

Karla Melo Ferreira da Silva

Efeitos da obesidade sobre parâmetros imunológicos,  
hematológicos e bioquímicos em ratos endotoxêmicos

Recife

2010

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Karla Melo Ferreira da Silva

Efeitos da obesidade sobre parâmetros imunológicos,  
hematológicos e bioquímicos em ratos endotoxêmicos

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Nutrição do Centro de Ciências da  
Saúde da Universidade Federal de  
Pernambuco, para obtenção do título  
de Mestre em Nutrição.

Orientadora: Célia Maria Machado Barbosa de Castro

Recife

2010

Silva, Karla Melo Ferreira da  
Efeitos da obesidade sobre parâmetros  
imunológicos, hematológicos e bioquímicos em ratos  
endotoxêmicos / Karla Melo Ferreira da Silva. – Recife :  
O Autor, 2010.  
124 folhas : il., fig., tab.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de  
Pernambuco. CCS. Nutrição, 2010.

Inclui bibliografia e anexos.

1. Obesidade – Sistema imunológico. 2. Dieta  
hipercalórica. 3. Dieta hiperlipídica. 4. Endotoxemia. I.  
Título.

613.25  
613.25

CDU (2.ed.)  
CDD (22.ed.)

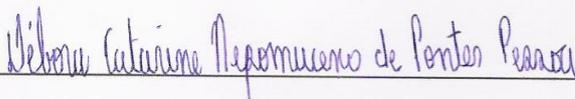
UFPE  
CCS2010-049

Karla Melo Ferreira da Silva

Efeitos da obesidade sobre parâmetros imunológicos, hematológicos e  
bioquímicos em ratos endotoxêmicos

Dissertação aprovada em: 05/03/2010

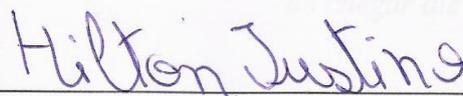
Banca examinadora:



Prof.<sup>a</sup> Dra. Débora Catarine Nepomuceno de Pontes Pessoa  
Universidade Federal de Pernambuco

---

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



Prof. Dr. Hilton Justino da Silva  
Universidade Federal de Pernambuco

Recife

2010

*Aos meus pais, pela oportunidade  
de chegar até aqui.*

## **Agradecimentos**

À professora Célia Maria Machado Barbosa de castro, por todas as oportunidades, todos os ensinamentos, toda paciência, carinho e amizade.

À Universidade Federal de Pernambuco, pela minha formação, pelos estágios de iniciação científica e pela oportunidade da continuidade nos trabalhos de pesquisa através do curso de mestrado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, por tornar possível meu ingresso no curso de mestrado e pelo apoio durante todo andamento do curso.

Ao CNPq pelo auxílio financeiro.

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

A Dr. França e Sr. Paulino, por sempre estarem dispostos a ajudar, aprendi muito com a experiência destes senhores.

Agradeço a Bruno Sampaio, por toda ajuda e companhia em todas as etapas de realização deste trabalho. À Etiene e Vanessa por todo o cuidado com os animais. À Judith, Fátima, Rafael e Thays pelo trabalho realizado nas análises microbiológicas.

À Rosangela Rosendo e Solange Porto, por toda companhia, amizade, sacrifícios e palavras de conforto.

A Bruno Galvão pela amizade, troca de experiências e conselhos.

Às amigas Alexandra Melo e Tatianne Ribeiro por toda ajuda, sempre em nome da amizade. Jamais irei esquecer o que fizeram por mim.

À Amanda Marcelino, por toda ajuda, palavras de incentivo e por sempre poder contar com ela.

À Raquel e Priscila, pelo companheirismo, amizade e força.

Às amigas que conheci na turma de mestrado, Maria e Patrícia, nutricionistas que me ajudaram muito a entender um pouco mais desta área. Passamos por muitos momentos difíceis juntas, mas sabemos que não foram só horas árduas, nós também demos muitas gargalhadas.

Sou intensamente grata à minha família e amigos pessoais, sem eles não teria sentido seguir em frente.

A Taciano por estar sempre ao meu lado durante estes dois anos de trabalho intenso, levantando minha cabeça quando tinha decepções e sempre com um sorriso no rosto para acompanhar minhas alegrias.

A todos que participaram de forma direta ou indireta para realização deste trabalho. Muito obrigada!

*"A grandeza não consiste em receber honras, mas em merecê-las."*

*Aristóteles*

## Resumo

Obesidade é atualmente um problema de saúde pública, devido ao aumento da sua prevalência e a conseqüente repercussão das suas comorbidades sobre a saúde da população. A administração de dieta hipercalórica e hiperlipídica para induzir obesidade é um modelo simples e possivelmente, um dos que mais se assemelha à realidade da obesidade nos seres humanos. Há uma crescente evidência sugerindo que a obesidade é uma doença inflamatória e torna-se motivo de preocupação em pacientes criticamente doentes. A endotoxemia é um quadro infeccioso grave decorrente da infecção generalizada, com maior freqüência, causada por endotoxinas ou lipopolissacarídeos (LPS) produzidos por bactérias Gram negativas. O efeito biológico do LPS é gerar e amplificar uma resposta inflamatória, porém, em casos de deficiência do sistema imune, tal resposta encontra-se prejudicada e infecções graves podem ser letais. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo analisar a relação entre obesidade e alterações de parâmetros do sistema imunológico, das células hematológicas e perfil bioquímico em ratos submetidos à endotoxemia. Para isto foram utilizados 40 ratos machos, albinos, da linhagem *Wistar*. Após o desmame, os animais foram divididos em 02 grupos, segundo o regime dietético a ser empregado: Dieta Padrão (DP, n=20) e Dieta Hipercalórica (DH, n=20). Após 18 semanas de consumo das dietas, quando os animais estavam com 147 dias de idade, metade dos ratos de cada grupo recebeu injeção intraperitoneal de LPS, enquanto a outra metade recebeu pela mesma via, salina. Em seguida, foram obtidos os seguintes grupos: DP-SALINA (n=10), DP-LPS (n=10), DH-SALINA (n=10) e DH-LPS (n=10). 24h após este procedimento foi coletado lavado bronco-alveolar (LBA) para contagem total e diferencial de leucócitos do lavado e, a partir de macrófagos isolados deste lavado, foi realizada taxa de fagocitose. Outro componente do sistema imune avaliado foi a microbiota da cavidade oral. Além destas análises imunológicas foi coletado sangue para análise do hemograma e de três parâmetros bioquímicos: glicose, triglicerídeos e colesterol total. Os animais e as dietas foram pesados regularmente para obtenção do crescimento ponderal, consumo alimentar e consumo calórico, além disso, a gordura visceral foi retirada e pesada. Utilizaram-se os testes estatísticos t de Student e Mann-Whitney. O consumo alimentar do grupo DH foi 32% menor, mesmo assim, foi acompanhado de maior consumo calórico de 11 kcal por dia, manutenção do peso corporal e aumento considerável da gordura visceral neste grupo, correspondendo a 3 vezes o valor da gordura visceral do grupo DP. Os parâmetros bioquímicos apresentaram modificação antes e após presença da endotoxemia. O hemograma apresentou mudanças nas séries vermelha e branca, porém não alterou a contagem de plaquetas. A contagem total das células imunes no local da infecção não apresentou alteração, porém estas células apresentaram perda de 31% da função de fagocitose após consumo da dieta rica hipercalórica. Por fim, no grupo DH as bactérias da microbiota oral apresentaram menor crescimento, com cerca de 80 mil colônias a menos, além de alteração do padrão das bactérias encontradas. Finalmente, os resultados encontrados poderão contribuir para aprofundar o conhecimento sobre as alterações orgânicas causadas pela obesidade e qual o comportamento destas alterações na presença de processos infecciosos graves, como na endotoxemia.

**Palavras chaves:** Obesidade; Dieta hipercalórica e hiperlipídica; Sistema imunológico; Hematologia; Bioquímica; Microbiota oral; Endotoxemia.

## Abstract

Obesity is currently a public health problem because of its increasing prevalence and the consequent impact of comorbidities on their health. Administration of high fat calorie diet to induce obesity is a simple and possibly one that most closely resembles the reality of obesity in humans beings. There is growing evidence suggesting that obesity is an inflammatory disease and becomes a concern in critically ill patients. Endotoxemia is a severe infectious due to overwhelming infection, most often caused by endotoxin or lipopolysaccharide (LPS) produced by Gram-negative bacteria. The biological effect of LPS is to generate and amplify an inflammatory response, however, in cases of deficiency of the immune system, this response is impaired and severe infections can be lethal. In this context, this study aimed to analyze the relationship between obesity and changes in parameters of immune system, cells hematological and biochemical profiles in rats with endotoxemia. For this we used 40 male, albino, Wistar rats. After weaning, the animals were divided into 02 groups according to the dietary regimen to be used: a standard diet (DP, n = 20) and high calorie diet (DH, 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 received intraperitoneal injection of LPS, while the other half received the same channels saline. Next, we obtained the following groups: DP-SALINE (n = 10), DP-LPS (n = 10), DH-SALINE (n = 10) and DH-LPS (n = 10). 24 hours after this procedure was collected bronchoalveolar lavage (LBA) for total and differential counts of leukocytes, the macrophages isolated from this lavage was performed phagocytosis rate. Another component of the immune system evaluated was the microbiology of the oral cavity. In addition to these reviews, blood was collected for analysis of blood cells and three biochemical parameters were evaluated: glucose, triglycerides and total cholesterol. Animals and diets were weighed regularly to obtain the weight growth, food consumption and calorie intake, in addition, visceral fat was removed and weighed. We used statistical tests, Student t and Mann-Whitney. Food consumption of the DH group was 32% smaller, yet was associated with greater caloric intake of 11 kcal per day, maintaining body weight and increase in visceral fat in this group, accounting for 3 times the amount of visceral fat group DP. The biochemical parameters showed changes before and after the presence of endotoxemia. The blood count showed changes in red or white, but did not alter the platelet count. The total count of immune cells at the infection site did not change, but these cells had lost 31% of the function of phagocytosis after consumption of high calorie diet. Finally, in the DH group bacteria of the oral microbiota showed lower growth, with about 80 thousand colonies unless, in addition to changing the pattern of bacteria found. Finally, the results could help to increase knowledge of organic changes caused by obesity and how their behavior changes in the presence of serious infectious processes, such as in endotoxemia.

**Key words:** Obesity, hight calorie diet; immune system, hematology, biochemistry, oral microbiota; Endotoxemia.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b>	Organograma de divisão dos grupos.....	31
<b>Figura 2.</b>	Componentes da dieta hipercalórica.....	32
<b>Figura 3.</b>	Dieta hipercalórica pronta.....	32
<b>Figura 4.</b>	Coleta de sangue.....	34
<b>Figura 5.</b>	Contagem total de leucócitos.....	35
<b>Figura 6.</b>	Contagem de hemácias.....	36
<b>Figura 7.</b>	Anestesia.....	38
<b>Figura 8.</b>	Traqueostomia.....	38
<b>Figura 9.</b>	Coleta do LBA.....	38
<b>Figura 10.</b>	LBA coletado.....	38
<b>Figura 11.</b>	LBA armazenado.....	38
<b>Figura 12.</b>	Amostra de LBA diluída em Corante Azul de Tripan.....	39
<b>Figura 13.</b>	Citocentrífuga.....	39
<b>Figura 14.</b>	Centrifugação do LBA.....	40
<b>Figura 15.</b>	Precipitado de macrófagos.....	40
<b>Figura 16.</b>	Preparo do fungo para realização da taxa de fagocitose.....	41
<b>Figura 17.</b>	Câmara úmida.....	41
<b>Figura 18.</b>	Coleta da microbiota oral.....	42
<b>Figura 19.</b>	Procedimentos para identificação e contagem das bactérias.....	42

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Ingredientes necessários para confecção de 4,0 kg de dieta hipercalórica.....	32
<b>Tabela 2.</b>	Composição centesimal das dietas padrão e hipercalórica.....	32

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DP	Grupo dieta padrão
DH	Grupo dieta hipercalórica
LPS	Lipopolissacarídeos
NaCl	Cloreto de sódio
LBA	Lavado Broncoalveolar
WHO	Organização Mundial da Saúde
Lp	Leptina
Acrp30	Adiponectina
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
TNF- $\alpha$	Fator de necrose Tumoral Alfa
POF	Pesquisa de Orçamentos Familiares
IBGE	Instituto brasileiro de Geografia e Estatística
PCR	Proteína C Reativa
NK	Célula Natural Killer
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
EDTA	Ácido etileno diaminotetraacético
BHI	Brain Heart Infusion
UFC	Unidades formadoras de colônias

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>APRESENTAÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
2.1	Transição nutricional.....	17
2.2	Obesidade.....	18
2.3	Dieta hipercalórica como modelo de indução da obesidade.....	19
2.4	Obesidade e Sistema imune.....	20
2.4.1	Leptina.....	21
2.4.2	Interleucinas.....	22
2.4.3	Adiponectina.....	23
2.5	Sistema Imunológico.....	23
2.6	Macrófagos e Fagocitose.....	25
2.7	Microbiota.....	26
2.8	Endotoxemia.....	27
2.9	Obesidade, imunidade e doença.....	28
<b>3</b>	<b>MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
3.1	Desenho do estudo.....	30
3.2	Animais.....	30
3.3	Divisão dos Grupos.....	30
3.4	Dieta hipercalórica.....	31
3.5	Evolução Ponderal.....	33
3.6	Consumo Alimentar e calórico.....	33
3.7	Análises.....	33
3.7.1	Parâmetros bioquímicos.....	33
3.7.2	Parâmetros hematológicos.....	35
3.7.3	Recrutamento de células imunes para o foco infeccioso.....	37
3.7.4	Função dos macrófagos.....	40
3.7.5	Microbiota Oral.....	42
3.7.6	Obtenção da gordura visceral.....	43
3.8	Análise estatística.....	43
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>44</b>
<b>5</b>	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>104</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>105</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>116</b>

## 1 APRESENTAÇÃO

Segundo Diemen, Trindade e Trindade (2006), a etiologia da obesidade é multifatorial e está se tornando um problema de saúde pública, devido ao aumento da sua prevalência e à conseqüente repercussão das suas comorbidades sobre a saúde da população. Uma vez considerado um problema em países de rendimento elevado, sobrepeso e obesidade, estão agora aumentando drasticamente em países de baixa e média renda, especialmente em áreas urbanas.

A organização mundial da saúde (WHO, 2005) define sobrepeso e obesidade como anormal ou excessiva acumulação de gordura que apresenta um risco para a saúde. São descritos como importantes fatores de risco para uma série de doenças crônicas, incluindo diabetes, doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer como mama, cólon e endométrio, além de causar perturbações músculo-esqueléticas, especialmente osteoartrose.

Além destas alterações a obesidade leva também a uma disfunção imune (BOVILL et al., 1996; SWEETMAN et al., 1997), a qual é acompanhada por um aumento da taxa de infecções e aumento do risco de cicatrização retardada (KHAN; BOWMAN, 1999; PI-SUNYER et al., 1999). Ou seja, a obesidade caracteriza-se por gerar prejuízo no estado normal do organismo, modificando completamente algumas das funções vitais como a cardíaca, pulmonar, endócrina e imune (CONWAY; RENÉ, 2004).

Atualmente sabe-se que o tecido adiposo, além de ter função de armazenamento de reservas energéticas, tem importantes funções como órgão endócrino ao produzir diversos hormônios e moléculas de sinalização. Algumas das moléculas secretadas estão ativamente implicadas na regulação da função imune, um exemplo já conhecido é o da Leptina (Lp) (AHIMA; FLIER, 2000). Há uma evidência crescente de que a Lp, além de seus efeitos centrais no controle da ingestão e nas reservas de energia, está envolvida na deficiência da resposta imune humoral e celular (OTERO et al., 2005). O peptídeo Adiponectina (Acrp30) é também secretado pelo adipócito e participa na resposta imune atuando como protetor da inflamação (RUDIN; BARZILAI, 2005). As Interleucinas, como a Interleucina-6 (IL-6) e a Interleucina-8 (IL-8), e o Fator de necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ) são os componentes de participação direta no sistema imune que são também secretados pelo tecido adiposo (OTERO et al., 2005).

O estado nutricional tem uma importante influência sobre o sistema imune e sua função é muito sensível a alterações nutricionais. Tanto a desnutrição quanto a obesidade são conhecidas por alterar a imunocompetência. Embora ligeiro excesso de vários nutrientes, especialmente nas populações com deficiências nutricionais, pode estimular o sistema imunitário, a ingestão excessiva de lipídeos e muitos micronutrientes é conhecida por ter conseqüências negativas sobre vários componentes do sistema imunológico (SAMARTÍN; CHANDRA, 2001).

Portanto a suscetibilidade de adquirir infecções, a incapacidade em combatê-las, a prevalência de desenvolver doenças auto-imunes e desenvolver doenças crônicas inflamatórias, estão elevadas nos indivíduos obesos (ALVES, 2006).

Há uma crescente evidência sugerindo que a obesidade é uma doença inflamatória. Ela está a tornar-se um motivo de preocupação em pacientes criticamente doentes. Um aumento na morbidade por sepse em pacientes obesos comparados com as pessoas magras é causa de crescente preocupação (VACHHARAJANI; VITAL, 2006).

A grande similaridade e homologia entre os genomas de roedores e seres humanos tornam os modelos animais uma grande ferramenta para estudar as condições que afetam os seres humanos, que podem ser simuladas em ratos. 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 (DIEMEN; TRINDADE; TRINDADE, 2006).

