSS, C. R.; MCCORD, J. M.; GRANGER, D. N. Superoxide mediates endotoxin-induced platelet-endothelial cell adhesion in intestinal venules. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**. v. 284, p. H535-H541, 2002b.
- CHANDRA, R. K.; KUTTY, K. M. Immunocompetence in obesity. **Acta Paediatr scand**. v. 69, p. 25-30, 1980.
- CHANDRA, R. K. Nutrition and the immune system: an introduction. **Am J Clin Nutr**. v. 66, n. 2, p. 460-463, 1997.

CHANDRAM, M.; PHILLIPS, S. A.; CIARALDI, T.; HENRY, R. R. Adiponectin: more than just another fat cell hormone? **Diabetes Care**. v.26, p.2442-2450, 2003.

CHOBAN, P. S.; HECKLER, R.; BURGE, J. C.; FLANCBAUM, L. Increased of nosocomial infections in obese surgical patients. **Am Surg**. v. 61, n. 11, p.1001-1005, 1995.

CHOBAN, P. S.; FLANCBAUM, L. The impact of obesity on surgical outcomes: A review. **J Am Coll Surg**. v. 185, n. 6, p. 593-603, 1997.

COBEA. Princípios éticos na experimentação animal. Disponível em: <http://www.cobea.org.br/>. Acesso em outubro de 2011.

COHN, Z. A. The activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy, and future. **J Immunol**. v. 121, n. 3, p. 813-816, 1978.

CONSIDINE, R. V.; SINHA, M. K.; HEIMAN, M. L.; KRIAUCIUNAS, A.; STEPHENS, T. W.; NYCE, M. R.; OHANNESIAN, J. P.; MARCO, C. C.; MCKEE, L. J.; BAUER, T. L.; CARO, J.F. Serum immunoreactive-leptin concentrations in normal-weight and obese humans. **N Engl J Med**. v. 334, p. 292-295, 1996.

CONWAY, B.; RENÉ, A. Obesity as a disease: no lightweight matter. **Obes Rev**. v. 5, n. 3, p. 145-151, 2004.

COTRAN, R. S., KUMAR, V. K., ROBBINS, S. L. Inflamação Aguda e Crônica. In: \_\_\_\_\_. **Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. 8 ed. **Rio de Janeiro: Elsevier**, 2010.

COUTINHO, J. G.; GENTIL, P. C.; TORAL N. A desnutrição e obesidade no Brasil: o enfrentamento com base na agenda única da nutrição. **Cad. Saúde Pública**. v. 2, p. 332-340, 2008.

CUNHA, N. V.; DE ABREU, S. B.; PANIS, C.; GRASSIOLLI, S.; GUARNIOER, F. A.; CECCHINI, R.; MAZZUCO, T. L.; PINGE-FILHO, P.; MARTINS-PINGE, M.C. Cox-2 inhibition attenuates cardiovascular and inflammatory aspects in monosodium glutamate-induced obese rats. **Life Sci**. v. 11, n. 87, p. 375-381, 2010.

CUNNINGHAM-RUNDLES, S.; MCNEELEY, D. F.; MOON, A. Mechanisms of nutrient modulation of the immune response. **J Allergy Clin Immunol.** v. 115, p. 1119-1128, 2005.

DÂMASO, A. **Nutrição e exercício na prevenção de doenças.** Rio de Janeiro: MEDSI; 2001.

DEMIREL, F.; BIDECE, A.; CINAZ, P.; CAMURDAN, M. O.; BIBEROGLU, G.; YESILKAYA, E.; HASANOGLU, A. Serum leptin, oxidized low density lipoprotein and plasma asymmetric dimethylarginine levels and their relationship with dyslipidaemia in adolescent girls with polycystic ovary syndrome. **Clin endocrinol.** v. 67, p. 129-134, 2007.

DAVIS, J. E.; GABLER, N. K.; WALKER-DANIELS, J.; SPURLOCK, M. E. Tlr-4 deficiency selectively protects against obesity induced by diets high in saturated fat. **Obesity.** v. 16, n. 6, p. 1248-1255, 2008.

DE CASTRO, C. M. M. B.; BUREAU, M. F.; NAHORI, M. A.; DUMAREY, C. H.; VARGAFTIG, B. B.; BACHELET, M. Modulation by dexamethasone of phospholipase A<sub>2</sub> activities in endotoxemic guinea pigs. **J Appl Physiol.** v. 79, p. 1271-1277, 1995.

DE CASTRO, C. M. M. B.; DE CASTRO, R. M.; ANDRADE, A. D.; BRANDT, C. T.; LPS bacteriano: um mediador de inflamação. **An Fac Méd Univ Fed Pernamb.** v. 42, n. 2, p. 78-83, 1997.

DE CASTRO, C. M. M. B.; DE CASTRO, R. M.; MEDEIROS, A. F.; QUEIROS SANTOS, A.; FERREIRA E SILVA, W. T.; LIMA FILHO, J. L. Effect of stress on the production of O<sub>2</sub><sup>-</sup> in alveolar macrophages. **J. Neuroimmunol.** v. 108, n. 1/2, p. 68-72, 2000.

DE LA FUENTE, M.; DEL RIO, M.; FERRANDEZ, M. D.; HERNANZ, A. Modulation of phagocytic function in murine peritoneal macrophages by bombesin, gastrin releasing peptide and neuromedin. **C Immunol.** v. 73, p. 205-211, 1991.

DELVES, P. J.; ROITT, I. M. The Immune System: First of two Parts. **Advances in Immunology.** v. 354, n. 1, p. 37-49, 2000.

DICK, D. J. Adipokines as regulators of muscle metabolism and insulin sensitivity. **Appl Physiol Nutr Metab.** v. 34, p. 396-402, 2009.

DINARELLO, C. A.; CANNON, J. G.; WOLFF, S. M.; BERNHEIM, H. A.; BEUTLER, B.; CERAMI, A.; FIGARI, I. S.; PALLADINO, M. A.; O'CONNOR, J. V. Tumor necrosis factor (cachectin) is an endogenous pyrogen and induces production of interleukin 1. **J Exp Med.** v. 163, n. 6, p. 1433-1450, 1986.

DINARELLO, C. A. Biological basis for interleukin-1 in disease. **Blood.** v. 87, p. 2065-2147, 1996.

DREVON, C. A. Fatty acids and expression of adipokines. **Biochim Biophys Acta.** v. 1740, n. 2, p. 287-292, 2005.

DUARTE, A. C. G. O.; FONSECA, D. F.; MANZONI, M. S. J.; SOAVE, C. F.; SENE FIORESE, M.; DAMASO, A. R.; CHEIK, N. C. Dieta hiperlipídica e capacidade secretória de insulina em ratos. **Rev Nutr.** v. 19, n. 3, p. 341-348, 2006.

ESTADELLA, D.; OYAMA, L. M.; DÂMASO, A. R.; RIBEIRO, E. B.; OLLER, D. O.; NASCIMENTO, C. M. Effect of palatable hyperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. **Nutrition.** v. 20, n. 2, p. 218-224, 2004.

FAIN, J. N.; MADAN, A. K.; HILER, M. L.; CHEEMA, P.; BAHOUTH, S. W. Comparison of the release of adipokines by adipose tissue, adipose tissue matrix, and adipocytes from visceral and subcutaneous abdominal adipose tissues of obese humans. **Endocrinol.** v. 145, n. 5, p. 2273-2282, 2004.

FANTUZZI, G. Adipose tissue, adipokines and inflammation. **J Allergy Clin Immunol.** v. 115, n. 5, p. 911-919, 2005.

FASOL, R.; SCHINDLER M.; SCHUMACHER, B.; SCHLAUDRAFF, K.; HANNES, W.; SEITELBERGER, R.; SCHLOSSER, V. The influence of obesity on perioperative morbidity: retrospective study of 502 aortocoronary bypass operations. **J Thorac Cardiovasc Surg.** v. 40, p. 126-129, 1992.

FEOLI, A. M.; ROEHRIG, C.; ROTTA, L. N.; KRUGER, A. H.; SOUZA, K. B.; KESSLER, A. M.; RENZ, S. V.; BRUSQUE, A. M.; SOUZA, D. O.; PERRY, M. L. Serum and liver lipids in rats and chicks fed with diets containing different oils. **Nutrition.** v. 19, n. 9, p. 789-793, 2003.

FERRANTE, A. W. Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation. **J Intern Med.** v. 262, p. 408-414, 2007.

FESTING, M. F. W. The inheritance of obesity in animal models of obesity. In: \_\_\_\_\_. **Animal models of obesity**. London: Oxford University Press; 1979. p.15-37.

FHÜHBECK, G.; GÓMEZ-AMBROSI, J.; MURUZÁBAL, F. J.; BURREL, M. A. The adipocyte: a model for integration of endocrine and metabolic signaling in energy metabolism regulation. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. v. 280, p. 827-84, 2001.

FISBERG, M. Primeiras palavras: uma introdução ao problema do excesso de peso. In: \_\_\_\_\_. **Atualização em Obesidade na Infância e na Adolescência**. São Paulo: Atheneu; 2004. p.1-9.

FRANCISCHI, R. P.; SANTOS, R. C.; VIEIRA, P.; FREITAS, C. S.; KLOPFER, M.; PEREIRA, L. O.; SAWADA, L. A.; CAMPOS, P. L.; LANCH JR, A. H. Efeito da intensidade da atividade física e da dieta hipocalórica sobre consumo alimentar, a composição corporal e a colesterolemia em mulheres obesas. **Rev Bras Nutr Clin**. v. 14, p. 1-8, 1999.

FRANCISCHI, R. P.; PEREIRA, L. O.; FREITAS, C. S.; KLOPFER, M.; SANTOS, R. C.; VIEIRA, P.; LANCH JR, A. H. Obesidade: atualização sobre sua etiologia, morbidade e tratamento. **Rev Nutr**. v. 13, p. 17-28, 2000.

FRANCISCHI, R. P.; PEREIRA, L. O.; LANCH JR, A. H. Exercício, comportamento alimentar e obesidade: revisão dos efeitos sobre a composição corporal e parâmetros metabólicos. **Rev Paul Educ Fís**. v. 15, p. 117-140, 2001.

FRIEDMAN, J. M. The alphabet of weight control. **Nature**. v. 385, p. 119-120, 1997.

FRIEL, S.; CHOPRA, M.; SATCHER, D. Unequal weight: equity oriented policy responses to the global obesity epidemic. **BMJ**. v. 335, p. 1241-1243, 2007.

GAÍVA, M. H.; COUTO, R. C.; OYAMA, L. M.; COUTO, G. E. C.; SILVEIRA, V. L. F.; RIBEIRO, E. B.; NASCIMENTO, C. M. O. Diets rich in polyunsaturated fatty acids: effect on hepatic metabolism in rats. **Nutr**. v. 19, n. 2, p. 144-149, 2003.

GHOSN, E. E. B.; CASSADO, A. A.; GONNOVI, G. R.; FUKUHARA, T.; YANG, Y.; MONACK, D. M.; BORTOLUCI, R. C.; Almeida, S. R.; Herzenberga, L. A.; Herzenberg, L. A. Two physically, functionally and developmentally distinct peritoneal macrophage subset. **PNAS**. v. 107, n. 6, p. 2568-2573, 2010.