As conseqüências já conhecidas da obesidade sobre os diversos sistemas do organismo induzem a hipótese de que a administração de dieta hipercalórica e hiperlipídica a partir do desmame resulta para o animal conseqüências negativas sobre a defesa contra infecções, mudanças no perfil hematológico e alterações em taxas bioquímicas. Acredita-se que o consumo contínuo desta dieta leva a aumento do consumo alimentar, ingestão calórica, peso corporal, da gordura visceral e dos níveis circulantes de glicose, colesterol e triglicerídeos. Com base nas alterações destes parâmetros, espera-se que o recrutamento e a função das células imunes estejam comprometidos, o hemograma apresente alterações e a microbiota normal esteja afetada.

Pretende-se com este estudo consolidar as hipóteses anteriormente propostas, além de servir como base para entrosamento de diversos fatores ainda discordantes na literatura a respeito do uso da dieta hipercalórica. Assim, o objetivo geral deste estudo foi analisar possíveis danos causados pela obesidade induzida por dieta hipercalórica e hiperlipídica sobre aspectos da resposta imunológica, das células hematológicas e de

análises bioquímicas, em casos de infecção grave causada por endotoxina bacteriana. Para obtenção dos objetivos gerais, os seguintes objetivos específicos foram determinados: comparar a gordura visceral e o peso corporal de animais obesos e eutróficos; identificar o consumo alimentar e calórico dos animais; avaliar o efeito da dieta hipercalórica e hiperlipídica sobre concentrações de glicose, colesterol total e triglicérides do sangue; detectar alterações nas séries branca e vermelha do sangue periférico; examinar a contagem de plaquetas; analisar contagem de células imunes no foco infeccioso; avaliar a fagocitose de macrófagos alveolares; estudar uma possível mudança na microbiota da cavidade oral.

Todos os resultados da presente pesquisa foram relatados em quatro artigos científicos, no qual um deles já foi enviado para a revista científica *Oral microbiology and immunology* (Anexo B).

Além da confecção dos artigos científicos, três trabalhos foram apresentados em congressos científicos, onde dois destes trabalhos receberam premiação de primeiro e segundo melhor trabalho do congresso (Anexos de C a F).

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Transição nutricional

Pesquisas da WHO em 2005 indicam que a nível mundial aproximadamente 1,6 bilhões de adultos (mais de 15 anos) apresentavam sobrepeso e por volta de 400 milhões de adultos eram obesos. Pelo menos 20 milhões de crianças de idade inferior a cinco anos apresentaram excesso de peso a nível mundial em 2005. A WHO estima que, até 2015, aproximadamente 2,3 bilhões de adultos terão sobrepeso e mais de 700 milhões serão obesos.

De acordo com Coutinho, Gentil e Toral (2008), muitos países de baixa e média renda estão agora a enfrentar uma "dupla carga" de doença: enquanto eles continuam a lidar com os problemas das doenças infecciosas e desnutrição, ao mesmo tempo estão experimentando um rápido surto de fatores de risco de doenças crônicas tais como obesidade e sobrepeso. Estes autores afirmam que não é raro encontrar desnutrição e obesidade existentes lado a lado no interior do mesmo país, da mesma comunidade e até mesmo dentro do mesmo agregado familiar. Este duplo fardo é causado pela falta de pré-natal seguida pela exposição ao alto teor de matérias gordas, altamente energéticas, alimentos pobres em micronutrientes e falta de atividade física.

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; GENTIL; TORAL, 2008). Diversos estudos têm demonstrado que o Brasil, assim como outros países em desenvolvimento, convive com a transição nutricional, determinada freqüentemente pela má alimentação (BATISTA FILHO; RISSIN, 2003; BERMUDEZ; TUCKER, 2003).

No Brasil, dados da Pesquisa de Orçamentos Familiares – POF 2002/2003 (Instituto brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2004) mostram que num universo de 95,5 milhões de pessoas de 20 anos ou mais de idade há 3,8 milhões de pessoas (4,0%) com déficit de peso e 38,8 milhões (40,6%) com excesso de peso, das quais 10,5 milhões são consideradas obesas. Esse padrão se reproduz, com poucas variações, na maioria dos grupos populacionais analisados no País. No Brasil, os percentuais de déficits de peso vêm declinando ao longo do tempo, tanto para homens quanto para

mulheres. Entre as décadas de 1970 e de 1980, esse déficit caiu 50%, mostrando pequena redução a partir de 1989.

Segundo Batista Filho e Rissin (2003), ao mesmo tempo em que declina a ocorrência da desnutrição em crianças e adultos num ritmo bem acelerado, aumentam a prevalência de sobrepeso e obesidade na população brasileira. A projeção dos resultados de estudos efetuados nas últimas três décadas é indicativa de um comportamento claramente epidêmico do problema. Estabelece-se, dessa forma, um antagonismo de tendências temporais entre desnutrição e obesidade, definindo uma das características marcantes do processo de transição nutricional do país.

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 as causas de morte mais comuns atualmente. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (2003), a hipertensão arterial e a obesidade correspondem aos dois principais fatores de risco responsáveis pela maioria das mortes e doenças no mundo.

## **2.2 Obesidade**

Segundo Fisberg (2004), a obesidade pode ser considerada como um acúmulo anormal ou excessivo de tecido gorduroso, regionalizado ou em todo o corpo, caracterizando-se como uma das doenças não transmissíveis que mais cresce em todo o mundo, pois, nas últimas décadas, tem se apresentado nas diversas faixas etárias. Ela pode ser considerada como a doença de maior morbidade no paciente adulto, e está relacionada à pobreza, raça, condições genéticas e ambientais.

A obesidade pode ser descrita como a “Nova Síndrome Mundial” (NAMMI et al., 2004), sendo uma condição complexa, com dimensões sociais e psicológicas sérias, afetando a indivíduos de todas as idades e grupos socioeconômicos (WHO, 2003). A morbidade associada inclui, por exemplo, diabetes tipo II, dislipidemias, hipertensão, doença coronariana e cerebrovascular, colelitíase, osteoartrite, insuficiência cardíaca, síndrome de apnéia do sono, alterações menstruais, esterilidade e alterações psicológicas (MUÑOZ; MAZURE; CULEBRAS, 2004).

A acumulação excessiva de tecido adiposo (obesidade) deriva de um aporte calórico excessivo e crônico de substratos combustíveis presentes nos alimentos e bebidas (proteínas, hidratos de carbono, lipídios e álcool) em relação ao gasto

energético (metabolismo basal, efeito termogênico e atividade física). Nessa acumulação intervêm tanto os hábitos alimentares e de estilo de vida, os fatores sociológicos e as alterações metabólicas e neuro-endócrinas, como os componentes hereditários (MARTÍNEZ; FRÜHBECK, 1996; MARQUES-LOPES et al., 2001, 2004; CORBALAN et al., 2002).

A crescente preocupação com o aumento da incidência da obesidade está relacionada, principalmente, ao aparecimento da síndrome metabólica. Segundo a Sociedade brasileira de cardiologia (2005) e Junqueira, Romêo Filho e Junqueira (2009), a síndrome metabólica se traduz numa entidade freqüente nos países desenvolvidos, bem como em nosso meio. É definida como um conjunto de fatores de risco cardiovasculares relacionados à obesidade visceral e resistência insulínica, que levam a um aumento da mortalidade geral, especialmente de origem cardiovascular.

### **2.3 Dieta hipercalórica como modelo de indução da obesidade**

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, ooforectomia, alimentação com dietas hipercalóricas e manipulação genética para obesidade (DIEMEN; TRINDADE; TRINDADE, 2006).

Ainda de acordo com estes autores, a administração de dieta hipercalórica é o modelo que mais condiz com a realidade da obesidade em seres humanos. Há vários tipos de dietas para induzir obesidade que se revelam eficazes. Algumas dietas hipercalóricas são realizadas acrescentando hidratos de carbono e outras, aumentando a porcentagem de gorduras, a maioria delas varia entre 3,7 kcal/g e 5,4 Kcal/g. Todas são altamente saborosas e induzem obesidade.

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).

A dieta hiperlipídica exerce diferentes efeitos sobre o metabolismo geral (HILL et al., 1992; GHIBAUDI et al., 2002), contribuindo para um quadro patogenético que se

manifesta principalmente no metabolismo de lipídeos (ZARAGOZA-HERMANS, 1974; AXEN; DIKEAKOS; SCALAFANI, 2003).

Nos últimos anos diversos estudos têm utilizado dieta hipercalórica com aumento de lipídeos como modelo para induzir obesidade. O consumo da dieta hiperlipídica na maioria das pesquisas varia entre 08 a 15 semanas (BERNARDES et al., 2004; ESTADELLA et al., 2004; DUARTE et al., 2006; EGUCHI et al., 2008; FRANCO; CAMPOS; DEMONTE, 2009; PAULI et al., 2009). Tais estudos contemplam uma diversificada gama de análises, desde metabolismo de lipídios e carboidratos, exercício físico, síndrome metabólica e comportamento hormonal. Apesar das várias pesquisas utilizando este tipo de dieta, a relação da obesidade com alterações do sistema imunológico, sobretudo quando se estuda o comportamento após infecção grave, é tema inovador na literatura científica.

#### **2.4 Obesidade e Sistema imune**

Os processos imunológicos envolvidos na defesa do organismo são afetados pelo estado nutricional. Assim, um desequilíbrio crônico entre ingestão e gasto energético conduz a situações de obesidade, que podem influenciar de forma inespecífica e específica nas respostas imunes humoral e celular. (WOMACK et al., 2007)

Segundo Alves (2006), essas repercussões imunológicas, mais a complexa interação que existe entre elas, levam o indivíduo obeso a modificar sua resposta imune, tanto na imunidade inata como na imunidade adquirida. A resposta imunológica, frente às agressões agudas e crônicas na obesidade, está afetada devido às alterações das concentrações de mediadores inflamatórios, de populações linfocitárias, de células fagocitárias, de células apresentadoras de antígenos, pela ativação do sistema de complemento, etc.

Estudo com mulheres portadoras do vírus HIV, com diferentes pesos corporais, apresentou que as associações entre peso e diminuição das contagens de células imunes ficaram mais fortes com o aumento de peso corporal (WOMACK et al., 2007).

A visão tradicional do tecido adiposo como um passivo reservatório para o armazenamento de energia não é mais válido (KERSHAW; FLIER, 2004). Tão cedo, em 1987, o tecido adiposo foi identificado como um local importante para o metabolismo de esteróides sexuais (SIITERI, 1987) e produção de Adipsina, uma das

primeiras proteínas produzida pelos adipócitos a ser identificada, além disso, têm funções bem definidas nos estádios inflamatórios (COSTA; DUARTE, 2006).

As posteriores identificação e caracterização da leptina, em 1994, estabeleceram firmemente o tecido como um adiposo órgão endócrino (TRAYHURN; WOOD, 2005).

O tecido adiposo é agora conhecido por expressar e secretar uma variedade de peptídeos bioativos, conhecidos como adipocinas, que atuam a nível autócrino, parácrino e sistêmico. As adipocinas por ele produzidas têm ações diversas, podendo-se agrupá-las de acordo com a sua principal função, como: função imunológica, cardiovascular, metabólica e endócrina. Dentro do primeiro grupo incluem-se a IL-6, o TNF- $\alpha$  e os fatores do complemento B, C3 e D (adipsina). Estas moléculas têm funções bem definidas nos estádios inflamatórios (COSTA; DUARTE, 2006).

Assim, além do repertório biológico necessário para armazenar e liberar energia, o tecido adiposo contém a maquinaria metabólica para permitir a comunicação com órgãos distantes, incluindo o sistema nervoso central (KERSHAW; FLIER, 2004). Ainda de acordo com estes autores, através desta interativa rede, o tecido adiposo é integralmente envolvido na coordenação uma variedade de processos biológicos, incluindo o metabolismo energético, função neuroendócrina e função imunológica. A importante função endócrina do tecido adiposo é enfatizada pelas conseqüências adversas metabólicas de ambos: excesso e deficiência de tecido adiposo.

Várias linhas de evidências têm apoiado um elo entre tecido adiposo e células imunológicas (MARTÍ; MARCOS; MARTINEZ, 2001).

#### **2.4.1 Leptina**

Adipócitos secretam leptina em proporção direta a massa de tecido adiposo, bem como o estado nutricional (FAIN et al., 2004; WAJCHENBERG, 2000). A Lp ativa linfócitos T, aumenta a resposta Th1, ativa monócitos, entre outros (JUGE-AUBRY; MEIER, 2002). A hiperleptinemia causada pela obesidade está associada a uma resistência à Lp , onde se observam prejuízos variáveis na resposta imune (ALVES, 2006).

O mais característico na hiperleptinemia é uma incidência aumentada a infecções. Neste contexto, a dessensibilização do receptor de Lp é percebida pelas células T como um estado de deficiência de Lp, o que conduz a uma disfunção do sistema imune similar à produzida pela desnutrição (FAIN et al., 2004).

Em estados de normalidade, a Lp atua estimulando a liberação de citocinas pró-inflamatórias por parte dos monócitos; citocinas que produzem uma estimulação dos linfócitos T (ALVES, 2006). Quando existe uma alteração destes processos, existe uma proliferação linfocitária anormal com uma redução na capacidade funcional dos linfócitos (MARTÍ; MARCOS; MARTÍNEZ, 2001), devido a que a Lp é um modulador da ativação dos mesmos (SÁNCHEZ-MARAGALET et al., 2003).

Esta susceptibilidade aumentada a infecções, é causada por alterações nas subpopulações de células T, com um desbalanço entre as respostas Th1 e Th2, com uma diminuição e aumento respectivamente. (MUÑOZ; MAZURE; CULEBRAS, 2004).

#### 2.4.2 Interleucinas

Os níveis de IL-6 e da produção de Proteína C Reativa (PCR) são elevados em indivíduos obesos, porque a síntese de PCR pelo fígado é regulada por IL-6 (BULLÓ et al., 2003), e, além disso, o 30% das concentrações circulantes totais de IL-6 têm origem no tecido adiposo (LEMIEUX et al., 2001; TRAYHURN; WOOD, 2004).

O estudo de Bulló et al (2003) mostrou que o TNF- $\alpha$  e a Lp estejam muito expressos na obesidade e podem induzir uma maior produção de IL-6 e portanto da PCR e de outros marcadores de fase aguda da resposta imune. Além disso, o TNF- $\alpha$  secretado pelo adipócito está também relacionado a outros marcadores inflamatórios, como a contagem de leucócitos. Apesar dos altos níveis de expressão no tecido adiposo na obesidade, o TNF- $\alpha$  circulante tem um aumento pouco significativo, sendo possível que a ação na obesidade seja local. Por outro lado TNF- $\alpha$  é um ativador potente de macrófagos, por isso é razoável que os macrófagos se acumulem no tecido adiposo no obeso. Assim como o TNF- $\alpha$  estimula a síntese de IL-6 no adipócito no obeso, exerce efeitos similares sobre a IL-8, também secretada pelo adipócito. Existe um aumento de IL-8 na obesidade, onde a fonte principal é o tecido adiposo (BRUUN et al., 2002; STRACZKOWSKI et al., 2002).

Como o TNF- $\alpha$  está aumentado em obesos, isso pode ser a causa do aumento na produção de IL-8 nestes pacientes, onde um aumento prolongado de IL-8 poderia ser suficiente para ser aterogênico. Segundo Zhang e Chen (2002), a IL-8 afeta a adesão dos neutrófilos ao endotélio e induz a migração trans-endotelial de neutrófilos. A IL-8 também tem atividades quimiotáxicas *in vitro* contra os linfócitos T e os basófilos. A

IL-8 pode ter, portanto um papel importante na gênese e no desenvolvimento da inflamação e aterosclerose (RUDIN; BARZILAI, 2005).

Portanto, a obesidade é caracterizada por um estado crônico de baixo grau de inflamação. O motivo para afirmar isso é o aumento dos níveis circulantes de vários marcadores inflamatórios, como as citocinas pró-inflamatórias e as proteínas de fase aguda.

### **2.4.3 Adiponectina**

Em relação à Acrp30, ela está diminuída na obesidade (BRUUN et al., 2003; ENGELI et al., 2003; KERN et al., 2003). Em estudo de Bruun et al. (2003), foi verificado que os níveis circulantes de IL-6 e TNF- $\alpha$  têm correlação negativa com os níveis de Acrp30, e de forma pouco significativa com a IL-8. A produção local de IL-6 e TNF- $\alpha$  no tecido adiposo pode inibir diretamente a produção local de Acrp30. A Acrp30 também suprime predominantemente a proliferação de precursores de mielomonócitos. Inibe a função de macrófagos maduros, a fagocitose e a produção de citocinas. Estes resultados sugerem que a Acrp30 seja um regulador importante da resposta inflamatória. Ainda mais, a Acrp30 também suprime a formação de unidades de colônia de macrófagos-granulócitos, de unidade de colônias de macrófagos, e de granulócitos. Regula as respostas inflamatórias negativas por pelo menos dois mecanismos: a supressão da função de macrófago maduro e a inibição do crescimento de precursores de macrófagos. O anterior é considerado por ter um papel importante no controle da resposta inicial da inflamação, e o posterior pode atuar em eventos de inflamação tardia para prevenir respostas imunes provenientes da cronicidade contínua (YOKOTA et al., 2000).

## **2.5 Sistema Imunológico**

O sistema imunológico protege o indivíduo através de diferentes mecanismos celulares e moleculares, que são projetados para identificar as suas próprias células e substâncias, mas também para detectar e destruir organismos estrangeiros e seus produtos (MCHEYZER-WILLIAMS, 1997; ABBAS; JANEWAY, 2000).

As células e moléculas responsáveis pela imunidade formam o sistema imunológico, e a sua resposta coletiva e coordenada á introdução de substâncias

estranha é chamada de resposta imunológica e inclui a imunidade natural e a imunidade adquirida (UTHAISANGSOOK et al, 2002). Esta resposta é um processo complexo de defesa efetivo no controle da expansão da infecção e da erradicação do organismo invasor (PEAKMAN; VERGANI, 1999; CHANDRA, 1997).