- GLAUSER, M. P.; HEUMANN, D.; BAUMGARTNER, J. D.; COHEN, J. Pathogenesis and potential strategies for prevention and treatment of septic shock an update. **Clin Infect Dis.** v. 18, p. 205S-216S, 1994.
- GLAUSER, M. P. Pathophysiologic basis of sepsis: considerations for future strategies of intervention. **Crit care Med.** v. 8, n. 9, p. 54-58, 2000.
- GNACINSKA, M.; MAŁGORZEWICZ, S.; STOJEK, M.; ŁYSIAK-SZYDŁOWSKA, W.; SWORCZAK, K. Role of adipokines in complications related to obesity: a review. **Adv Med Sci.** v. 54, n. 2, p. 150-157, 2009.
- GOLDSTEIN, B. J.; SCALIA, R. Adiponectin: a novel adipokine linking adipocytes and vascular function. **J Clin Endocrinol Metab.** v. 89, n. 6, p. 2563-2568, 2004.
- GORDON, S.; TAYLOR, R. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. **Nat Rev Immunol.** v. 5, n. 12, p. 953-964, 2005.
- GOTTSCHLICH, M. M.; MAYES, T.; KHOURY, J. C.; WARDEN, G. D. Significance on nutritional, immunologic, hormonal, and clinical outcome parameters in burns. **J Am Diet Assoc.** v. 93, p. 1261-1268, 1993.
- GRAAF, C.; HULSHOF, T.; WESTSTRATE JA, J. A. S. P. Short-term effects of different amounts of protein, fats and carbohydrate on satiety. **Am J Clin Nutr.** v. 55, p. 33-38, 1992.
- GRUNDY, S. M. Multifactorial causation of obesity: implications for prevention. **Am J Clin Nutr.** v. 67, p. 563-572, 1998.
- GUIMARÃES, D. E. D.; SARDINHA, F. L. C; MIZURINI, D. M; CARMO, M. G. T. Adipocinas: uma nova visão do tecido adiposo. **Rer Nutr.** v.20, n.5, p. 549-559, 2007.
- HAAPANEM, N.; MIILUNPALO, S.; OJA, P.; VUORI, I. Association between leisure time physical activity and 10-year body mass change among working-aged men and women. **Int J Obes Relat Metab Disord.** v.21, p. 288-296, 1997.
- HAVEL, P. J. Update on adipocyte hormones: regulation of energy balance and carbohydrate/lipid metabolism. **Diabetes.** v. 53, suppl 1, p. 143-152, 2004.
- HEWETT, J. A.; ROTH, R. M. Hepatic and extrahepatic pathobiology of bacterial lipopolysaccharide. **Pharmacol rev.** v. 45, p. 382-411, 1993.

HICK, R. W.; GRUVER, A. L.; VENTEVOGEL, M. S.; HAYNES, B. F.; SEMPOWSKI, G. D. Leptin selectively augments thymopoiesis in leptin deficiency and lipopolysaccharide-induced thymic atrophy. **J Immunol.** v. 177, p. 169-176, 2006.

HILL, A.G.; HILL, G. L. Metabolic response to severe injury. **Br J Surg, Bristol.** v. 85, n. 7, p. 884-890, 1998.

HOLGATE, S. T.; CHURCH, M. K. **Allergy.** São Paulo: Manole; 1996. p.7.1-7.7.

HOTAMISLIGIL, G. S.; SHARGILL, N. S.; SPIEGELMAN, B. M. Adipose expression of tumor necrosis factor- alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science.** v. 259, p. 87-91, 1993.

HUME, D. A. The mononuclear phagocyte system. **Curr Opin Immunol.** v. 18, p. 49-53, 2006.

INQUE, S. Animal models of obesity: hypothalamic lesions. In: \_\_\_\_\_. **Obesity.** Philadelphia: J.B. Lippincott Company; 1992. 266-277.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHOLMCHIK, M. J. **Immunobiology: The Immune System in health and Disease.** 6 ed. Garland Science Publishing Inc.: New York: 2005.

JEBB, S. A. Obesity: from molecules to man. **Proc Nutr Soc.** v. 58, p. 1-14, 1999.

JEN, K. L. C.; BUISON, A.; PELLIZZON, M.; ORDIZ JR, F.; ANA, L. S.; BROWN, J. Differential effects of fatty acids and exercise on body weight regulation and metabolism in female wistar rats. **Exp Biol Med.** v. 228, n. 7, p. 843-849, 2003.

JOHNSTON JR, R. B. Measurement of O<sub>2</sub>- secreted by monocytes and macrophages. **Methods in enzymology.** v. 105, p.365-369, 1984.

KANDRA, H.; TATEYA, S.; TAMORI, Y.; KOTANI, K.; HIASA, K. I.; KITAZAWA, R.; KITAZAWA, S.; MIYACHI, H.; MAEDA, S.; EGASHIRA, K.; KASUGA, M. MCP-1 contributes to macrophage infiltration into adipose tissue, insulin resistance and hepatic steatosis in obesity. **J Clin Invest.** v. 116, n. 6, p.1494-1505, 2006.

KARLSSON, E. A.; BECK, M. A. The burden of obesity on infectious disease. **Exp Biol Med.** v. 235, n. 12, p.1412-1424, 2010.

KATAGIRI, K.; ARAKAW, S.; KURAHASHI, R.; HATANO, Y. Impaired contact hypersensitivity in diet-induced obese mice. **J Dermatol Sci.** v. 46, p. 117-126, 2007.

KATAN, M. B. Fatty acids and health: an update. **Scand J Nutr.** v. 43, p. 26, 1999.

KAZIMIERZ, W. Caspase-8 activation precedes alterations of mitochondrial membrane potential during monocyte apoptosis induced by phagocytosis and killing *Staphylococcus aureus*. **Infec Immun.** v. 72, n. 5, p. 2590-2597, 2004.

KLIMP, A. H.; DE VRIES, E. G.; SCHERPHOF, G. L.; DAEMEN, T. A potential role of macrophage activation in the treatment of cancer. **Crit Rev Oncol Hematol.** v. 44, n. 2, p. 143-161, 2002.

KREIMER, F.; AGUIAR, J. L. A.; CASTRO, C. M. M. B.; LACERDA, C. M.; REIS, T.; JÚNIOR, F. L. Resposta terapêutica e inflamatória de ratos com peritonite secundária submetido ao uso tópico de ampicilina/sulbactam. **Acta Cir Bras.** v. 20, p. 63-71, 2005.

KRISHNAM, E. C.; TROST, L.; AARONS, S.; JEWELL, W. R. Study of function and maturation of monocytes in morbidly obese individuals. **J Surg Res.** v.33, p. 89-97, 1982.

LAMAS, O.; MARTÍNEZ, J. A.; MARTÍ, A. T helper lymphopenia and decreased mitogenic response in cafeteria diet-induced obese rats. **Nutr Res.** v. 22, p. 496-507, 2002.

LAMAS, O.; MARTÍ, A.; MARTÍNEZ, J. A. Obesidad e inmunocompetencia. In: \_\_\_\_\_. **Actualización en nutrición, inmunidad e infección.** Madrid: Panamericana; 2003. p.125-32.

LAMAS, O.; MARTÍNEZ, J. A.; MARTÍ, A. Energy restriction restores the impaired immune response in overweight (cafetería) rats. **J Nutr Biochem.** v.15, p.418-425, 2004.

TRASANDE, T.; CRONK, C.; DURKIN, M.; WEISS, M.; SCHOELLER, D. A.; GALL, E. A.; HEWITT, J. B.; CARREL, L.; LANDRIGAN, P. J.; GILLMAN, M. W. Environment and Obesity in the National Children's Study. **Cien. Saude colet.** v. 15, n. 1, p. 195-210, 2010.

LOFFREDA, S.; YANG, S. Q.; LIN, H. Z.; KARP, C. L.; BREGMAN, M. L.; WANG, D. J.; KLEIN, A. S.; BULKLEY, G. B.; BAO, C.; NOBLEM P. W.; LANE, M. D. Leptin regulates proinflammatory immune responses. **FASEB J.** v. 12, p. 57-65, 1998.

LOPES, H. F. Hipertensão e inflamação: papel da obesidade. **Rev Bras de hipertens.** v. 14, n. 4, p. 239-244, 2007.

LORD, G. M.; MATARESE, G.; HOWARD, J. K.; BAKER, R. J.; BLOOM, S. R.; LECHLER, R. I. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. **Nature.** v. 394, p.897-901, 1998.

LUCHI, M.; MORRISON, D. C. Comparable Endotoxic Properties of Lipopolysaccharides Are Manifest in Diverse Clinical Isolates of Gram-Negative bacteria. **Infect Immun.** v. 68, p. 1899-1904, 2000.

LUMENG, C. N.; BONDIZIN, J. L.; SALTIEL, A. R. Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophages polarization. **J Clin Invest.** v. 117, n. 1, p. 175-184, 2007.

LYON, C. J.; LAW, R. E.; HSUEH, W. A. Minireview: adiposity, inflammation, and atherogenesis. **Endocrinol.** v. 144, p. 2195-2200, 2003.

MAFFEI, M.; HALAAS, J.; RAVUSSIN, E.; PRATLEY, R. E.; LEE, G. H.; ZHANG, Y.; FEI, H.; KIM, S.; LALLONE, R.; RANGANATHAN, S.; KERN, P. A.; FRIEDMAN, J. M. Leptin levers in human and rodent: measurement of plasma leptin and ob RNA in obese and weight-reduced subjects. **Nat Med.** v. 1, p. 1155-1161, 1995.

MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. Krause: alimentos, nutrição e dietoterapia. 9ed. São Paulo: roca, 1998.

MARCOS, A.; NOVA, E.; MONTERO, A. Changes in the immune system are conditioned by nutrition. **Eur J Clin Nutr.** v. 57, n. 1, p. 66-69, 2003.

MARTI, A.; MARCOS, A.; MARTÍNEZ, J. A. Obesity and immune function relationships. **Obes Rev.** v. 2, p. 131-140, 2001.

MARTIN-ROMERO, C.; SANTOS-ALVAREZ, J.; GOBERNA, R.; SANCHEZ MARGALET, V. Leptin enhances activation and proliferation of human circulating T lymphocytes. **Cell Immunol.** v. 199, p. 15-24, 2000.

- MATARESE, G.; MOSCHOS, S.; MANTZOROS, C.S. Leptin in immunology. **J Immunol.** v. 173, p. 3137-3142, 2005.
- MATHIEU, P.; POIRIER, P.; PIBAROT, P.; LEMIEUX, I.; DESPRES, J. P. Visceral obesity: the link among inflammation, hypertension and cardiovascular disease. **Hypertension.** v. 53, p. 577-584, 2009.
- MELO, K. F. S. Efeitos da obesidade sobre parâmetros imunológicos, hematológicos e bioquímicos em ratos endotoxêmicos [Dissertação de mestrado]. **Univ. Federal de Pernambuco**, Recife, 2010.
- MIKHAIL, A. A.; BECK, E. X.; SHAFER, A.; BARUT, B.; GBUR, J. S.; ZUPANCIC, T. J.; SCHWEITZER, A. C.; CIOFF, J. A.; LACAUD, G.; OUYANG, B.; SNODGRASS, H. R. Leptin stimulates fetal and adult erythroid and myeloid development. **Blood.** v. 89, p. 1507-1512, 1997.
- MILLER, D. S. Non-genetic models of obesity. In: \_\_\_\_\_. **Animal models of obesity.** London: Oxford University Press; 1979. P.131-140.
- MILLER, G.D.; HRUPKA, B. J.; GIETZEN, D. W.; ROGERS, Q. R.; STERN, J. S. Rats on a macronutrient self-selection diet eat more meals from a single food cup. **Appetite.** v. 23, p. 67-78, 1994.
- MOHAMED-ALI, V.; PINKNEY, J. H.; COPPACK, S. W. Adipose tissue as an endocrine and paracrine organ. **Int J Obesity.** v. 22, p. 1125-1133, 1998.
- MONDINI, L.; MONTEIRO, C. A. Relevância epidemiológica da desnutrição e da obesidade em distintas classes sociais: métodos de estudo e aplicação à população brasileira. **Rev. Bras. Epidemiol.** v. 1, p. 28-39, 1998.
- MONTEIRO, C. A.; MONDINI, L.; SOUZA, A. L. M.; POPKIN, B. M. The nutrition transition in Brazil. **Eur J Clin Nutr.** v. 49, p. 105-113, 1995.
- MONTEIRO, C. A.; CONDE, W. L.; POPKIN, B. M. Income-specific trends in obesity in Brazil: 1975-2003. **Am j public health.** v.97, n. 10, p.1808-1812, 2007.
- MORIGUCHI, S.; KATO, M.; SAKAI, K.; YAMAMOTO, S.; SHIMIZU, E. Decreased mitogen response of splenic lymphocytes in obese Zucker rats is associated with the decreased expression of glucose transporter 1 (GLUT-1). **Am J Clin Nutr.** v. 67, p. 1124-1129, 1998.