A imunidade natural 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 citocinas derivadas de macrófagos (fator de necrose tumoral, interferon-alfa, interferon-beta). A imunidade natural fornece a linha de defesa inicial contra os microrganismos e, em muitos casos, consegue eliminá-los. Esta imunidade estimula as respostas imunes adaptativas e pode influenciar a natureza das respostas adaptativas para torná-las otimamente eficazes contra diferentes tipos de microrganismos (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

Em contraste 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, 1999). 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.

Os dois níveis do sistema de imunocompetência não são isolados, mas eles funcionam dentro de uma coordenada rede, a fim de desenvolver uma defesa integrada contra indesejáveis infecções, lesão celular ou mecanismos patogénicos (JANEWAY et al., 1999).

## **2.6 Macrófagos e Fagocitose**

No sistema imune há células cuja função primária é identificar, ingerir e destruir microrganismos, destacando-se os macrófagos teciduais. Estes são derivados da

migração dos monócitos sanguíneos para o tecido. Os macrófagos são residentes no tecido conjuntivo subepitelial, no interstício dos órgãos parenquimatosos, no revestimento dos sinusóides vasculares do fígado e do baço e nos seios linfáticos dos linfonodos, e atuam principalmente na fagocitose (SIBILLE; REYNOLDS, 1990).

Assim, essas células fagocíticas estão estrategicamente colocadas em todos os locais onde microrganismos podem entrar no hospedeiro. Quando comparados aos neutrófilos, outro tipo de célula fagocítica, os macrófagos persistem mais tempo nos locais de inflamação e não são terminalmente diferenciados, podem sofrer divisão celular em um sítio inflamatório (ABBAS; LICHTMAN, 2005).

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, agem liberando citocinas que iniciam e amplificam o processo inflamatório (MÁRTON; KISS, 2000).

Essas células ativadas apresentam uma série de diferenças morfológicas, funcionais e metabólicas quando comparadas às células não ativadas. Nesse processo, os macrófagos podem apresentar alterações, tais como: aumento de tamanho, de aderência, da velocidade de deslocamento e da atividade fagocítica (O'KEEFE et al., 1997).

Na fagocitose, o micróbio adere à superfície do macrófago, acontecimento medido por mecanismo de reconhecimento por parte das células fagocitárias. Dependendo de sua natureza, uma partícula aderida à membrana pode dar início à fase de ingestão, na qual passa a ficar em um vacúolo denominado fagossoma. Um grânulo lisossômico, então, funde-se com o vacúolo para formar o fagolisossoma, no qual o micróbio ingerido é atacado por uma bateria de mecanismos (ROITT, 1995).

Segundo Abbas e Lichtman (2005), as respostas funcionais dos fagócitos na defesa do hospedeiro consistem em etapas sequenciais: recrutamento ativo das células para o local da infecção, reconhecimento dos microrganismos, fagocitose e destruição dos microrganismos ingeridos. No processo de fagocitose, os fagócitos ingerem microrganismos ligados e estes vão para dentro de vesículas, onde os microrganismos são destruídos. Ainda de acordo com estes autores, a fagocitose é um processo de englobamento de partículas dependente do citoesqueleto, o fagócito estende uma projeção de membrana ao redor do microrganismo e o desloca para o interior de uma vesícula intracelular.

## 2.7 Microbiota

Um parasita é um organismo que habita a superfície ou o interior de outro organismo vivo, a fim de encontrar o ambiente e as condições necessárias ao seu crescimento e reprodução. Cada categoria de microrganismo apresenta características próprias que determinam formas de relação com os hospedeiros e, assim, levam às características das doenças causadas pelos organismos. Se o parasita lesar o hospedeiro em grau suficiente, os distúrbios resultantes manifestar-se-ão sob a forma de doença (JAWETZ et al, 1991).

Porém, nem sempre os microrganismos são maléficos ao hospedeiro, algumas espécies apresentam benefícios à saúde. A superfície das mucosas e da pele do organismo humano é colonizada por uma microbiota característica. Esta faz parte dos constituintes da resposta imune inata. Poucas regiões do organismo não apresentam microrganismos; como exemplos têm-se a laringe, o cérebro e os órgãos internos. A microbiota normal, os organismos que vivem no nosso corpo sem causar doença, é imprescindível para a proteção contra o estabelecimento de micróbios patogênicos (MANDELL; DOUGLAS; BENNETT, 2005).

Os microrganismos encontrados constantemente nas superfícies corporais são comensais. Seu desenvolvimento em uma determinada área depende de fatores fisiológicos como temperatura, umidade e da presença de certas substâncias nutritivas e inibitórias. Sua presença em certas regiões desempenha um papel definido na manutenção da saúde.

Nas mucosas e na pele, a microbiota endógena pode impedir a colonização por microrganismos patogênicos e possível doença. Quando o número habitual de microrganismos residentes está muito reduzido, os invasores oportunistas podem então, se estabelecer mais facilmente (BURTON; ENGELKIRK, 2005).

O feto é normalmente asséptico, *in utero*. Durante e após o nascimento, um recém-nascido é exposto a muitos microrganismos de sua mãe, do alimento, do ar, e de tudo com que ele entra em contato. Tanto os micróbios benéficos quanto os nocivos se instalam na pele, em todas as partes abertas do corpo, bem como nas membranas mucosas da boca, ânus e trato urogenital. Nestas áreas, a umidade e o ambiente aquecido fornecem excelentes condições para o crescimento. Durante a infância a população bacteriana aumenta. As proporções dos microrganismos cultiváveis

predominantes na área do sulco gengival de crianças em idade pré-escolar assemelham-se bastante às encontradas em adultos (JORGE, 1998).

Na cavidade bucal, por exemplo, é encontrada uma das mais concentradas e variadas populações microbianas, cuja localização principal está no dorso da língua, no sulco gengival e na placa dental coronariana (LINDHE, 2005). Estima-se que a saliva contém  $10^8$  bactérias/ml e as placas dentais,  $10^{11}$  bactérias/mL (GUTIÉRREZ et al., 2003). Sendo então a microbiota da cavidade oral um ótimo local de estudo da imunidade inata formada pelas bactérias sapróbias.

## **2.8 Endotoxemia**

Os macrófagos são as células iniciadoras das reações inflamatórias e estas se caracterizam morfológicamente, pela saída de líquido e células do sangue para o interstício (FILHO, 2000). Assim, sabe-se que estas células na sepse, sofrem intensa estimulação, causada por endotoxinas ou lipopolissacarídeos (LPS) produzidos por bacilos Gram negativos desencadeando reação inflamatória sistêmica. LPS se localiza na parte externa da membrana bacteriana e é liberado a partir da replicação e/ou morte bacteriana (DE CASTRO et al., 1997).

O efeito biológico da endotoxina é de gerar e amplificar a resposta inflamatória. A administração parenteral 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 sítio inflamatório/infeccioso.

Nesse particular, o pulmão é sensível aos efeitos do LPS, sendo o primeiro órgão a ser atingido na endotoxemia seguido do fígado, intestino e rim (WELBOURN; YOUNG, 1992). Durante a endotoxemia, as complicações pulmonares, incluindo edema pulmonar e falência respiratória, são as maiores causas de morbi-mortalidade em pacientes sépticos (WANG et al., 1994).

Assim, a aplicação do LPS funciona como um adequado modelo para o estudo das alterações fisiológicas durante infecções bacterianas, já que reproduzem muitos dos sintomas clínicos observados em pacientes com septicemia por bactérias Gram negativas (LUCHI; MORRISON, 2000). Tais reações apresentam-se mais exacerbadas após 24 horas da aplicação do LPS (DE CASTRO et al., 1997). A endotoxemia aguda, caracterizada por altos níveis de endotoxina no sangue, causa reação inflamatória com

injúria endotelial, hipotensão, falência dos órgãos e morte (HEWETT; ROTH, 1993; SUNIL et al., 2002).

## **2.9 Obesidade, imunidade e doença**

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

A obesidade tem sido identificada como fator de risco de infecção e falta de cicatrização após cirurgias (FASOL et al., 1992; MOULTON et al., 1994). Além disso, queimaduras em pessoas com sobrepeso mostraram maior risco de infecção e bacteremia quando comparados com pacientes com peso adequado, bacteremia e sepse ocorreram mais nos obesos quando comparados com os não obesos, ao passo que a terapia antibiótica foi exigida por duas vezes mais dias no grupo obeso do que no grupo controle (GOTTSCHLICH et al., 1993).

Também tem sido relatada deficiência em produção de anticorpos após vacina de hepatite B (WEBER et al., 1985, 1986). Apesar das evidências destes dados de imunocompetência em humanos, ainda há poucos estudos relacionando a resposta imune de obesos e eutróficos, e os que existem mostram apenas uma pequena gama de análises imunológicas (NIEMAN et al, 1999).

Um aumento na morbidade por sepse em pacientes obesos comparados com as pessoas magras é causa de crescente preocupação (VACHHARAJANI; VITAL, 2006).

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.

Outro estudo experimental sobre a influência da obesidade na resposta imune em uma população adulta indica que a obesidade está relacionada com a elevação de leucócitos e linfócitos, que foram acompanhadas de maior fagocitose por mais monócitos e granulócitos (NIEMAN et al., 1999). Os autores deste estudo sugerem que o colesterol sérico, triglicérides e glicemia podem estar relacionados a prejuízos em vários aspectos da imunidade.

Outro estudo realizado por Nieman et al. (1996) em mulheres obesas e não-obesas revelou que a gordura corporal está positivamente correlacionada com o total de leucócitos, neutrófilos, monócitos e linfócitos. No entanto, eles não conseguiram estabelecer qualquer comprometimento de funções imunes nos indivíduos obesos. Neste estudo a função das células T foi comparável entre obesos e não-obesos, enquanto a função das células B foi cerca de 50% maior no grupo de obesos. Além disso, a fagocitose de monócitos e granulócitos não foi influenciada pela obesidade. Já a atividade oxidativa de monócitos e granulócitos foi maior nos obesos.

Este estudo também mostrou que, após um período de perda de peso, a restrição energética moderada (1200-1390 kcal/dia para 12 semanas), não diminui a contagem de células T e B. Contrariamente, outros estudos afirmam que, subjacente a deficiência imunológica em capacidade de resposta dos linfócitos encontrados em pessoas obesas são reversíveis com a redução de peso adequado (TANAKA et al., 1993).

Geraldo e Alfenas (2008) sugerem que o consumo de dieta saudável seja capaz de reduzir os níveis de marcadores inflamatórios, favorecendo a produção de citocinas antiinflamatórias, contribuindo para a prevenção ou o controle da resistência insulínica, das dislipidemias e de outras condições metabólicas relacionadas à manifestação de doenças crônicas não-transmissíveis. Tal dieta deve apresentar teor energético capaz de manter o peso corporal adequado, sendo composta por teor moderado de gordura, baixos teores de açúcares simples, de gorduras trans e saturada, sendo rica em frutas, hortaliças e alimentos integrais.

### 3 MÉTODOS

#### 3.1 Desenho do Estudo

Trata-se de um estudo experimental, prospectivo, pareado e aleatório.

#### 3.2 Animais

Esta pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (Anexo A).

Os animais foram obtidos acasalando-se machos e fêmeas adultos, na proporção de um macho para três fêmeas, por um período de 16 dias. O diagnóstico da prenhez foi feito pela observação do crescimento do ventre. Um dia após o nascimento, a ninhada foi padronizada em seis filhotes machos por mãe. Este número parece conferir maior potencial lactotrófico (FISHBECK; RASMUSSEN, 1987).

Foram utilizados 40 ratos machos, albinos, da linhagem *Wistar*, provenientes da colônia de criação do Departamento de Nutrição da mesma Universidade. Os animais foram mantidos no biotério em temperatura de  $23 \pm 2$  °C, sob ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo ração e água *ad libitum*, com quatro animais por gaiola, segundo recomendação ética do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal).

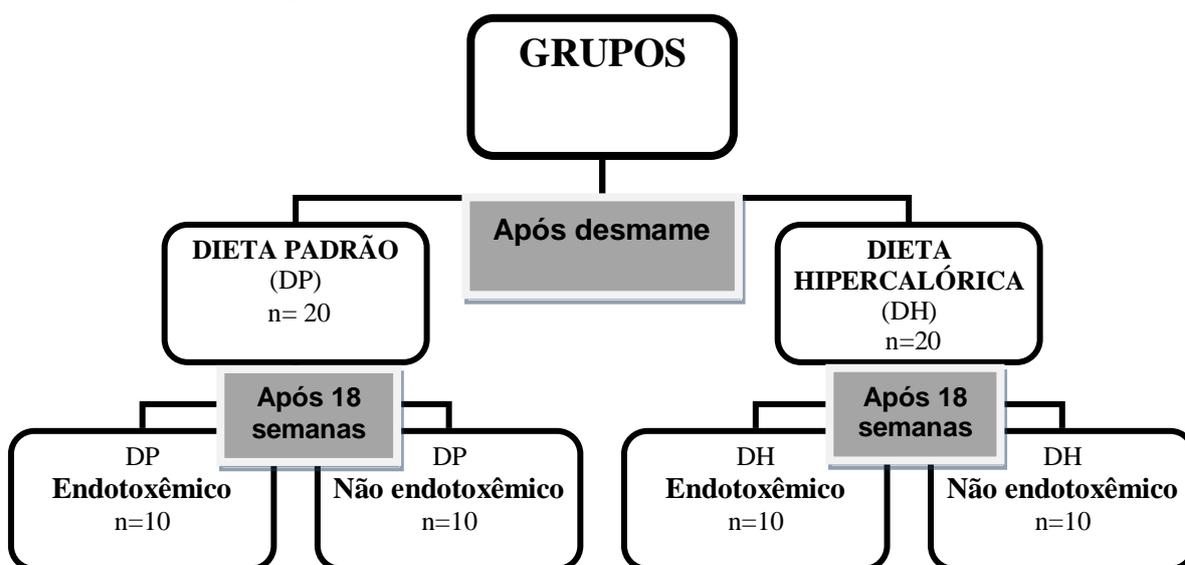
#### 3.3 Divisão dos Grupos

Após o desmame, aos 22 dias de idade, os animais foram divididos em dois grupos, aleatoriamente, cada um com regime dietético específico:

- Grupo dieta padrão (DP): constituído de 20 animais que consumiram apenas dieta padrão do biotério (Labina-Purina do Brasil S/A) a partir do desmame durante as 18 semanas subseqüentes.
- Grupo dieta hipercalórica (DH): formado por 20 animais que se alimentaram apenas de dieta hipercalórica e hiperlipídica a partir do desmame durante as 18 semanas subseqüentes.

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

Para obtenção dos grupos endotoxêmicos, os animais receberam injeção intraperitoneal de LPS, lipopolissacarídeo, (sorotipo *Escherichia coli*; 055: B5, Sigma) na dose de 1mg/Kg de peso corporal, preparado com NaCl a 0,9%. Os grupos que não sofreram endotoxemia, apenas receberam, pela mesma via, salina em igual proporção, como uma forma de igualar o estresse sofrido pela injeção.



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

Os dez animais de cada grupo foram destinados ao estudo da resposta inflamatória no dia seguinte à administração do LPS ou da salina. Assim, 24 horas após as respectivas injeções, foram coletadas amostras de sangue para análise de hemograma, glicose, colesterol total e triglicerídeos; da microbiota oral para contagem e identificação bacteriana; do lavado broncoalveolar (LBA) para contagem total e diferencial de leucócitos e taxa de fagocitose.

### 3.4 Dieta hipercalórica

A dieta hipercalórica utilizada consiste em uma mistura normoprotéica e hiperlipídica previamente descrita e utilizada por Estadella et al. (2004) e Duarte et al. (2006). É composta por ração comercial LABINA<sup>®</sup>, amendoim torrado, chocolate ao leite e biscoito maisena, na proporção 3:2:2:1. Destes constituintes, a ração, o

amendoim e o biscoito são moídos em trituradores elétricos, já o chocolate é derretido em banho Maria. Após esta primeira fase, todos os ingredientes são misturados até formarem uma massa, que é posteriormente aquecida em estufa e oferecida na forma de péletes. Em média era realizada confecção de quatro quilos de dieta hipercalórica por semana.

**Tabela 1.** Ingredientes necessários para confecção de 4,0 kg de dieta hipercalórica

INGREDIENTES	QUANTIDADE
Ração Labina	1,5 kg
Amendoim torrado	1,0 kg
Chocolate ao leite	1,0 kg
Biscoito maisena	0,5 kg
Total	4,0 kg



**Figura 2.** Componentes da dieta hipercalórica



**Figura 3.** Dieta hipercalórica pronta

**Tabela 2.** Composição centesimal das dietas padrão e hipercalórica

NUTRIENTES / CALORIAS	DIETA PADRÃO	DIETA HIPERCALÓRICA
Proteínas (g/100g)	23,0	17,93
Lipídeos (g/100g)	<b>4,00</b>	<b>24,50</b>
Carboidratos (g/100g)	63,00	47,18
Cinzas (g/100g)	-	3,62
Umidade e substâncias voláteis (g/100g)	-	6,77
Calorias (kcal/100g)	<b>275,00</b>	<b>480,94</b>

### **3.5 Evolução Ponderal**

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. Assim, foram escolhidos animais com pesos equivalentes para formarem os distintos grupos. A partir do desmame até o final da administração da dieta o peso corporal dos animais foi aferido em dias alternados.

### **3.6 Consumo Alimentar e Calórico**

Com a finalidade de identificar o consumo alimentar e calórico dos grupos DH e DP, ao iniciar o período de consumo das dietas, os animais foram acondicionados em gaiolas metabólicas próprias para este fim, durante um período de 90 dias. Durante este tempo, eram pesados diariamente a dieta disponibilizada, o rejeito limpo e o rejeito sujo. Para cálculo do consumo alimentar foi aplicada a seguinte fórmula:

$$\text{Consumo A.} = \text{dieta oferecida} - \text{dieta rejeitada}^*$$

$$^*\text{Dieta rejeitada} = \text{rejeito limpo} + \text{rejeito sujo}.$$

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

### **3.7 Análises**

#### **3.7.1 Parâmetros bioquímicos**

##### **Amostras sanguíneas**

A partir de sangue coletado da extremidade da cauda do animal foram dosados três parâmetros bioquímicos do sangue: glicose, colesterol total e triglicerídeos. Foram utilizados tubos com anticoagulante fluoreto de sódio para dosagem de glicose e tubos sem anticoagulante para quantificação de colesterol e triglicerídeos. Após ser coletado, o sangue foi centrifugado para obtenção do soro necessário para as dosagens.



**Figura 4.** Coleta de sangue

## **Glicose**

Para a dosagem de glicose foi utilizado o método da glicose oxidase. Consiste em um sistema enzimático (Marca: Doles) para determinação da glicose no soro. A partir do reagente, glicose enzimática líquida, é produzida uma coloração avermelhada de intensidade diretamente proporcional à concentração de glicose no soro. A cor avermelhada, formada pela reação, foi medida em espectrofotômetro com absorção de 510 nm.

## **Colesterol total**

O colesterol foi quantificado através de determinação enzimática do colesterol total no soro (sistema enzimático líquido da marca Doles). A coloração vermelha produzida pela reação é diretamente proporcional à concentração de colesterol no soro. Para medir a coloração avermelhada foi utilizado espectrofotômetro com absorção de 510 nm.

## **Triglicerídeos**

Utilizou-se sistema enzimático líquido, da marca Doles, para determinação dos triglicérides no soro. A reação produz coloração avermelhada proporcional à concentração de triglicerídeos no soro. A intensidade da cor foi medida em espectrofotômetro com absorção de 510 nm.

### 3.7.2 Parâmetros hematológicos

#### Amostras sanguíneas

O sangue foi obtido realizando-se um pequeno corte com bisturi na extremidade da cauda do animal. A amostra foi depositada em tubos previamente acrescidos de anticoagulante (EDTA - ácido etileno diaminotetraacético a 3%). Estas amostras de sangue foram destinadas à confecção do hemograma.

#### Série branca

##### ✓ Contagem total de leucócitos

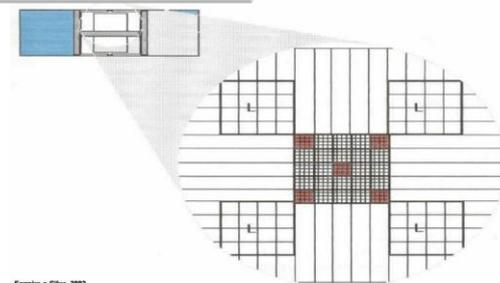
Para contagem total dos leucócitos foi utilizada solução diluidora de leucócitos (solução de Turk). Esta consiste em uma solução de ácido acético a 3% e azul de metileno a 1%, os quais têm a propriedade de causar lise dos eritrócitos e corar o núcleo dos leucócitos, respectivamente, permitindo, assim, a leitura.

Os leucócitos foram então contados, a partir de uma amostra de sangue diluída a 1:20 em solução de Turk, ao microscópio de luz, utilizando-se a objetiva de 10x e uma câmara de volume conhecido (Câmara de Neubauer). Foi realizada a contagem de todos os leucócitos encontrados nos quatro campos marcados em L, na figura abaixo. O resultado final foi obtido após a aplicação da seguinte fórmula:

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

Onde:

- n: número de leucócitos contados
- 4: número de quadrados contados
- 20: fator de conversão da diluição utilizada
- 10: fator de conversão para  $1\text{mm}^3$



**Figura 5.** Contagem total de leucócitos

### ✓ Contagem diferencial de leucócitos

A contagem diferencial de leucócitos foi realizada utilizando-se a técnica do esfregaço sangüíneo. Esta técnica permite que os elementos celulares do sangue espalhados em camada única sobre a superfície de uma lâmina, quando fixados e tratados por corantes especiais adquiram morfologia e coloração adequadas para o estudo microscópico detalhado e preciso.

Para a coloração foi utilizado o kit Panótico Rápido – Laborclin Ltda. Este se baseia no método de coloração May-Grünwald-Giemsa e constitui um sistema de coloração diferencial dos elementos figurados do sangue. Depois de secas, as lâminas são analisadas ao microscópio de luz com a objetiva de imersão de 100x. A leitura foi realizada pela contagem de 100 células fazendo-se movimentos de zigue-zague sobre a lâmina num único sentido. Os diferentes elementos foram contabilizados através da utilização de um contador eletrônico da marca Kacil. A partir dos dados obtidos foram calculados os valores absolutos e relativos para cada tipo de célula.

### Série vermelha

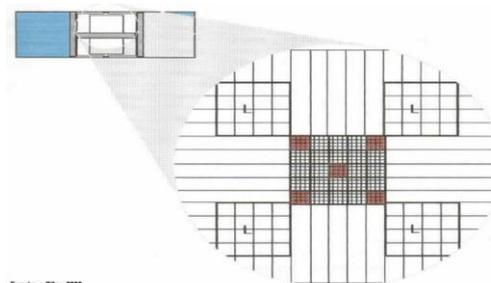
#### ✓ Contagem de Hemácias

As hemácias foram diluídas em tampão fosfato de sódio, na proporção de 1:200. Depois de diluídas foram quantificadas com o auxílio da câmara de Neubauer. Após a contagem dos 5 quadrados de cor vermelha na figura abaixo, foi aplicada uma fórmula para obtenção da quantidade de hemácias por  $\text{mm}^3$  de sangue.

$$\text{Hemácias}/\text{mm}^3 \text{ de sangue periférico} = \frac{n \times 200 \times 10}{5}$$

Onde:

- n: número de hemácias contadas
- 5: número de quadrados contados
- 200: fator de conversão da diluição utilizada
- 10: fator de conversão para  $1\text{mm}^3$



**Figura 6.** Contagem de hemácias

### ✓ **Hematócrito**

Para determinação do hematócrito realizou-se a técnica do microhematócrito. A percentagem ocupada pelos glóbulos vermelhos no volume total de sangue foi obtida pela centrifugação a 10.000 r.p.m. por 5 minutos do sangue dentro de um tubo capilar.

### ✓ **Concentração de Hemoglobina**

Para determinação dos valores de hemoglobina, foi utilizado o método da cianometemoglobina. O princípio da técnica consiste na extrusão da hemoglobina através da lise dos eritrócitos com solução hipotônica (bicarbonato de sódio) e na oxidação do ferro da hemoglobina, transformando-a em metemoglobina, a qual pela ação do cianeto de potássio, forma cianometemoglobina, cuja cor é medida fotocolorimetricamente. As leituras colorimétricas foram realizadas em espectrofotômetro, utilizando-se um comprimento de onda de 540 nm.

### **Plaquetas**

As plaquetas foram contadas utilizando-se o método de Fônio. Este método consiste na contagem das mesmas em relação ao número de eritrócitos. Para isso, foi utilizada a lâmina do esfregaço sanguíneo, esta foi focalizada ao microscópio de luz em objetiva de imersão (100x). Foram contados os eritrócitos e as plaquetas até perfazer 1000 glóbulos vermelhos em 5 campos diferentes. Após isso, foi estabelecida uma relação entre o número de plaquetas encontradas para 1000 eritrócitos e o número total de plaquetas por mL de sangue para a quantidade total de eritrócitos do sangue por ml.

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

Pelo fato de o pulmão ser o primeiro órgão a ser infectado pelo LPS, e ainda, por este órgão ser um dos que mais sofre as agressões desta endotoxina (DE CASTRO et al., 1997), ele foi o escolhido para as análises da resposta imunológica no local da infecção.

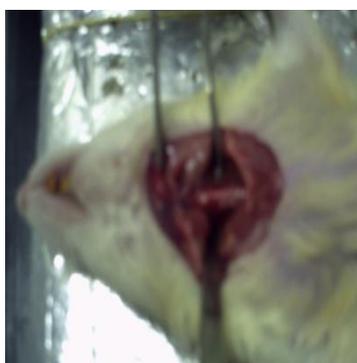
### Obtenção do Lavado Broncoalveolar (LBA)

O LBA foi obtido realizando-se o procedimento cirúrgico de traqueostomia, de acordo com a técnica usada por De Castro et al., 1997. Para anestesia, utilizou-se uma mistura dos anestésicos cloralose e uretana, em concentrações respectivas de 0,5 e 12,5%, via intraperitoneal, na proporção de 1 ml/100 g de peso corporal. 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, a traquéia foi isolada e, com uma tesoura, realizado um pequeno orifício entre dois anéis traqueais na porção ventral da mesma.

Foi inserida, então, uma cânula plástica acoplada a uma seringa contendo 5 ml de solução fisiológica à temperatura ambiente. Várias alíquotas de solução fisiológica foram injetadas, aspiradas e o material recolhido (LBA) foi depositado em tubo estéril. O procedimento de coleta do material foi realizado até a obtenção de cerca de 30 ml de LBA para cada animal. Após coletado, o LBA fica armazenado em banho de gelo e ao abrigo da luz até que seja analisado.



**Figura 7.** Anestesia



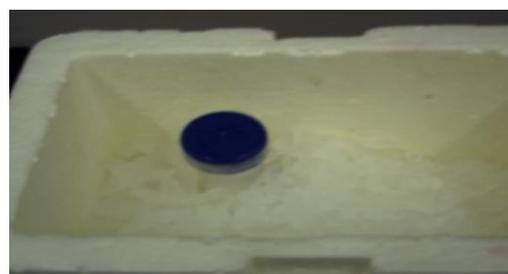
**Figura 8.** Traqueostomia



**Figura 9.** Coleta do LBA



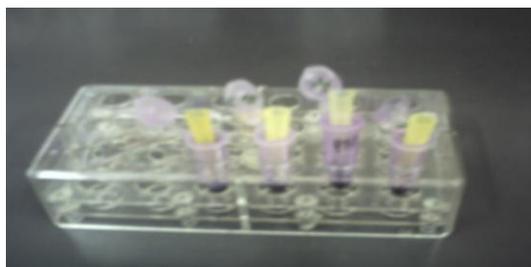
**Figura 10.** LBA coletado



**Figura 11.** LBA armazenado

### Contagem total de leucócitos do LBA

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



**Figura 12.** Amostra de LBA diluída em Corante Azul de Tripán

### Contagem diferencial de leucócitos do LBA

Para contagem diferencial dos leucócitos do LBA, foram confeccionadas lâminas a partir de preparações citocentrifugadas do LBA de cada animal (Cytopro<sup>TM</sup>-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.



**Figura 13.** Citocentrífuga

### 3.7.4 Função dos macrófagos

#### Taxa de fagocitose

##### ✓ **Cultura de macrófagos alveolares**

Todo o procedimento com os macrófagos foi realizado em capela de fluxo laminar objetivando manter o ambiente asséptico para não contaminação das culturas de células.

O LBA recolhido foi centrifugado a 1500 rpm durante 10 minutos. Após essa etapa, o precipitado, que corresponde às células, foi ressuspenso em meio de cultura RPMI 1640 contendo antibióticos (penicilina 100U/ml e estreptomicina 100 µg/ml, anfotericina B 0.25 µg/ml) (SIGMA) para lavagem e, em seguida, as células foram contadas. A contagem dos macrófagos colhidos foi realizada em Câmara de Neubauer, colocando-se a suspensão de células e o 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. Após obtenção do número de macrófagos vivos recuperados do LBA, foi ajustado esse total para ensaio da taxa de fagocitose.



**Figura 14.** Centrifugação do LBA



**Figura 15.** Precipitado de macrófagos

##### ✓ **Preparo dos fungos**

Anterior à contagem de macrófagos, foi realizado o preparo e contagem dos fungos (*Saccharomyces cerevisiae*). Os fungos foram lavados duas vezes com Solução tampão de fosfato a 0,01M; contados  $10^7$  células em 200 µl de tampão de fosfato e em

seguida foram adicionados à suspensão de macrófagos (800  $\mu$ l de RPMI 1640, com  $1 \times 10^6$  células).



**Figura 16.** Preparo do fungo para realização da taxa de fagocitose

#### ✓ **Obtenção da Taxa de Fagocitose**

Os fungos e os macrófagos juntos deverão perfazer um volume final de 1 ml. As células (macrófagos e fungos) são então distribuídas em lâminas de microscopia óptica e incubadas a 37°C, em câmara com atmosfera úmida, durante o período de 1 hora.

Em seguida, as lâminas são lavadas com água destilada e secadas à temperatura ambiente. Para a coloração, foi utilizado o kit Panótico Rápido. As lâminas foram lidas ao microscópio óptico com objetiva de 100x sob imersão. A taxa de fagocitose foi obtida como percentual de macrófagos que englobaram o fungo em uma contagem total de 100 células.

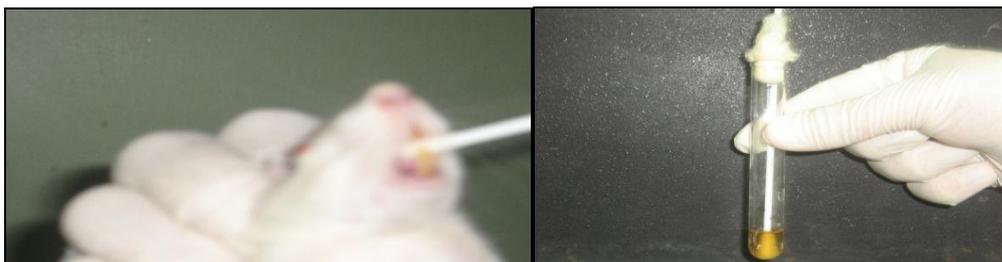


**Figura 17.** Câmara úmida

### 3.7.5 Microbiota Oral

#### ✓ Coleta de material para cultura

Cada animal foi segurado na posição vertical, de modo que suas patas fossem imobilizadas. Em seguida, a flora bacteriana oral foi coletada através de *swabs* estéreis embebidos em 40  $\mu$ l de solução salina estéril de NaCl 0,9%.



**Figura 18.** Coleta da microbiota oral

#### ✓ Semeio, isolamento, identificação e contagem bacteriana

Após a coleta, cada *swab* foi colocado em um tubo estéril contendo 960  $\mu$ l de BHI (Brain Heart Infusion), meio de cultura líquido enriquecido que permite o crescimento bacteriano. Posteriormente, foi feita a homogeneização de cada uma destas amostras. Então, destes 1.000  $\mu$ l retirou-se, com o auxílio de alça calibrada, 1 $\mu$ l. Este 1 $\mu$ l era semeado em placas de Petri contendo Agar-sangue e Agar-Levine, para isolamento e identificação das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, respectivamente. As bactérias que cresceram foram isoladas e, posteriormente, prepararam-se lâminas para a realização da coloração de Gram e a partir do resultado foram realizados testes específicos.

As bactérias Gram positivas foram separadas nos gêneros *Staphylococcus* ou *Streptococcus* através da prova da catalase, na qual apenas o primeiro gênero apresenta positividade. As bactérias Gram positivas do gênero *Staphylococcus* foram, inicialmente, identificadas a partir do Kit Sthaphclin (Marca: Laborclin), que utiliza o método da coagulase, no qual as bactérias *S. aureus* são positivas. As bactérias *S. epidermidis* e *S. saprophyticus* eram diferenciadas pela prova de resistência à Novobiocina (Marca: Laborclin), na qual apenas a *S. saprophyticus* é resistente. As bactérias Gram positivas do gênero *Streptococcus* eram, primeiramente, identificadas

segundo a hemólise em Ágar-Sangue. A partir da hemólise eram utilizados os seguintes testes: sensibilidade à Bacitracina, sensibilidade à Optoquina, Bile esculina e NaCl 6,5% (todos da marca Laborclin).

Para identificação das bactérias Gram negativas foi utilizado o Kit para identificação de enterobactérias da marca Laborclin.

Após toda identificação, as unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas e seus percentuais calculados.



**Figura 19.** Procedimentos para identificação e contagem das bactérias

### 3.7.6 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.

### 3.7.7 Análise estatística

Na comparação entre os grupos, 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 SigmaStat 2.0. A significância foi definida para  $p < 0,05$ .

## **4 RESULTADOS**

Os resultados obtidos com a presente pesquisa encontram-se relatados em quatro artigos, apresentados a seguir.

**Artigo 1.** (Pg. 45)

Efeito da obesidade sobre função e recrutamento de células imunes

**Artigo 2.** (Pg. 62)

Obesidade e perfil hematológico na endotoxemia

**Artigo 3.** (Pg. 77)

Effects of obesity on changes in the oral microbiota

**Artigo 4.** (Pg. 90)

Efeitos da obesidade sobre perfil bioquímico da endotoxemia

## **EFEITO DA OBESIDADE SOBRE FUNÇÃO E RECRUTAMENTO DE CÉLULAS IMUNES**

Karla Melo Ferreira da Silva<sup>1</sup>,  
Rosangela Rosendo da Silva<sup>2</sup>,  
Solange Maria Magalhães da Silva Porto<sup>3</sup>,  
Vanessa Oliveira de Santana<sup>4</sup>.  
Célia Maria Machado Barbosa de Castro<sup>5</sup>,

.

<sup>1</sup> Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco<sup>a</sup>.

<sup>2/3</sup> Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco.

<sup>4</sup> Aluna de Iniciação Científica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco.

<sup>5</sup> Professora e Vice-coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco.

<sup>a</sup>Av. Prof. Moraes Rego s/n - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife – PE.