MORRIS, M. J. Cardiovascular and metabolic effects of obesity. **Clin Exp Pharmacol Physiol.** v. 8, p. 566-570, 2008.

MORRISON, S. D. The hypothalamic syndrome in rats. **Fed Proc.** v. 36, p. 139-142, 1977.

MOSSER DM; EDWARDS JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat Rev Immunol.** v. 8, n. 12, p. 958-969, 2008.

MOULTON, M. J.; Creswell, L. L.; Mackey, M. E.; Cox, J. L.; Rosenbloom, M.; Obesity is not a risk factor for significant adverse outcomes after cardiac surgery. **Circulation.** v. 94, p. 87-92, 1994.

MUÑOZ, M.; MAZURE, R. A.; CULEBRAS, J. M. Obesidad y sistema inmune. **Nutr Hosp.** v. 19, n. 6, p. 319-324, 2004.

MURANO, I.; BARBATELLI, G.; PARISANI, V.; LATINI, C.; MUZZONIGRO, G.; CASTELLUCCI, M.; CINTI, S. Dead adipocytes detected as crown-like structures are prevalent in visceral fat depots of genetically obese mice. **J Lipid Res.** v. 49, n. 7, p. 1562-1568, 2008.

NIEMAN, D. C.; HENSON, D. A.; NEHLSSEN-CANNARELLA, S. L.; EKKENS, M.; BUTTERWORTH, D. E.; FAGOAGA, O. R.; WARRWN, B. J.; RAINWATTER, M. K. Immune response to obesity and moderate weight loss. **Int J Obes.** v. 29, p. 353-360, 1996.

NIEMAN, D. C.; Henson, D. A.; Nehlsen-Cannarella, S. L.; Ekkens, M.; Utter, A. C.; Butterworth, D. E.; Fagoaga, O. R. Influence of obesity on immune function. **J. Am. Diet. Assoc.** v. 99, p. 294-299, 1999.

NIETO, F. J.; SZKLO, M.; FOLSOM, A. R.; ROCK, R.; MERCURI, M. Leukocyte count correlates in middle-aged adults: the Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. **Am J Epidemiol.** v. 136, p. 525-537, 1992.

OLIVEIRA, C. L.; FISBERG, M. Obesidade na infância e adolescência uma verdadeira epidemia. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v. 47, n. 2, p. 107-108, 2003.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Obesity and Overweight. [acesso em 12/08/2011]. Disponível em:  
<http://who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>

OUCHI, N.; KIHARA, S.; ARITA, Y.; MAEDA, K.; KURIYAMA, H.; OKOMOTO, Y.; HOTTA, K.; NISHIDA, M.; TAKAHASHI, M.; NAKAMURA, T.; YAMASHITA, S.; FUNAHASHI, T.; MATSUZAWA, Y. Novel modulator for endothelial adhesion molecules: adipocyte-derived plasma protein adiponectin. **Circulation**. v. 100, n. 25, p. 2473-2476, 1999.

PALMBLAD, J.; HALLBERG, D.; ENGSTED, L. Polymorphonuclear (PMN) function after small intestinal shunt operation for morbid obesity. **Br J Haematol**. v. 44, p. 101-108, 1980.

PARRILLO, J. E. Pathogenetic mechanisms of septic shock. **N Engl J Med**. v. 328, n. 20, p. 1471-1477, 1993.

PEAKMAN, M.; VERGANI, D. **Imunologia básica e clínica**. Rio de Janeiro: Elsevier; 2011.

PEREIRA JÚNIOR, G. A.; MARSON, F.; ABEID, M.; OSTINI, F. M.; SOUZA, S. H.; BASILE-FILHO, A. Fisiopatologia da sepse e suas implicações terapêuticas. **Medicina**. Ribeirão Preto, v. 31, p. 349-362, 1998.

PEREIRA, L. O.; FRANCISCHI, R. P.; LANCHETA JR, A. H. Obesidade: hábitos nutricionais, sedentarismo e resistência à insulina. **Arq Bras Endocrinol Metab**. v. 47, n. 2, 2003.

PINE, D. S.; COHEN, P.; BROOK, J.; COPLAN, J. D. Psychiatric symptoms in adolescence as predictors of obesity in early adulthood: a longitudinal study. **Am J Public Health**. v. 87, n. 8, p. 1303-1310, 1997.

PITHON-CURI, T. C.; LEVADA, A. C.; LOPES, L. R.; DOI, S. Q.; CURI, R. Glutamine plays a role in superoxide production and the expression of p47phox, p22phox and gp91phox in rat neutrophils. **Clin Sci**. v. 103, n. 4, p. 403-408, 2002.