Autor para tramitação:

Karla Melo Ferreira da Silva

Endereço: Estrada das Ubaias, 245, Casa Forte – CEP: 52061-080 – Recife- PE.

Telefone: (81) 34410080 / (81) 88095817

E-mail: [karlamfsilva@hotmail.com](mailto:karlamfsilva@hotmail.com)

## RESUMO

### Objetivo

Avaliar em ratos obesos possíveis alterações do recrutamento e da função de células do sistema imune na presença de processo infeccioso sistêmico.

### Material e métodos

40 ratos machos da linhagem *Wistar* foram utilizados. Grupo controle composto por 20 animais mantidos com dieta padrão do biotério (DP) e grupo obeso formado por 20 animais alimentados com dieta hipercalórica (DH). Após 18 semanas, metade dos animais de cada grupo foi submetida à endotoxemia, constituindo então quatro grupos: DP endotoxêmico e não endotoxêmico, DH endotoxêmico e não endotoxêmico. Foram coletados dados de peso corporal, gordura visceral, consumo alimentar e consumo calórico. A partir da cirurgia de traqueostomia, coletou-se amostra do Lavado Bronco alveolar e foram realizadas contagem total e diferencial de leucócitos, além da avaliação da taxa de fagocitose.

### Resultados

O consumo alimentar do grupo DH foi 32% menor, mesmo assim consumo calórico foi de 11 kcal/dia a mais neste grupo, acompanhado de manutenção de peso corporal e aumento de 3 vezes da gordura visceral. Os valores de leucócitos totais apresentaram valores semelhantes entre os dois grupos de dieta, na ausência ou presença da endotoxina. Em relação aos leucócitos diferenciais, os linfócitos estavam em maior número nos animais obesos quando comparados ao padrão, com o dobro do valor de linfócitos no grupo obeso sem infecção e o triplo no grupo obeso com endotoxemia. Em resposta à infecção, os dois grupos apresentaram valores iguais de neutrófilos e macrófagos, mesmo com um número 22% maior de neutrófilos no grupo DH sem a infecção. Os eosinófilos não modificaram entre os grupos. Em relação à função de fagocitose, os animais que consumiram dieta padrão responderam com significativo aumento da taxa de fagocitose na presença da endotoxina, esta resposta apresentou-se 32% menor no grupo DH.

### Conclusão

O modelo de obesidade imposto, apesar de não ter gerado aumento de peso corporal, foi eficaz em causar obesidade visceral. Os danos causados pelo excesso de gordura são sentidos pelos diversos sistemas do organismo, em especial o sistema imune. A manutenção da gordura corporal em concentrações aceitáveis é causa de preocupação na população atual, pelo aumento da prevalência da obesidade e por seus efeitos maléficos sobre a saúde como um todo, inclusive na defesa contra infecções.

**Termos de indexação:** Gorduras na dieta; Obesidade; Imunologia; Fagocitose.

## **ABSTRACT**

### **Purpose**

To assess possible changes in obese rats the recruitment and function of immune cells in the presence of systemic infectious process.

### **Materials and methods**

40 male Wistar rats were used. Control group consisted of 20 animals kept with standard diet (SD) and obese group consisting of 20 animals fed with high calorie diet (DH). After 18 weeks, half the animals in each group was subjected to endotoxemia, then constituting four groups: DP endotoxemic and not endotoxemic, DH endotoxemic and non endotoxemic. Data were collected on body weight, visceral fat, food consumption and calorie intake. From the surgical tracheostomy, the sample was collected and broncho alveolar counts were performed total and differential leukocytes, and by evaluating the rate of phagocytosis.

### **Results**

Dietary intake of the DH group was 32% lower, yet calorie intake was 11 kcal / day more from this group, together with maintenance of body weight and 3-fold increase in visceral fat. The values of total leukocytes were very similar between the two diet groups in the absence or presence of endotoxin. Regarding the differential leukocytes, lymphocytes were more numerous in obese animals when compared to standard, with double the amount of lymphocytes in the obese group without infection and three times in the obese group with endotoxemia. In response to infection, both groups had equal values of neutrophils and macrophages, even with a 22% higher number of neutrophils in DH group without infection. Eosinophils did not change between groups. Concerning the function of phagocytes, the animals fed a standard diet responded with a significant increase in the rate of phagocytosis in the presence of endotoxin, the response presented 32% lower in the DH.

### **Conclusion**

The model of obesity tax, although it has not generated increased body weight, was effective in causing visceral obesity. The damage caused by excess fat are felt by the various body systems, particularly the immune system. The maintenance of acceptable concentrations in body fat is a cause for concern in the current population, the increasing prevalence of obesity and its ill effects on health as a whole, including defense against infection.

**Indexing terms:** Dietary fats, obesity, immunology; Phagocytosis.

## INTRODUÇÃO

Pesquisas da WHO em 2005 indicam que a nível mundial aproximadamente 1,6 bilhões de adultos (mais de 15 anos) apresentavam sobrepeso e por volta de 400 milhões de adultos eram obesos. Pelo menos 20 milhões de crianças de idade inferior a cinco anos apresentaram excesso de peso a nível mundial em 2005. A WHO estima que, até 2015, aproximadamente 2,3 bilhões de adultos terão sobrepeso e mais de 700 milhões serão obesos.

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; GENTIL; TORAL, 2008).

Segundo Fisberg (2004) a obesidade pode ser considerada como um acúmulo anormal ou excessivo de tecido gorduroso, regionalizado ou em todo o corpo, caracterizando-se como uma das doenças não transmissíveis que mais cresce em todo o mundo, pois, nas últimas décadas, tem se apresentado nas diversas faixas etárias. Ela pode ser considerada como a doença de maior morbidade no paciente adulto, e está relacionada à pobreza, raça, condições genéticas e ambientais.

A obesidade pode ser induzida em animais por alterações neuroendócrinas, dietéticas ou genéticas (DIEMEN et al., 2006). Ainda de acordo com estes autores, a administração de dieta hipercalórica é o modelo mais simples para indução da obesidade e 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 hipercalóricas são realizadas acrescentando hidratos de carbono e outras, aumentando a porcentagem de gorduras, a maioria delas varia entre 3,7 kcal/g e 5,4 Kcal/g. Todas induzem obesidade.

A visão tradicional do tecido adiposo como um passivo reservatório para o armazenamento de energia não é mais válido (KERSHAW; FLIER, 2004). O tecido adiposo é agora conhecido por expressar e secretar uma variedade de peptídeos bioativos, conhecidos como adipocinas, que atuam a nível autócrino, parácrino e sistêmico. As adipocinas por ele produzidas têm ações diversas, podendo-se agrupá-las de acordo com a sua principal função, como: função imunológica, cardiovascular, metabólica e endócrina (COSTA; DUARTE, 2006).

Segundo Kershaw e Flier (2004) a importante função endócrina do tecido adiposo é enfatizada pelas conseqüências adversas metabólicas de ambos: excesso e deficiência de tecido adiposo.

Várias linhas de evidências têm apoiado um elo entre tecido adiposo e células imunológicas (MARTÍ; MARCOS; MARTINEZ, 2001). A obesidade tem sido identificada como fator de risco de infecção e falta de cicatrização após cirurgias (FASOL et al., 1992; MOULTON et al., 1994). Além disso, queimaduras em pessoas com sobrepeso mostraram maior risco de infecção e bacteremia quando comparados com pacientes com peso adequado, bacteremia e sepse ocorreram mais nos obesos quando comparados com os não obesos, ao passo que a terapia antibiótica foi exigida por duas vezes mais dias no grupo obeso do que no grupo controle (GOTTSCHLICH et al., 1993).

As endotoxinas ou lipopolissacarídeos (LPS) são produzidos por bacilos gram negativos, desencadeando reação inflamatória sistêmica. O LPS se localiza na parte externa da membrana bacteriana e é liberado a partir da replicação e/ou morte bacteriana (DE CASTRO et al., 1997). O efeito biológico da endotoxina é gerar e amplificar resposta inflamatória. (DINARELLO, 1996; PLATA-SALAMÁN, 1996). Assim, a aplicação do LPS funciona como um adequado modelo para o estudo das alterações fisiológicas durante infecções bacterianas, já que reproduzem muitos dos sintomas clínicos observados em pacientes com septicemia por bactérias gram negativas (LUCHI; MORRISON, 2000). Tais reações apresentam-se mais exacerbadas após 24 horas da aplicação do LPS (DE CASTRO et al., 1997).

Diante do exposto, esta pesquisa pretende identificar alterações no recrutamento de células imunes para o foco infeccioso e analisar possível dano à função de macrófagos alveolares.

## **MÉTODOS**

### **Delineamento experimental**

Foram utilizados 40 ratos machos, albinos, da linhagem Wistar, provenientes da colônia de criação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos no biotério em temperatura de  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , sob ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo ração e água *ad libitum*, segundo recomendação ética do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). A

pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética do Centro de ciências Biológicas da universidade Federal de Pernambuco.

### **Grupos**

Os animais foram divididos inicialmente em dois grupos segundo o regime dietético empregado. O grupo dieta padrão (DP) foi constituído de 20 animais que receberam dieta padrão do biotério (Labina-Purina do Brasil S/A). O grupo dieta hipercalórica (DH) foi formado por 20 animais que receberam dieta hipercalórica e hiperlipídica.

Aos 147 dias de idade, após terem recebido as respectivas dietas por 18 semanas, os dois grupos iniciais foram subdivididos em endotoxêmicos e não endotoxêmicos.

Para obtenção dos grupos endotoxêmicos, os animais receberam injeção intraperitoneal de LPS, lipopolissacarídeo, (sorotipo *Escherichia coli*; 055: B5, Sigma) na dose de 1mg/Kg de peso corporal, preparado com NaCl a 0,9%. Os grupos que não sofreram endotoxemia, apenas receberam, pela mesma via, NaCl a 9% em igual proporção, como uma forma de igualar o estresse sofrido pela injeção (DE CASTRO et al., 1997).

### **Dieta Hipercalórica e Hiperlipídica**

A dieta hipercalórica empregada consiste em uma mistura normoprotéica e hiperlipídica. É composta por ração comercial LABINA<sup>®</sup>, amendoim torrado, chocolate ao leite e biscoito maisena, na proporção 3:2:2:1. A densidade calórica para a dieta hiperlipídica palatável foi de 4,8 kcal/100g (24,5% de Lipídeos) enquanto que, a dieta padrão, apresentou 2,7 kcal/100g (4% de Lipídeos).

### **Parâmetros biológicos: Peso corporal, gordura visceral, consumo alimentar e consumo calórico**

O peso corporal dos animais foi aferido diariamente do primeiro dia de vida até o final do período de aleitamento (21 dias). Após o desmame, a pesagem foi realizada em dias alternados até o final da administração da dieta.

A coleta da gordura visceral foi realizada com o animal anestesiado, por mistura dos anestésicos cloralose e uretana, em concentrações respectivas de 0,5 e 12,5%, via intraperitoneal, na proporção de 1mL/100g de peso corporal. Realizou-se uma incisão na região abdominal. Em seguida, todos os órgãos deste local foram retirados e a gordura separada para pesagem posterior.

Com a finalidade de identificar o consumo alimentar, os animais foram acondicionados em gaiolas metabólicas próprias para este fim durante um período de 90

dias. Durante este tempo, eram pesados diariamente a dieta disponibilizada e a dieta rejeitada (rejeito sujo e rejeito limpo).

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

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

Pelo fato de o pulmão ser o primeiro órgão a ser infectado pelo LPS, e ainda, por este órgão ser um dos que mais sofre as agressões desta endotoxina (DE CASTRO et al., 1997), ele foi o escolhido para as análises da resposta imunológica no local da infecção.

Vinte e quatro horas após a administração do LPS ou do NaCl 0,9%, foi realizada cirurgia de traqueostomia para retirada do lavado bronco alveolar (LBA). Com a animal anestesiado, foi inserida, então, uma cânula plástica acoplada a uma seringa contendo 5 mL de solução fisiológica à temperatura ambiente. Várias alíquotas de solução fisiológica foram injetadas, aspiradas e o material recolhido, LBA, foi depositado em tubo estéril

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

Para contagem diferencial dos leucócitos do LBA, foram confeccionadas lâminas a partir de preparações citocentrifugadas de 200 µL do LBA de cada animal diretamente em lâminas histológicas. Para a coloração foi utilizado o kit Panótico Rápido. Estas lâminas foram lidas ao microscópio óptico em objetiva de 100 vezes, sob imersão.

### **Taxa de fagocitose**

Todo o procedimento com os macrófagos foi realizado em capela de fluxo laminar objetivando manter o ambiente asséptico para não contaminação das culturas de células.

Depois de retiradas as alíquotas para contagem de leucócitos, o LBA recolhido foi centrifugado e o precipitado, que corresponde às células, foi ressuspenso em meio de cultura RPMI 1640 contendo antibióticos e, em seguida, as células foram contadas em Câmara de Neubauer. Anterior à contagem de macrófagos, foi realizado o preparo e contagem dos fungos (*Saccharomyces cerevisiae*). As células (macrófagos e fungos) foram então distribuídas em lâminas de microscopia óptica e incubadas a 37°C, em câmara com atmosfera úmida, durante o período de 1 hora.

Em seguida, as lâminas são lavadas com água destilada e secadas à temperatura ambiente. Para a coloração, foi utilizado o kit Panótico Rápido. As lâminas foram lidas ao microscópio óptico com objetiva de 100x sob imersão. A taxa de fagocitose foi obtida como percentual de macrófagos que englobaram o fungo em uma contagem total de 100 células.

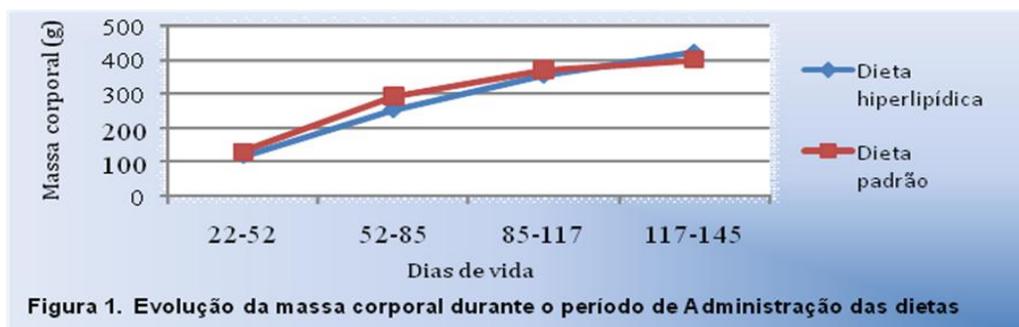
### Análise estatística

Na comparação entre os grupos, 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. Utilizou-se para isto, o *Software* SigmaStat 2.0. A significância foi definida para  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### Peso corporal

Após as 18 semanas de administração das dietas os animais que receberam dieta hiperlipídica (DH) não apresentaram diferença de peso corporal em relação aos que se alimentaram de dieta padrão (DP). O peso corporal médio nos 2 grupos foi considerado semelhante, DP igual a  $273.6 \pm 8.9$  g e DH igual a  $268.7 \pm 5.5$  g.

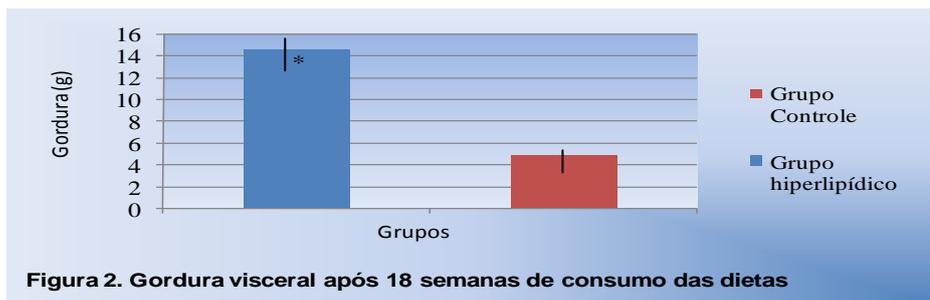


Nota: Resultados mostrados em média.

Ausência de \* significa falta de diferença estatística significante,  $p \leq 0,05$ .

### Gordura Visceral

Apesar de não causar aumento no peso corporal, o consumo da dieta hipercalórica aumentou consideravelmente a quantidade de gordura visceral, foi encontrada três vezes mais gordura no grupo hipercalórico (DH=  $14.5 \pm 0.8$  g; DP=  $4.8 \pm 0.3$  g).



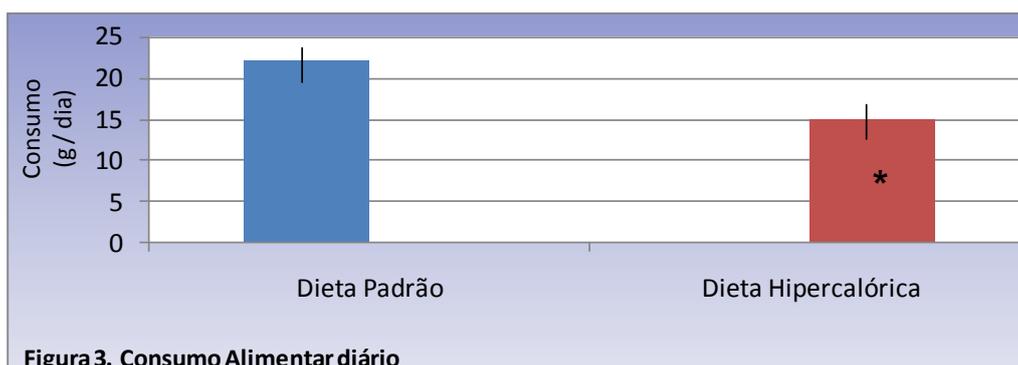
**Figura 2. Gordura visceral após 18 semanas de consumo das dietas**

Nota: Resultados mostrados em média  $\pm$  erro padrão.