PLATA-SALAMÁN, C. R. Anorexia during acute and chronic disease. **Nutrition**. v. 12, p. 69-78, 1996.

POPKIN, B. M.; DOAK, C. The obesity epidemic is a worldwide phenomenon. **Nutr Rev**. v. 56, p. 106-114, 1998.

PORTO, S. M. M. S. Efeito do treinamento físico moderado em parâmetros metabólicos e imunológicos de ratos adultos obesos [Tese de doutorado]. **Univ. Federal de Pernambuco**, Recife, 2011.

PRENTICE, A. M. Manipulation of dietary fat and energy density and subsequent effects on substrate flux and food intake. **Am J Clin Nutr.** v. 67, p. 535S-541S, 1998.

QUEIRÓS, A. S. Desnutrição precoce e estresse agudo: Aspectos da resposta imunitária em ratos adultos. [Dissertação de mestrado]. **Univ. Federal de Pernambuco**, Recife, 2000.

RIBEIRO FILHO, F. F.; MARIOSA, L. S.; FERREIRA, S. R. G.; ZANELLA, M. T. Gordura visceral e síndrome metabólica: mais que uma simples associação. **Arq Bras Endocrinol Metab.** v. 50, n. 2, 2006.

ROBINSON, S. W.; DINULESCU, D. M.; CONE, R. D. Genetic models of obesity and energy balance in the mouse. **Ann Rev Genet.** v. 34, p. 687-745, 2000.

ROGATTO, G. P.; OLIVEIRA, C. A. M.; MACHADO, F. B. NAKAMURA, F. T.; MORAES, C.; ZAGATTO, A. M.; FARIA, M. C.; AFONSO, M.; MELLO, M. A. R. Influência da ingestão de espirulina sobre o metabolismo de ratos exercitados. **Rev Bras Med Esporte.** v. 10, n. 4, p. 281-284, 2004.

ROLLS, B. J.; SHINE, D. J. The influence of dietary fat on food intake and body weight. **Nutr Rev.** v. 50, p. 283-290, 1992.

ROLLS, B. J.; KIM-HARRIS, S.; FISHMAN, M. W.; FOLTIN, R. W.; MORAN, T. H.; STONER, S. A. Satiety after preloads with different amounts of fat and carbohydrate: implications for obesity. **Am J Clin Nutr.** v. 60, p. 476-487, 1994.

ROLLS, B. J. Carbohydrate, fats and satiety. **Am J Clin Nutr.** v. 61, p. 960S-967S, 1995.

ROSENFELD, Y.; PAPO, N.; SHAI, Y. Endotoxin (lipopolysaccharide) neutralization by innate immunity host defense peptides. Peptide properties and plausible modes of action. **J Biol Chem.** v. 281, n. 3, p. 1636-1643, 2006.

RUDIN, E.; BARZILAI, N. Inflammatory peptides derived from adipose tissue. **Immun Ageing.** v. 2, n.1, 2005.

SALOMAO, R.; BRUNIALTI, M. K.; KALLAS, E. G.; MARTINS, P. S.; RIGATO, O.; FREUDENBERG, M. Lipopolysaccharide-cell interaction and induced cellular activation in whole blood of septic patients. **J Endotoxin Res.** v. 8, n. 5, p. 371-379, 2002.

SANCHEZ-MARGALET, V.; MARTIN-ROMERO, C.; SANTOS-ALVAREZ, J.; GOBERNA, R.; NAJIB, S.; GONZALEZ-YANES, C. Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells: mechanisms of action. **Clin Exp Immunol.** v. 133, p. 11-19, 2003.

SANTOS-ALVAREZ, J.; GOBERNA, R.; SANCHEZ-MARGALET, V. Human leptin stimulates proliferation and activation of human circulating monocytes. **Cell Immunol.** v. 194, p. 6-11, 1999.

SCHULZ, L. O.; SCHOELLER, D. A. A compilation of total daily energy expenditures and body weights in healthy adults. **Am J Clin Nutr.** v. 60, p. 676-681, 1994.

SCLAFANI, A.; SPRINGER, D. Dietary obesity in adult rats: similarities to hypothalamic and human obesity syndromes. **Physiol Behav.** v. 17, p. 461-471, 1976.

SCLAFANI, A. Dietary obesity models. In: \_\_\_\_\_. **Obesity.** Philadelphia: J.B: Lippincott Company; 1992. p.241-248.

SEDLITSKII, L. U. L.; MIRCHUK, K. K.; KORESHKIN, I. A. Immune status of patients with obesity. **Vrachebnoe Delo.** v. 9, p. 71-73, 1990.

SEGURA, J. J.; JIMÉNEZ-RUBIO, A. Effect of eugenol on macrophage adhesion in vitro to plastic surfaces. **J Endod.** v. 24, p. 229-231, 1998.

SEIDELL, J. C. Obesity insulin resistance and diabetes – a worldwide epidemic? In: \_\_\_\_\_. **Diet and the metabolic syndrome – International Symposium.** Ystad; 1999. p.20.

SHANKAR, A.; XIAO, J. Positive relationship between plasma leptin level and hypertension. **Hypertension.** v. 56, p. 623-638, 2010.

SMITH, A. G.; SHERIDAN, P. A.; HARP, J. B.; BECK, M. A. Diet-induced obese mice have increased mortality and altered immune responses when infected with influenza virus. **J Nutr.** v. 137, n. 5, p. 1236-1243, 2007.

SOUZA, D. P.; SILVA, G. S.; OLIVEIRA, A. M.; SHINOHARA, N. K. S. Etiologia da obesidade em crianças e adolescents. **Rev Bras Nutr Clin.** v. 22, n. 1, p. 72-76, 2007.

SOWERS, J. R. Obesity and cardiovascular disease. **Clin Chem.** v. 44, n. 8, p. 1821-1825, 1998.