Presença de \* significa diferença estatisticamente significativa,  $p \leq 0,05$ .

### Consumo Alimentar e Calórico

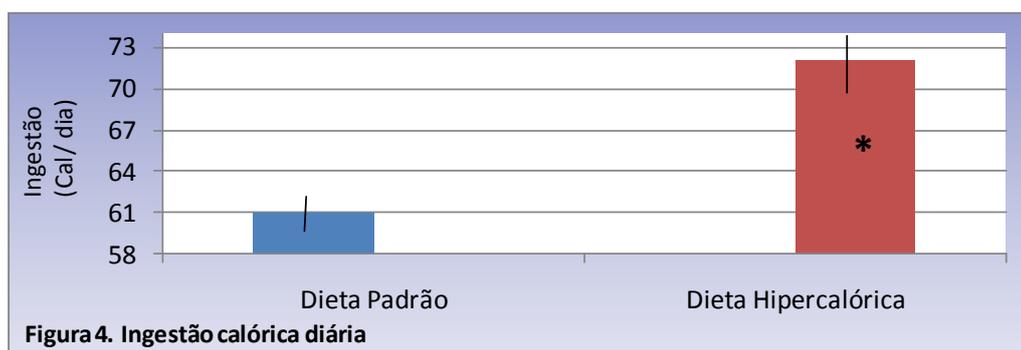
O consumo alimentar do grupo alimentado com dieta padrão do biotério (DP= 15  $\pm$  1.4 g) foi 32% maior que o do grupo que consumiu dieta rica hipercalórica (DH= 22  $\pm$  3.2 g),  $p = 0.001$ . Contudo, o consumo calórico diário ainda permaneceu 11 kcal a mais no grupo DH.



**Figura 3. Consumo Alimentar diário**

Nota: Resultados mostrados em média  $\pm$  erro padrão.

Presença de \* significa diferença estatisticamente significativa,  $p \leq 0,05$ .



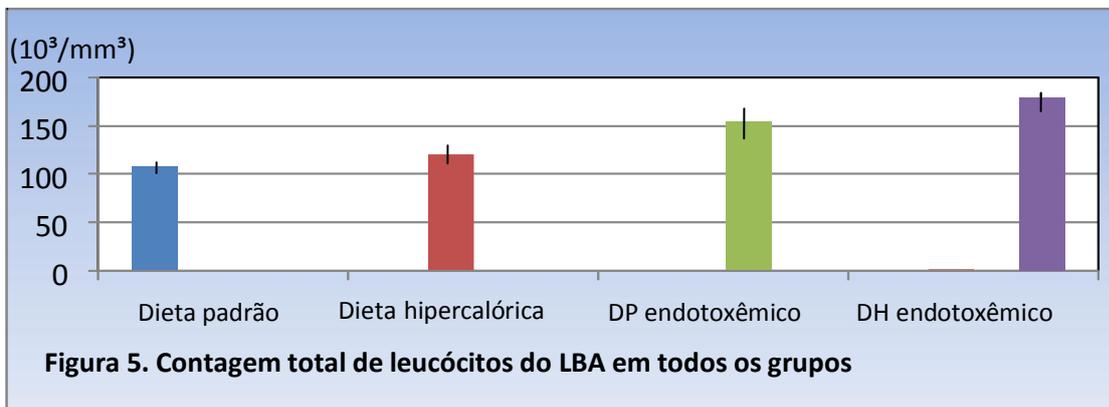
**Figura 4. Ingestão calórica diária**

Nota: Resultados mostrados em média  $\pm$  erro padrão.

Presença de \* significa diferença estatisticamente significativa,  $p \leq 0,05$ .

### Leucócitos totais do LBA ( $10^3/\text{mm}^3$ )

Na comparação entre os grupos DP e DH sem LPS, os valores de leucócitos não apresentaram diferença estatística significativa, porém o grupo DH tendeu a valores maiores de leucócitos (DP=  $107.5 \pm 3.8$ ; DH=  $120.0 \pm 7.3$ ). Após a infecção os dois grupos aumentaram seus valores de leucócitos do LBA, aumento este considerado semelhante para os dois grupos (DPE=  $154.5 \pm 18.9$ ; DHE=  $177.5 \pm 9.5$ ).



Nota: Resultados mostrados em média  $\pm$  erro padrão.

Presença de \* significa diferença estatisticamente significativa,  $p \leq 0,05$ .

### Leucócitos diferenciais do LBA

Não houve alteração significativa do número absoluto de eosinófilos quando comparados todos os grupos.

O grupo obeso apresentou valores aumentados de linfócitos, tanto os endotoxêmicos, com aumento de três vezes ( $P= 0.005$ ), quanto os que receberam salina, com aumento de duas vezes ( $P= 0.049$ ).

A endotoxemia causou aumento dos neutrófilos tanto nos grupos DP ( $P= 0.001$ ), quanto no DH ( $P= 0.001$ ), aumento igual para os dois grupos. Em relação aos grupos que não receberam LPS, os animais obesos tiveram um número 22% maior de neutrófilos em relação aos que receberam salina ( $P= 0.028$ ).

A endotoxemia também produziu um aumento dos macrófagos nos dois grupos DP ( $P= 0.014$ ) e DH ( $P= 0.001$ ), este aumento foi considerado similar para os dois grupos. Na ausência da infecção, os valores de macrófagos não modificaram para ambos os grupos.

**Tabela 1.** Médias dos valores absoluto e relativo dos diferentes leucócitos do LBA

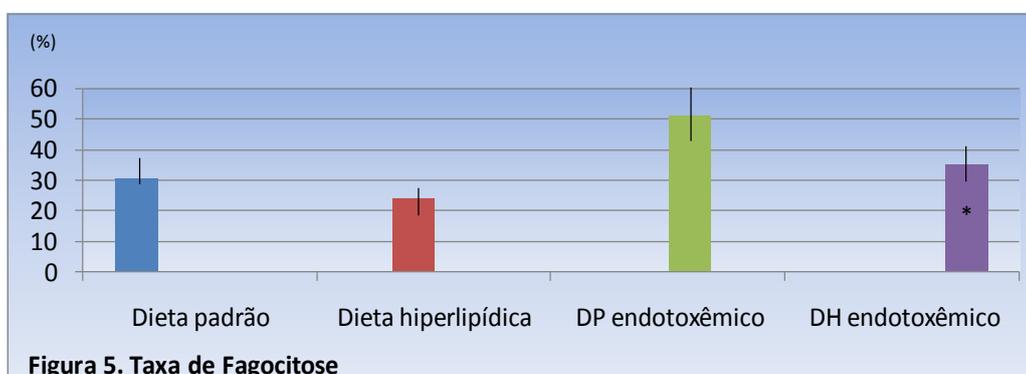
Nota: Resultados mostrados em média  $\pm$  erro padrão do valor absoluto.

Presença de \* significa diferença estatisticamente significativa do valor absoluto,  $p \leq 0,05$ .

GRUPOS	LEUCÓCITOS DIFERENCIAIS DO LBA							
	Linfócito		Neutrófilo		Eosinófilo		Macrófago	
	Relativo (%)	Absoluto ( $10^3/\text{mm}^3$ )	Relativo (%)	Absoluto ( $10^3/\text{mm}^3$ )	Relativo (%)	Absoluto ( $10^3/\text{mm}^3$ )	Relativo (%)	Absoluto ( $10^3/\text{mm}^3$ )
DP	3	$3 \pm 0.56$	6	$7 \pm 1.2$	0,3	$0.375 \pm 0.19$	91	$98 \pm 3.2$
DH	7	$9^* \pm 3.2$	16	$9^* \pm 4.4$	0,1	$0.125 \pm 0.13$	78	$93 \pm 6.2$
DPE	2	$4 \pm 0.43$	17	$29^* \pm 3.2$	0,4	$0.8 \pm 0.44$	80	$139^* \pm 11.2$
DHE	6	$11^* \pm 2.3$	16	$29^* \pm 3.9$	0,5	$0.95 \pm 0.44$	78	$137^* \pm 6.7$

### Taxa de Fagocitose

Entre os animais que receberam dieta padrão, os endotoxêmicos apresentaram aumento significativo da taxa de fagocitose (DPE=  $51.0 \pm 5.1$ ,  $p= 0.003$ ). Já os animais que se alimentaram com dieta rica em calorias, quando submetidos à endotoxemia não apresentaram aumento estatisticamente significativo na taxa de fagocitose (DHE=  $34.9 \pm 3.9$ ). No caso dos animais que não foram submetidos à infecção, as taxas de fagocitose não apresentaram diferença significativa (DP=  $30.3 \pm 3.2$ ; DH=  $23.5 \pm 2.5$ ).

**Figura 5.** Taxa de Fagocitose

Nota: Resultados mostrados em média  $\pm$  erro padrão.

Ausência de \* significa falta de diferença estatística significativa,  $p \leq 0,05$ .

## DISCUSSÃO

No presente estudo, o peso corporal do grupo que utilizou dieta hipercalórica não modificou mesmo após 18 semanas de consumo. Outros autores também encontraram resultados semelhantes (FRANCO, 2009; ESTADELLA et al., 2004, 2008). Porém, alguns estudos apresentaram resultados diferentes, com aumento ou

diminuição do peso corporal no grupo alimentado com dieta rica em calorias (PAULI, 2009; DUARTE, 2006; BERNARDES, 2004; SANTOS, 2007). Todos esses trabalhos são acompanhados por diferentes períodos de consumo da dieta e por diferentes tipos de ingredientes utilizados em sua confecção, estes podem ser os motivos para tais discordâncias.

Na presente pesquisa o grupo DH apresentou o triplo da gordura visceral encontrada no grupo DP. Aumento da adiposidade também foi encontrado por vários autores que utilizaram dieta hipercalórica (GONÇALVES et al., 1990; BELLAYER et al., 2001; GAÍVA et al., 2001; ESTADELLA et al., 2004, 2005; DUARTE et al., 2006).

Aliados à manutenção de peso corporal e aumento da gordura visceral, os animais obesos consumiram menos dieta. Os estudos de Bernardes (2004) e Franco (2009) reforçam este resultado, já estudo de Eguchi (2008) não apresentou modificação no consumo alimentar entre os grupos.

Os processos imunológicos envolvidos na defesa do organismo são afetados pelo estado nutricional (WOMACK et al., 2007). Segundo Alves (2006), essas repercussões imunológicas, mais a complexa interação que existe entre elas, levam o indivíduo obeso a modificar sua resposta imune, tanto na imunidade inata como na imunidade adquirida.

Um aumento na morbidade por sepse em pacientes obesos comparados com as pessoas magras é causa de crescente preocupação (VACHHARAJANI; VITAL, 2006).

No presente estudo, apesar de o grupo obeso não ter apresentado diferença significativa na contagem total de leucócitos no local da infecção, ocorreram modificações na quantidade de células específicas. Os linfócitos se mostraram em maior número nos animais obesos, com ou sem presença da infecção.

Os adipócitos secretam leptina em proporção direta a massa de tecido adiposo, bem como o estado nutricional (FAIN et al., 2004; WAJCHENBERG, 2000). Em estados de normalidade, a Lp atua estimulando a liberação de citocinas pró-inflamatórias por parte dos monócitos; citocinas que produzem uma estimulação dos linfócitos T (ALVES, 2006). Quando existe uma alteração destes processos, existe uma proliferação linfocitária anormal com uma redução na capacidade funcional dos linfócitos (MARTÍ; MARCOS; MARTÍNEZ, 2001), devido a que a Lp é um modulador da ativação dos mesmos (SÁNCHEZ-MARAGALET et al., 2003). Esta susceptibilidade aumentada a infecções, é causada por alterações nas sub-populações de células T, com um desbalanço entre as respostas Th1 e Th2, com uma diminuição e aumento respectivamente. (MUÑOZ; MAZURE; CULEBRAS, 2004).

O neutrófilo foi outro tipo de leucócito que se apresentou aumentado no animal obeso. Existe um aumento de IL-8 na obesidade, onde a fonte principal é o tecido adiposo (BRUUN et al., 2002; STRACZKOWSKI et al., 2002). Segundo Zhang et al. (2002), a IL-8 afeta a adesão dos neutrófilos ao endotélio e induz a migração trans-endotelial de neutrófilos. O estudo de Bulló et al (2003), mostrou que o TNF- $\alpha$  e a Lp estejam muito expressos na obesidade e podem induzir uma maior produção de IL-6 e portanto da PCR e de outros marcadores de fase aguda da resposta imune, 30% das concentrações circulantes totais de IL-6 têm origem no tecido adiposo (LEMIEUX et al., 2001; TRAYHURN; WOOD, 2004). Assim como o TNF- $\alpha$  estimula a síntese de IL-6 no adipócito no obeso, exerce efeitos similares sobre a IL-8, também secretada pelo adipócito.

De acordo com nossos dados é possível que a obesidade possa ser caracterizada por um estado crônico de baixo grau de inflamação. O motivo para afirmar isso é o aumento dos níveis circulantes de vários marcadores inflamatórios, como as citocinas pró-inflamatórias e as proteínas de fase aguda.

Apesar de os animais obesos terem recrutado o mesmo número de fagócitos (neutrófilos e macrófagos) para o local da infecção, ficou evidenciado que a função de fagocitose estava significativamente reduzida nos animais que se alimentaram de dieta hipercalórica. Em função desta carência na função do sistema imune, 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 de doenças infecciosas são maiores em indivíduos obesos quando comparado pessoas magras (FASOL et al., 1992; GOTTSCHLICH, 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.

Estudo de Nieman e colaboradores (1996), com mulheres obesas e não-obesas revelou que a gordura corporal está positivamente correlacionada com o total de leucócitos, neutrófilos, monócitos e linfócitos. No entanto, eles não conseguiram estabelecer qualquer comprometimento de funções imunes nos indivíduos obesos. Neste estudo a função das células T foi comparável entre obesos e não-obesos, enquanto a função das células B foi cerca de 50% maior no grupo de obesos. Além disso, a

fagocitose de monócitos e granulócitos não foi influenciada pela obesidade. Já a atividade oxidativa de monócitos e granulócitos foi maior nos obesos.

Outro estudo realizado por Nieman et al. (1999) sobre a influência da obesidade na resposta imune em uma população adulta indica que a obesidade está relacionada com a elevação de leucócitos e linfócitos, porém este estudo também encontrou maior fagocitose por maior número monócitos e granulócitos.

## CONCLUSÃO

A dieta hipercalórica e hiperlipídica utilizada pela presente pesquisa foi útil em induzir obesidade, uma vez que aumentou consideravelmente o teor de gordura visceral. Diante dos resultados podemos observar as alterações maléficas que a obesidade pode causar ao sistema imunológico, desde mudanças na quantidade de células imunológicas ao comprometimento da função destas. Como se pode perceber, apesar da diversa gama de estudos existentes, a relação da obesidade com componentes específicos do sistema imune ainda é bem controversa. Sugere-se que estudos adicionais em relação aos efeitos da obesidade na resposta a infecção grave sejam realizados.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco e ao Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami pela oportunidade de realização do presente estudo.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, M.N.R. Os efeitos da obesidade na resposta imune. **Ver. Brás. Nutr. Clin.**, v. 21, n. 4, p. 316-319, 2006.
- 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. Brás. de End. e Met.**, 2001; 45 (2): 167-72.
- BERNARDES, D., MANZONI, M.S.J., DE SOUZA, C.P., TENÓRIO, N., DÂMASO, A.R. Efeitos da dieta hiperlipídica e do treinamento de natação sobre o metabolismo de recuperação ao exercício em ratos. **Rev. Bras. Educ. Fís. Esp**, v. 18, n. 2, p. 191-200, 2004.

- BULLÓ, M., GARCÍA-LORDA, P., MEGIAS, I., SALAS-SALVADÓ, J. Systemic inflammation, Adipose tissue, Tumor Necrosis Factor, and Leptin Expression. **Obes. Res.**, v. 11, n. 4, p. 525-531, 2003.
- BRUUN, J.M., PEDERSEN, S.B., KRISTENSEN, K., RICHELSEN, B. Opposite Regulation of Interleukin-8 and Tumor Necrosis Factor-alpha by Weight Loss. **Obes. Res.**, v. 10, n. 6, p. 499-506, 2002.
- CHANDRA, R.K., KUTTY, K.M. Immunocompetence in obesity. **Acta Paediatr. Scand.**, v. 69, p. 25–30, 1980.
- COSTA, J.V., DUARTE, J.S. Tecido adiposo e adipocinas. **Acta Med. Port.**, v. 19, p. 251-256, 2006.
- 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.
- DE CASTRO, C.M.M.B., DE CASTRO, R.M., ANDRADE, A.D., BRANDT, C.T. LPS bacteriano: um mediador de inflamação. **Fac. Méd. Univ. Fed. Pernamb.**, v. 42, n. 2, p. 78-83, 1997.
- DIEMEN, V.V., TRINDADE, E.N., TRINDADE, M.R.M. Experimental model to induce obesity in rats. **Acta Cir. Brás.**, v. 21, n.6,p. 425-29, 2006.
- DINARELLO, C.A. Biological basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, v. 87, 2065-2147, 1996.
- 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. **Ver. Nutr.**, v.19, n. 3, p. 341-348, 2006.
- EGUCHI, R.; CHEIK, N.C.; OYAMA, L.M.; DO NASCIMENTO, C.M.O.; DE MELLO, M.T.; TUFIK, S.; DAMASO, A. Efeitos do Exercício Crônico Sobre a Concentração Circulante da Leptina e Grelina em Ratos com Obesidade Induzida por Dieta. **Ver. Brás. Med. Esporte**, 2008; 14 (3): 182-87
- ESTADELLA, D., OYAMA, L.M., DAMASO, A.R., RIBEIRO, E.B., DO NASCIMENTO, C.M.O. Effect of Palatable Hyperlipidic Diet on Lipid Metabolism of Sedentary and Exercised Rats. **Basic Nutri. Invest.**, 2004; 20: 218 –24.
- ESTADELLA, D. Dieta palatável hiperlipídica modifica o metabolismo cerebral e do tecido adiposo de ratos, dependendo da idade e do tempo de tratamento. São Paulo; s.n; 2005. [112] p. Apresentada a Universidade Federal de São Paulo. **Escola Paulista de Medicina**. Curso de Nutrição para obtenção do grau de Doutor

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. **Endocrinology**, v. 145, p. 2273–2282, 2004.