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

SUNIL, V. R.; CONNOR, A. J.; ZHOU, P.; GORDON, M. K.; LASKIN, J. D. Activation of adherent vascular neutrophils in the lung during acute endotoxemia. **Respir Res.** v. 3, p. 21, 2002.

TANAKA, S.; INOUE, S.; WASEDA, M.; ISHIHARA, M.; YAMAKAWA, T.; SUGIYAMA, A.; TAKAMURA, Y.; OKUDA, K. Impaired immunity in obesity: suppressed but reversible lymphocyte responsiveness. **Int J Obes.** v. 17, p. 631-636, 1993.

TANAKA, S.; ISODA, F.; YAMAKAWA, T.; ISHIHARA, M.; SEKIYAMA, H. T lymphopenia in genetically obese rats. **Clin Immunol Immunopathol.** v. 86, p. 219-225, 1998.

TANAKA, S.; ISODA, F.; ISHIHARA, Y.; KIMURA, M.; YAMAKAWA, T. T lymphopenia in relation to body mass index and TNF- $\alpha$  in human obesity: adequate weight reduction can be corrective. **Clin Endocrinol.** v. 54, p. 347-354, 2001.

TILG, H.; MOSCHEN, A. R. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. **Nature.** v. 6, n. 10, p. 772-783, 2006.

UVIN, P. The state of world hunger. **Nutr Res.** v. 52, p. 151-151, 1994.

VAMOSI, M.; HEITMANN, B. L.; KYVIK, K. O. The relation between an adverse psychological and social environment in childhood and the development of adult obesity: a systematic literature review. **Obes Rev.** v. 11, n. 3, p. 177-184, 2010.

VIGITEL BRASIL. Ministério da Saúde. Vigilância de fatores de risco e proteção para doenças crônicas por inquérito telefônico, 2008.

- VON DIEMEN, V.; TRINDADE, E. N.; TRINDADE, M. R. Experimental model to induce obesity in rats. **Acta Cir Bras.** v. 21, n. 6, p. 425-429, 2006.
- WANG, G.; DIETZ, W. H. Economic burden of obesity in youths aged 6 to 17 years: 1979-1999. **Pediatrics.** v. 109, n. 5, p. 81, 2002.
- WAUTERS M; CONSIDINE RV; VAN GAAL LF. Human leptin: from an adiposity hormone to an endocrine mediator. *Eur J Endocrinol.* 143: 293-311, 2000.
- WEISBERG, S. P.; HUNTER, D.; HUBER, R.; LEMIEUX, J.; SLAYMAKER, S.; VADDI, K.; CHARO, I.; LEIBEL, R. L.; FERRANTE JR, A. W. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. **J Clin Invest.** v. 116, n. 1, p. 115-124, 2006.
- WELBOURN, C. R. B.; YOUNG, Y. Endotoxin, septic shock and acute lung injury: neutrophils, macrophages and inflammatory mediators. **Br J Surg.** v. 79, p. 998-1003, 1992.
- WEST, D. B.; YORK, B. Dietary fat, genetic predisposition, and obesity: lessons from animal models. **Am. J. Clin. Nutr.** v. 67, p. 505S-512S, 1998.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity: preventing and managing the global epidemic. Report of a WHO Consultation on Obesity. Geneva, 2000.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Obesity: preventing and managing the global epidemic. **World Health Organization**, 2005.
- WHO - World Health Organization. Obesity. Facts related to chronic diseases. 2008. Site: <http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/facts/chronic/en>
- WILLET, W. Is dietary fat a major determinant of body fat? **Am J Clin Nutr.** v. 67, p. 556-562, 1998.
- WONG, C. W.; THOMPSON, H. L.; THONG, Y. H.; THORNTON, JR. Effect of strenuous exercise stress on chemiluminescence response of equine alveolar macrophages. **Equine Vet. J.** v. 22, p. 33-35, 1990.
- YORK, D. A. Genetic models of animal obesity. In: \_\_\_\_\_. **Obesity.** Philadelphia: J.B. Lippincott Company; 1992. p. 233-240.

YUDKIN, J. S.; KUMARI, M.; HUMPHRIES, S. E.; MOHAMED-ALI, V. Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? **Atherosclerosis**. v. 148, p. 209-214, 2000.

ZAREIE, M.; SINGH, P. K.; IRVINE, E. J.; SHERMAN, P. M.; MCKAY, D. M.; PERDUE, M. H. Monocyte/macrophage activation by normal bacteria and bacterial products. Implications for altered epithelial function in Crohn's disease. **Am J Pathol**. v. 158, p. 1101-1109, 2001.

ZHAO, Y.; SUN, L.; GAO, C.; TIAN, Z. Expression of leptin receptors and response to leptin stimulation of human natural killer cell lines. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 300, p. 247-252, 2003.

ZIELINSKI, T.; WACHOWICZ, B.; SALUK-JUSZCZAK, J.; KACA, W. The generation of Superoxide anion in blood platelets in response to different forms of proteus Mirabilis lipopolysaccharide: effects of staurosporin, wortmannin, and Indomethacin. **Thromb Research**. v. 103, p. 149-155, 2001.

**ANEXOS**

---

## ANEXO A – Parecer do 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, 10 de outubro de 2008

Ofício nº 64/08

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE  
Para: **Profa. Célia Maria Machado Barbosa de Castro**  
Departamento de Nutrição– CCS  
Universidade Federal de Pernambuco  
Processo nº 23076.0014698 / 2008 - 28

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado **"Efeito da dieta hiperlipídica e treinamento físico moderado sobre parâmetros da resposta imunológica em ratos submetidos 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 CEEA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

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

Atenciosamente,

*Mauro Terezo Jansen*  
Prof. Mauro Terezo Jansen  
Presidente da CEEA

Observação:  
Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição  
Animais: Ratos; Wistar; machos; entre 90 e 126 dias de vida; Número de animais previsto no protocolo: 64 animais

## ANEXO B - Composição centesimal da dieta Hiperlipídica



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
DEPARTAMENTO DE NUTRIÇÃO  
LABORATÓRIO DE EXPERIMENTAÇÃO E ANÁLISES DE ALIMENTOS  
NONETE BARBOSA GUERRA

Página 1 de 1

**CERTIFICADO DE ENSAIO Nº 3350/08**      Data de Emissão: 01/10/2008

<b>SOLICITANTE</b> KARLA MELO FERREIRA DA SILVA		<b>DATA DE ENTRADA</b> 18.09.08
<b>ENDEREÇO DO SOLICITANTE</b> Departamento de Nutrição – UFPE		
<b>NATUREZA DO PRODUTO</b> DIETA HIPERCALÓRICA		<b>Marca:</b> -
<b>Outras Informações:</b> -	<b>Lote</b> -	<b>Data de fabricação:</b> - <b>Data de validade:</b> -
<b>AMOSTRA:</b> aproximadamente 200g, coletada pelo solicitante.		

### FÍSICO-QUÍMICA

ENSAIOS	RESULTADOS
<b>Umidade e Substâncias Voláteis (g/100g)</b> Método: Adolfo Lutz, 2005	6,77
<b>Cinzas (g/100g)</b> Método: Adolfo Lutz, 2005	3,62
<b>Proteínas (g/100g)</b> Método: Adolfo Lutz, 2005	17,93
<b>Lípidios (g/100g)</b> Método Adolfo Lutz, 2005	24,50
<b>Carboidratos (g/100g)</b> Método: por cálculo/ASCAR, 1985	47,18
<b>VCT (kcal/100g)</b> Método: por cálculo	480,94
<b>Observações:</b>	-
<b>Conclusão:</b>	-

Informamos que os resultados são referentes a amostra analisada e que a reprodução deste certificado só é permitida na íntegra.

Recife, 01 de outubro de 2008

  
 Sebastião Camilo de Melo Filho  
 Gerente Técnico Setor de Físico-Química

  
 Margarida Angélica da S. Vasconcelos  
 Coordenador do LEAAL

## ANEXO C - Documentação de encaminhamento do artigo “**Obesity and microbicidal activity of alveolar macrophages in adult rats**” ao periódico.

<b>Assunto:</b>	Submission Confirmation
<b>De:</b>	Nutrition (Nutrtn1@upstate.edu)
<b>Para:</b>	rosangelarosendo@yahoo.com.br;
<b>Data:</b>	Quarta-feira, 15 de Fevereiro de 2012 2:47

Dear Mrs ROSENDO DA SILVA,

Thank you for sending your paper Obesity and microbicidal activity of alveolar macrophages in adult rats for consideration in Nutrition.

We agree to consider this manuscript, with the understanding that the article and any figures or tables associated with the article have not been published elsewhere and will not be submitted elsewhere during the period of review by this journal. Your paper will be sent for peer review. You can be sure that every effort will be made to expedite the review process and to notify you of the Journal's decision as soon as possible.

You may check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System as an author. The URL is <http://ees.elsevier.com/nut/>.

Your username is: Rosangela

If you need to retrieve password details please go to: [http://ees.elsevier.com/nut/automail\\_query.asp](http://ees.elsevier.com/nut/automail_query.asp)

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Thank you for submitting your work to this journal.

Yours sincerely,

Elsevier Editorial System  
Nutrition

ANEXO D - Documentação de encaminhamento do artigo “Endotoxemia and obesity: repercussion on functional aspects of alveolar macrophage” ao periódico.



<b>Manuscript #</b>	2196
<b>Current Revision #</b>	0
<b>Submission Date</b>	2012-02-15 21:21:57
<b>Current Stage</b>	Initial QC
<b>Title</b>	Endotoxemia and obesity: repercussion on functional aspects of alveolar macrophage
<b>Running Title</b>	Endotoxemia, obesity and alveolar macrophage
<b>Manuscript Type</b>	Full Paper
<b>Corresponding Author</b>	ROSANGELA DA SILVA (UPPE)
<b>Contributing Authors</b>	Karla de Silva , Solange Maria Porto , Bruno Sampaio , Vanessa de Santana , CÉLIA MARIA DE CASTRO
<b>Abstract</b>	This study investigated the effect of obesity on endotoxemia on the functional aspects of alveolar macrophages in adult rats. Male Wistar rats were divided in two groups: standard diet (SD) group, composed of animals that received the standard diet from the vivarium (Labina-Purina do Brasil S/A) and hyperlipidic diet group (HD), which consisted of animals that received a hypercaloric and hyperlipidic diet during 18 weeks. After this period, the groups were subdivided into endotoxemic (SDE and HDE) and non-endotoxemic (SD and HD). In order to obtain the endotoxemic groups, the animals received an intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (1mg/Kg of body weight). The tracheostomy procedure was then done in order to obtain the bronchoalveolar lavage. From the macrophages isolated from this lavage, total and differential leukocyte count were done, as well as the evaluation of adhesion index, cellular viability and superoxide and nitric oxide (NO) produced by the isolated cells. Obesity induced by hyperlipidic diet associated with endotoxemia states caused a reduction in the macrophages production of superoxide anion. Alteration to the nitric oxide production also occurred between the groups. Endotoxemia caused an increase in NO production; obesity, on the other hand, caused the reduction of this production. Even with the tendency to lower values, there was no alteration to the adhesion index and cellular viability between the groups. A decrease in the oxidizing function of alveolar macrophages in response to obesity associated with endotoxemia shows immune response compromise when facing an infectious process.
<b>Section Editor</b>	Not Assigned
<b>Key Words</b>	reactive oxygen species, immunity, obesity, endotoxemia, rats
<b>Subject Areas</b>	Biomedical Sciences/Experimental Biology
<b>Conflict of Interest</b>	No, there is no conflict of interest that I should disclose, having read the above statement.
<b>Publication Charges</b>	RRS