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 operation. **Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v. 40, p. 126-129, 1992.

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

FRANCO, L.D.P., CAMPOS, J.A.D.B., DEMONTE, A. Teor lipídico da dieta, lipídios séricos e peso corporal em ratos exercitados. **Rev. de Nutr.**, v. 22, p. 359-366, 2009.

GAÍVA, M.H.G., COUTO, R.C., OYAMA, L.M., COUTO, G.E.C., SILVEIRA, V.L.F., RIBEIRO, E.B., NASCIMENTO, C.M.O. Polyunsaturated fatty acids rich diets: effect on adipose tissue metabolism in rats. **British Jour. of Nut.**, 2001; 86: 371-7.

GONÇALVES, E.L., WAITZBERG, D.L., BEVILACQUA, R.G., BEVILACQUA, L.R. Composição corpórea em diferentes condições nutricionais: estudo experimental. **Rev. Paul. Med.**, 1990;108(3):125-33.

GOTTSCHLICH, M.M., MAYES, T., KHOURY, J.C., WARDEN, G.D. Significance of obesity on nutritional, immunologic, hormonal and clinical outcome parameters in burns. **J. am. Diet. Assoc.**, v. 93, p. 1261-1268, 1993.

KERSHAW, E.E., FLIER, E.S. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 89, n. 6, p. 2548–2556, 2004.

LEMIEUX, I., PASCOT, A., PRUD'HOMME, D., ALMÉRAS, N., BOGATY, P., NADEAU, A. Elevated C-Reactive Protein. Another Component of the Atherothrombotic Profile of Abdominal Obesity. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 21, n. 6, p. 961-967, 2001.

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.

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

- MOULTON, M.J., CRESWELL, L.L., MACKEY, M.E., COX, J.L., ROSENBLOOM, M.R. 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.
- NIEMAN, D.C., NEHLSSEN-CANNARELLA, S.L., HENSON, D.A., BUTTERWORTH, D.E., FAGOAGA, O.R., WARREN, B.J., RAINWATER, M.K. Immune responses to obesity and moderate weight loss. **Int. J. Obes.**, v. 20, p. 353-360, 1996.
- NIEMAN, D.C., HENSON, D.A., NEHLSSEN-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.
- PAULI, J.R., ROPELLE, E.R., CINTRA, D.E., SOUZA, C.T. Efeitos do Exercício Físico na Expressão e Atividade da AMPK $\alpha$  em Ratos Obesos Induzidos por Dieta Rica em Gordura. **Ver. Bras. Med. Esporte**, v. 15, n. 2, p. 98-103, 2009.
- PLATA-SALAMÁN, C.R. Anorexia during acute and chronic disease. **Nutrition** 1996; 12: 69-78.
- SÁNCHEZ-MARAGALET, V., MARTÍN-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, n. 1, p. 11-19, 2003.
- SANTOS, R.S., VIANNA, L.M. Dieta hipercalórica agrava a hipertensão arterial em ratos espontaneamente hipertensos. **Nutrire Rev. Soc. Bras. Aliment. Nutr.** 2007;32(1):1-9.
- VACHHARAJANI, V., VITAL, S. Obesity and Sepsis. **J, Intensive Care Med.**, v. 21, p. 287-295, 2006.
- STALLONE, D.D. The influence of obesity and its treatment on the immune system. **Nutr. Rev.**, v. 52, p. 37-50, 1994.
- STRACZKOWSKI, M., DZIENIS-STRACZKOWSKA, S., STÊPIEŃ, A., KOWALSKA, I., SZELACHOWSKA, M., KINALSKA, I. Plasma Interleukin-8 Concentrations Are Increased in Obese Subjects and Related to Fat Mass and Tumor Necrosis Factor-alpha System. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 87, n. 10, p. 4602-4606, 2002.

TRAYHURN, P.E., WOOD, I.S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. **Br. J. Nutr.**, v. 92, n. 3, p. 347-355, 2004.

WAJCHENBERG, B.L. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. **Endocr. Rev.**, v. 21, p. 697-738, 2000.

WOMACK, J., TIEN, P.C., FELDMAN, J., SHIN, J.H., FENNIE, K., ANASTOS, K., COHEN, M.H., BACON, M.C., MINKOFF, H. Obesity and immune cell counts in women. **Metab. Clin. and Expe.**, v. 56, p. 998-1004, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Overweight and obesity - a new nutrition emergency? **SCN News**, Geneva, n. 29, p. 3-4, 2005.

ZHANG, W., CHEN, H. The study on the interleukin-8 (IL-8). **Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi**, v. 19, n. 4, p. 697-702, 2002.

## OBESIDADE E PERFIL HEMATOLÓGICO NA ENDOTOXEMIA

Karla Melo Ferreira da Silva<sup>1</sup>,  
Rosangela Rosendo da Silva<sup>2</sup>,  
Solange Maria Magalhães da Silva Porto<sup>3</sup>,  
Alexandra de Melo Morais<sup>4</sup>,  
Bruno Sampaio<sup>5</sup>,  
Célia Maria Machado Barbosa de Castro<sup>6</sup>.

<sup>1</sup> Mestranda em nutrição, Departamento de nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco<sup>a</sup>.

<sup>2/3</sup> Doutoranda em nutrição, Departamento de nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco.

<sup>4</sup> Biomédica.

<sup>5</sup> Aluno de Iniciação Científica, Graduando do curso de Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco.

<sup>6</sup> Professora e Vice-coordenadora do curso de Pós-Graduação em Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco.

<sup>a</sup>Av. Prof. Moraes Rego s/n - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife – PE.

Autor para tramitação:

Karla Melo Ferreira da Silva

Endereço: Estrada das Ubaias, 245, Casa Forte – CEP: 52061-080 – Recife- PE.

Telefone: (81) 34410080 / (81) 88095817

E-mail: [karlamfsilva@hotmail.com](mailto:karlamfsilva@hotmail.com)

## RESUMO

**Introdução:** Uma vez considerado um problema em países de rendimento elevado, sobrepeso e obesidade, estão agora aumentando drasticamente em países de baixa e média renda, especialmente em áreas urbanas. É uma condição complexa, com dimensões sociais e psicológicas sérias, afetando a indivíduos de todas as idades e grupos socioeconômicos. A morbidade associada inclui, por exemplo, diabetes tipo II, dislipidemias, hipertensão, doença coronariana, alterações menstruais e esterilidade. Além destas doenças, a obesidade leva também a alterações nas células hematológicas.

**Material e métodos:** Foram utilizados 40 ratos machos, albinos, da linhagem *Wistar*. A partir do desmame, os animais foram divididos em dois grupos segundo o regime dietético, sendo cada grupo composto por vinte animais. O grupo controle (DP) foi alimentado com dieta padrão do biotério (Labina-Purina do Brasil S/A) e o grupo obeso (DH) foi mantido com uma dieta hipercalórica e hiperlipídica que consiste em uma mistura hipercalórica (normoprotéica e hiperlipídica) contendo ração comercial LABINA<sup>®</sup>, amendoim torrado, chocolate ao leite e biscoito maisena. Após 18 semanas de consumo das dietas, metade dos animais de cada grupo foi submetido à endotoxemia, constituindo então quatro grupos: controle endotoxêmico e não endotoxêmico, obeso endotoxêmico e não endotoxêmico. Para obtenção da endotoxemia, os animais receberam injeção intraperitoneal de lipopolissacarídeo (sorotipo *Escherichia coli*; 055: B5, Sigma). 24 horas após a injeção, coletou-se sangue para realização de contagem total e diferencial de leucócitos, contagem de plaquetas, hematócrito (Htc), hemoglobina (Hb) e contagem de hemácias (CH). **Resultados:** Os animais obesos apresentaram modificação do hemograma tanto na ausência da infecção, quanto após a presença da endotoxina bacteriana. Nos obesos sem infecção, os três parâmetros da série vermelha apresentaram redução de: 33% de CH, 26% de Hct e 20% de Hb. Após a ocorrência de infecção bacteriana, os valores de Htc e CH apresentaram-se, agora, aumentados, chegando a 33% de aumento para cada um destes parâmetros, enquanto a Hb não foi modificada em relação ao padrão. A contagem de plaquetas, assim como o número total de leucócitos não foram alterados na ausência da infecção. O grupo padrão, após ser submetido à endotoxemia, respondeu com um número 30% maior de leucócitos quando comparado ao grupo DH, nesta condição, os animais obesos também apresentaram valores menores de neutrófilos em relação ao padrão endotoxêmico. A contagem diferencial de leucócitos também apresentou redução no número de linfócitos, com diminuição de 38% antes da infecção e 43% depois da endotoxemia. Mesmo com a presença do LPS, a contagem de plaquetas manteve-se comparável entre os dois grupos. **Conclusão:** As alterações encontradas nos parâmetros hematológicos em resposta ao desenvolvimento da obesidade mostram o quanto comum tais anormalidades podem ser encontradas em hemogramas e reforçam a importância do conhecimento de tais alterações por parte dos analistas clínicos. É de relevante importância o hábito de uma dieta adequada e da atividade física contínua para manutenção da gordura corporal e no combate aos efeitos maléficos da obesidade.

**Palavras-chaves:** Dieta hipercalórica; Obesidade; Hematologia; Endotoxemia.

## ABSTRACT

**Introduction:** Once considered a problem in high-income countries, overweight and obesity are now dramatically increasing in low and middle income countries, especially in urban areas. It is a complex condition, with social and psychological dimensions serious, affecting individuals of all ages and socioeconomic groups. Morbidity includes, for example, type II diabetes, dyslipidemia, hypertension, coronary disease, menstrual disorders and infertility. In these diseases, obesity also leads to changes in hematologic cells. **Methods:** We used 40 male rats, albino Wistar. After weaning, the animals were divided into two groups according to the dietary regimen, each group consisted of twenty animals. The control group was fed a standard diet (chow-Purina of Brazil S / A) and the obese group was maintained on a palatable fat diet consisting of a mixture calorie (normal protein and fat diet) containing commercial feed LABINA ®, roasted peanuts, chocolate milk and cookies cornstarch. The lasted, during which time all animals were weighed on alternate days. After the period of administration of the respective diets, 18 weeks, half the animals in each group was subjected to endotoxemia then constituting four groups: control endotoxemic and not endotoxemic, obese endotoxemic and not endotoxemic. To obtain the endotoxemia, animals received intraperitoneal injection of lipopolysaccharide (serotype Escherichia coli, 055: B5, Sigma). 24 hours after injection, blood was collected to perform the count and differential leukocyte count, platelet count, hematocrit (Hct), hemoglobin (Hb) and red blood cell count (CH). **Results:** The obese animals showed changes in blood both in the absence of infection, and after the presence of bacterial endotoxin. In obese patients without infection, the three parameters of the red series showed a reduction: 33% CH, 26% Hct and 20% to Hb. After the occurrence of bacterial infection, the values of Hct and CH group is now increased, reaching 33% increase for each of these parameters, while Hb was not changed from the default. The platelet count, as well as the total number of leukocytes were not altered in the absence of infection. The default group, after being subjected to endotoxemia, responded with a 30% higher number of leukocytes when compared to the DH in this condition, the obese animals also showed lower values of neutrophils from the default endotoxemia. The leukocyte count also showed a reduction in the number of lymphocytes, a decrease of 38% before infection and 43% after endotoxemia. Even with the presence of LPS, the platelet count remained comparable between the two groups. **Conclusion:** The changes found in blood parameters in response to the development of obesity reinforce how common such abnormalities can be found in blood counts. It is of critical importance in the habit of a proper diet and physical activity continues to maintain body fat and to combat the harmful effects of obesity.

**Keywords:** High fat diet, obesity, Hematology; Endotoxemia.

## INTRODUÇÃO

Segundo Batista Filho e Rissin (2003), ao mesmo tempo em que declina a ocorrência da desnutrição em crianças e adultos num ritmo bem acelerado, aumentam a prevalência de sobrepeso e obesidade na população brasileira. A projeção dos resultados de estudos efetuados nas últimas três décadas é indicativa de um comportamento claramente epidêmico do problema. Estabelece-se, dessa forma, um antagonismo de tendências temporais entre desnutrição e obesidade, definindo uma das características marcantes do processo de transição nutricional do país.

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 as causas de morte mais comuns atualmente. Segundo a Organização Mundial da Saúde (2003), a hipertensão arterial e a obesidade correspondem aos dois principais fatores de risco responsáveis pela maioria das mortes e doenças no mundo.

Segundo Fisberg (2004) a obesidade pode ser considerada como um acúmulo anormal ou excessivo de tecido gorduroso, regionalizado ou em todo o corpo, caracterizando-se como uma das doenças não transmissíveis que mais cresce em todo o mundo, pois, nas últimas décadas, tem se apresentado nas diversas faixas etárias. Ela pode ser considerada como a doença de maior morbidade no paciente adulto, e está relacionada à pobreza, raça, condições genéticas e ambientais.

A acumulação excessiva de tecido adiposo (obesidade) deriva de um aporte calórico excessivo e crônico de substratos combustíveis presentes nos alimentos e bebidas (proteínas, hidratos de carbono, lipídios e álcool) em relação ao gasto energético (metabolismo basal, efeito termogênico e atividade física). Nessa acumulação intervêm tanto os hábitos alimentares e de estilo de vida, os fatores sociológicos e as alterações metabólicas e neuro-endócrinas, como os componentes hereditários (MARTÍNEZ; FRÜHBECK, 1996; MARQUES-LOPES et al., 2001, 2004; CORBALAN et al., 2002).

A grande similaridade e homologia entre os genomas de roedores e seres humanos tornam os modelos animais uma grande ferramenta para estudar as condições que afetam os seres humanos, que podem ser simuladas em ratos. 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 (DIEMEN; TRINDADE; TRINDADE, 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).

A visão tradicional do tecido adiposo como um passivo reservatório para o armazenamento de energia não é mais válido (KERSHAW; FLIER, 2004). O tecido adiposo é agora conhecido por expressar e secretar uma variedade de peptídeos bioativos, conhecidos como adipocinas, que atuam a nível autócrino, parácrino e sistêmico. (COSTA; DUARTE, 2006).

Assim, além do repertório biológico necessário para armazenar e liberar energia, o tecido adiposo contém a maquinaria metabólica para permitir a comunicação com órgãos distantes. Através desta interativa rede, o tecido adiposo é integralmente envolvido na coordenação uma variedade de processos biológicos, incluindo o metabolismo energético, função neuroendócrina e função imunológica. A importante função endócrina do tecido adiposo é enfatizada pelas conseqüências adversas metabólicas de ambos: excesso e deficiência de tecido adiposo. (KERSHAW; FLIER, 2004).

Endotoxinas ou lipopolissacarídeos (LPS) são produzidos por bacilos Gram negativos desencadeando reação inflamatória sistêmica. O LPS se localiza na parte externa da membrana bacteriana e é liberado a partir da replicação e/ou morte bacteriana (DE CASTRO et al.,1997). O efeito biológico da endotoxina é de gerar e amplificar uma resposta inflamatória. A administração parenteral 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.

A partir das alterações já conhecidas provocadas pelo excesso de gordura corporal, este trabalho teve como objetivo analisar as possíveis mudanças que a obesidade pode causar nas contagens de células hematológicas e qual a evolução destas modificações em casos de instalação de processo infeccioso sistêmico.

## MÉTODOS

### Delineamento experimental

Foram utilizados 40 ratos machos, albinos, da linhagem Wistar, provenientes da colônia de criação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos no biotério em temperatura de  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , sob ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo ração e água *ad libitum*, segundo recomendação ética do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética do Centro de ciências Biológicas da universidade Federal de Pernambuco.

### Grupos

Os animais foram divididos inicialmente em dois grupos segundo o regime dietético empregado. O grupo controle (DP) foi constituído de 20 animais que receberam dieta padrão do biotério (Labina-Purina do Brasil S/A). O grupo dieta obeso (DH) foi formado por 20 animais que receberam dieta hipercalórica e hiperlipídica.

Aos 147 dias de idade, após terem recebido as respectivas dietas por 18 semanas, os dois grupos iniciais foram subdivididos em endotoxêmicos e não endotoxêmicos.

Para obtenção dos grupos endotoxêmicos, os animais receberam injeção intraperitoneal de LPS, lipopolissacarídeo, (sorotipo *Escherichia coli*; 055: B5, Sigma) na dose de 1mg/Kg de peso corporal, preparado com NaCl a 0,9%. Os grupos que não sofreram endotoxemia, apenas receberam, pela mesma via, NaCl a 9% em igual proporção, como uma forma de igualar o estresse sofrido pela injeção. 24 horas após a administração do LPS ou do NaCl, foram coletadas amostras de sangue de cada animal para dosagens bioquímicas (De Castro et al., 1997).

### Dieta hipercalórica e hiperlipídica

A dieta hipercalórica empregada para induzir obesidade consiste em uma mistura hipercalórica (normoprotéica e hiperlipídica). É composta por ração comercial LABINA<sup>®</sup>, amendoim torrado, chocolate ao leite e biscoito maisena, na proporção 3:2:2:1. Destes constituintes, a ração, o amendoim e o biscoito são moídos, já o chocolate é derretido em banho Maria. Após essa primeira fase, todos os ingredientes são misturados até formarem uma massa, que é posteriormente aquecida em estufa e oferecida na forma de péletes.

A densidade calórica para a dieta hipercalórica palatável foi de 4,8 kcal/100g (24,5% de Lipídeos), enquanto que a dieta padrão apresentou 2,7 kcal/100g (4% de Lipídeos).

#### **Amostras sanguíneas**

O sangue foi obtido realizando-se um pequeno corte com bisturi na extremidade da cauda do animal. A amostra foi depositada em tubos previamente acrescidos de anticoagulante (EDTA - ácido etileno diaminotetraacético a 3%).

#### **Contagem de leucócitos**

Para contagem total dos leucócitos foi utilizada a câmara de Neubauer. Uma alíquota da amostra foi diluída a 1:20 em solução diluidora de leucócitos (solução de Turk). Os leucócitos foram então visualizados ao microscópio de luz, utilizando-se a objetiva de 10x.

A contagem diferencial de leucócitos foi realizada utilizando-se a técnica do esfregaço sanguíneo. Para a coloração foi utilizado o kit Panótico Rápido – Laborclin Ltda. Depois de secas, as lâminas foram analisadas ao microscópio de luz com a objetiva de imersão de 100x e contabilizados através de um contador eletrônico da marca Kacil. A partir dos dados obtidos foram calculados os valores absolutos e relativos para cada tipo de célula.

#### **Contagem de Hemácias, Hematócrito e Concentração de Hemoglobina**

As hemácias foram diluídas em tampão fosfato de sódio, na proporção de 1:200 e, posteriormente, quantificadas com o auxílio da câmara de Neubauer.

Para determinação do hematócrito realizou-se a técnica do microhematócrito. A percentagem ocupada pelos glóbulos vermelhos no volume total de sangue foi obtida pela centrifugação a 10.000 r.p.m. por 5 minutos do sangue dentro de um tubo capilar.

Para determinação dos valores de hemoglobina, foi utilizado o método da cianometemoglobina. As leituras colorimétricas foram realizadas em espectrofotômetro, utilizando-se um comprimento de onda de 540 nm.

#### **Plaquetas**

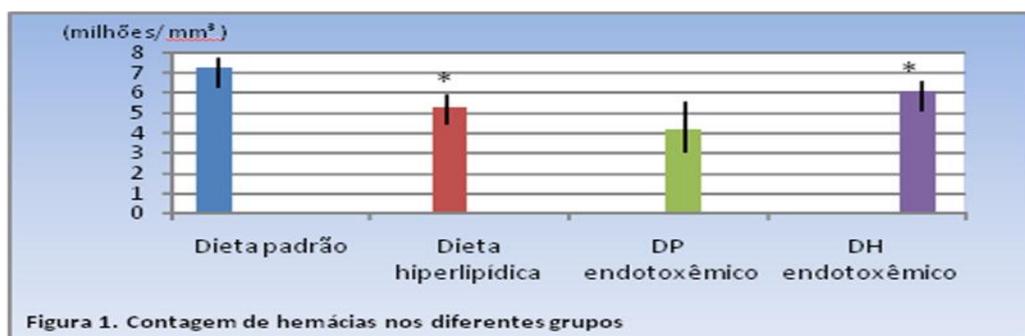
As plaquetas foram contadas utilizando-se o método de Fônio. Este método consiste na contagem das mesmas em relação ao número de eritrócitos. Para isso, foi utilizada a lâmina do esfregaço sanguíneo, esta foi focalizada ao microscópio de luz em objetiva de imersão (100x). Foram contados os eritrócitos e as plaquetas até perfazer 1000 glóbulos vermelhos em 5 campos diferentes. Após isso, foi estabelecida uma

relação entre o número de plaquetas encontradas para 1000 eritrócitos e o número total de plaquetas por mL de sangue para a quantidade total de eritrócitos do sangue por ml.

## RESULTADOS

### Hemácias (milhões/mm<sup>3</sup>)

Nos grupos sem endotoxemia, a obesidade ocasionou uma diminuição significativa no número de hemácias, DP=  $7.2 \pm 0.2$ ; DH=  $5.2 \pm 0.4$  (P=0.001). Em relação aos dois grupos que receberam LPS, também ocorreu diferença na contagem de hemácias entre os dois, porém com valores maiores no grupo obeso, DPE=  $4.1 \pm 0.7$ ; DHE=  $6.0 \pm 0.4$  (P= 0.033).

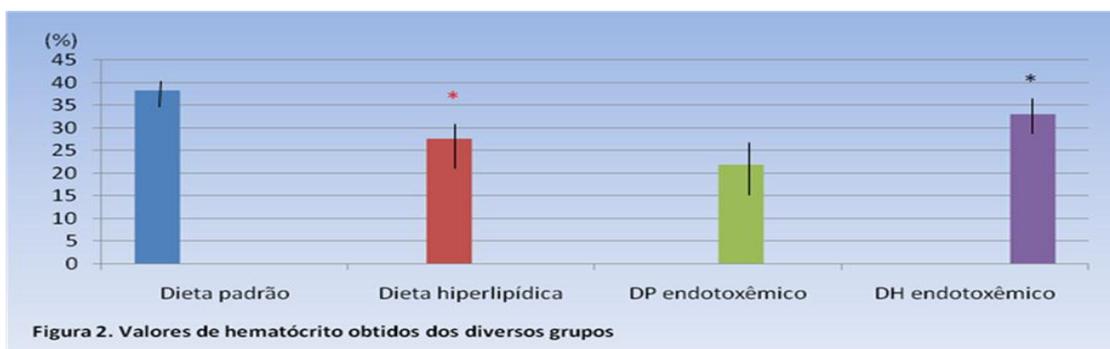


Nota: Resultados mostrados em média ± erro padrão.

Presença de \* significa diferença estatisticamente significativa,  $p \leq 0,05$ .

### Hematócrito (%)

O grupo obeso apresentou valores de Hct menores que o grupo controle DP=  $38.3 \pm 1.4$ ; DH=  $27.6 \pm 2.4$  (P= 0.001). Quando comparados os dois grupos endotoxêmicos, os que receberam dieta hipercalórica apresentaram valores maiores de Hct, DPE=  $21.9 \pm 4.3$ ; DHE=  $33.1 \pm 2.3$  (P= 0.033).

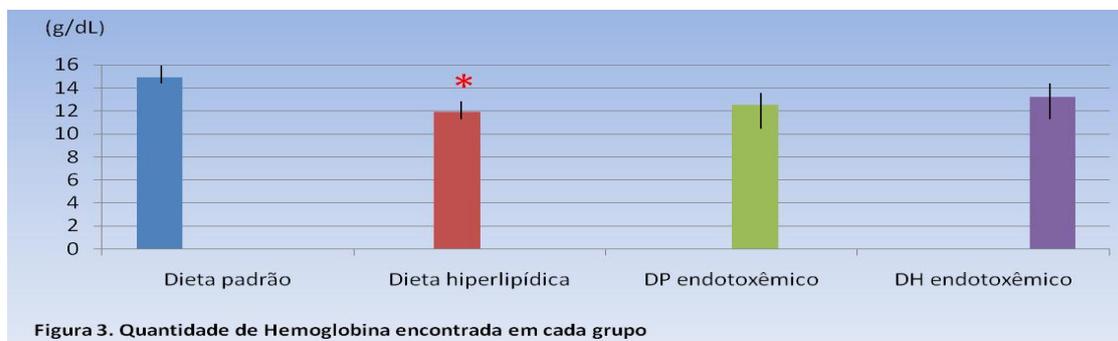


Nota: Resultados mostrados em média ± erro padrão.

Presença de \* significa diferença estatisticamente significativa,  $p \leq 0,05$ .

### Hemoglobina (g/dL)

Os valores de Hb mostraram o mesmo comportamento que os outros dois parâmetros da série vermelha, com valores menores no grupo obeso, DP=  $14.9 \pm 0.4$ ; DH=  $11.9 \pm 0.4$  (P=0.001). Porém, após instalação da endotoxemia, os valores passaram a ser equiparados ao do grupo controle, DPE=  $12.5 \pm 0.8$ ; DHE=  $13.2 \pm 0.9$ .

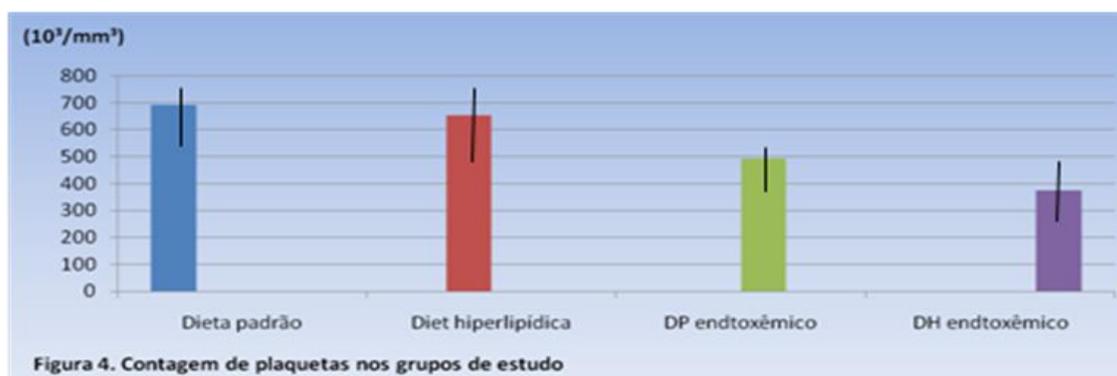


Nota: Resultados mostrados em média  $\pm$  erro padrão.

Presença de \* significa diferença estatisticamente significativa,  $p \leq 0,05$ .

### Plaquetas ( $10^3/\text{mm}^3$ )

O número de plaquetas apresentou-se significativamente reduzido em ambos os grupos submetidos à endotoxemia, seja controle (P= 0.008) ou obeso (P= 0.001). Contudo, a contagem de plaquetas foi semelhantes nos grupos obeso e padrão, com ou sem entotoxemia, DP=  $692.3 \pm 48.4$ ; DH=  $655.5 \pm 150.5$ ; DPE=  $494.4 \pm 44.7$ ; DHE=  $375.3 \pm 65.1$ .



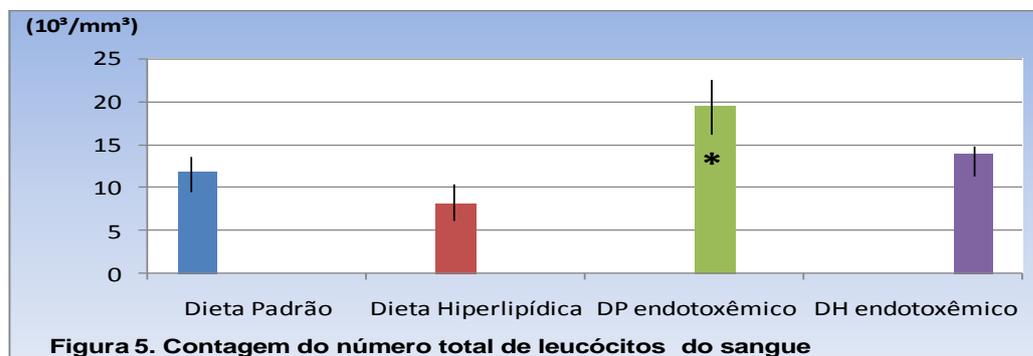
Nota: Resultados mostrados em média  $\pm$  erro padrão.

Ausência de \* significa falta de diferença estatística significativa,  $p \leq 0,05$ .

### Leucócitos totais ( $10^3/\text{mm}^3$ )

A comparação entre os grupos DP e DH não apresentou diferença estatística significativa, DP=  $11.8 \pm 1.5$ ; DH=  $8.2 \pm 1.1$ , apesar da tendência do grupo obeso a valores menores de leucócitos. O grupo que recebeu dieta padrão e foi submetido à

endotoxemia apresentou valores significativamente maiores do número total de leucócitos em relação ao grupo DH, aumento que chegou a 30%. DPE=  $19.6 \pm 3.1$  ( $P=0.035$ ), DHE=  $13.9 \pm 2.0$ .



Nota: Resultados mostrados em média  $\pm$  erro padrão.

Presença de \* significa diferença estatisticamente significante,  $p \leq 0,05$ .

### Leucócitos diferenciais

Não houve alteração significativa do número absoluto de eosinófilos e monócitos quando comparados todos os grupos. Os valores absolutos de linfócitos foram significativamente menores nos grupos obesos, tanto na ausência ( $P=0.017$ ) como na presença ( $P=0.001$ ) de processo inflamatório. Já em relação aos neutrófilos, os grupos que receberam LPS apresentaram maior número absoluto destas células, tanto os que se alimentaram de dieta padrão quanto os que se alimentaram de dieta rica em lipídeos. Na comparação entre estes dois grupos endotoxêmicos, o aumento decorrente da infecção foi significativamente menor no grupo obeso. No entanto, quando comparamos os dois grupos que não receberam LPS (DP e DH), não evidenciamos diferença significativa.

**Tabela 2.** Médias dos valores absoluto e relativo dos diferentes leucócitos do sangue.

Nota: Resultados mostrados em média  $\pm$  erro padrão do valor absoluto.

Presença de \* significa diferença estatisticamente significativa do valor absoluto,  $p \leq 0,05$ .

LEUCÓCITOS DIFERENCIAIS DO SANGUE								
GRUPOS	Linfócito		Neutrófilo		Eosinófilo		Monócito	
	Relativo (%)	Absoluto ( $10^3/\text{mm}^3$ )						
DP	69,8	$8.37 \pm 1.18$	22,3	$2.4 \pm 0.27$	1,6	$0.18 \pm 0.08$	6,3	$0.85 \pm 0.22$
DH	59,4	$4.66^* \pm 0.57$	31,8	$2.74 \pm 0.46$	3,4	$0.31 \pm 0.07$	5,4	$0.48 \pm 0.14$
DPE	40,8	$7.43 \pm 0.84$	54,4	$11.16 \pm 2.29$	0,7	$0.16 \pm 0.07$	4,1	$0.81 \pm 0.24$
DHE	31,5	$3.9^* \pm 0.38$	62,4	$9.13^* \pm 1.9$	2,2	$0.38 \pm 0.17$	3,9	$0.47 \pm 0.09$

## DISCUSSÃO

As alterações orgânicas causadas pela obesidade podem levar a modificações no padrão de vários exames laboratoriais, devendo então os resultados serem interpretados de forma particular.

A interpretação dos resultados de qualquer exame laboratorial requer que se avalie se este resultado é normal ou não. Uma vez que raramente se dispõem de informações para fazer esta afirmação, é necessário, ao invés disso, considerar se o resultado é o que seria esperado em um indivíduo sadio, biologicamente tão parecido quanto o indivíduo em questão (BAIN, 1997).

Os resultados do presente estudo mostraram diferenças em diversos pontos do hemograma quando se tratava de animais com excesso de gordura. Tais modificações em relação aos ratos eutróficos podem indicar um comportamento característico das células hematológicas em indivíduos obesos.

Dentre os parâmetros estudados, pode-se dizer que a série vermelha foi a que mais apresentou alterações. Ao se induzir a obesidade, ocorreu diminuição das três análises estudadas: Hct, Hb e contagem de hemácias. Após a presença da endotoxina, duas destas análises mostraram-se, agora, aumentadas: Hct e contagem de hemácias, enquanto a Hb apresentou valores comparáveis ao grupo padrão.

A diminuição da contagem de um tipo celular pode decorrer de diminuição da liberação medular, redistribuição ou sobrevida encurtada na circulação; neste último caso, decorrente de um defeito no eritrócito ou de fatores extrínsecos (BAIN, 1997). Como o tecido adiposo é também um órgão endócrino, pode-se levantar as hipóteses da

ação deste tanto a nível medular, quanto na redistribuição ou sobrevida das hemácias. No entanto, são necessários estudos adicionais para afirmação desta hipótese.

O aumento de um tipo celular resulta da redistribuição de células ou de um aumento na liberação medular. Às vezes, e mais na série eritróide, pode resultar da diminuição do volume plasmático (BAIN, 1997). Neste contexto, em resposta ao estado infeccioso, é comum a presença da desidratação, com conseqüente diminuição do volume plasmático. Neste caso, após a endotoxemia, os obesos apresentaram maiores valores de hemácias e Hct em relação ao padrão, este resultado pode ter como causa ou uma maior desidratação sofrida pelos obesos, ou por estes requererem maiores níveis de hemácias para oxigenação eficaz nos casos de infecção.

Várias linhas de evidências têm apoiado um elo entre tecido adiposo e células imunológicas (MARTÍ; MARCOS; MARTINEZ, 2001). Estudo com mulheres portadoras do vírus HIV, com diferentes pesos corporais, apresentou que as associações entre peso e diminuição das contagens de células imunes ficaram mais fortes com o aumento de peso corporal (WOMACK et al., 2007).

Segundo Abbas e Lichtman (2005), os linfócitos são as células do corpo capazes de reconhecer e distinguir de modo específico diversos determinantes antigênicos e são, conseqüentemente, responsáveis por duas características definidoras da resposta imunológica adquirida, especificidade e memória.

O número absoluto de linfócitos nos animais obesos apresentou-se significativamente menor, na ausência ou presença da endotoxemia. De acordo com Roitt (1995), quando ratos têm diminuídos seus linfócitos eles passam a apresentar uma capacidade imunológica muito diminuída no que se refere a uma resposta primária de anticorpos ao antígeno. A linfocitopenia, redução da contagem de linfócitos, é extremamente comum como parte na resposta aguda ao estresse. É importante compreender que a linfocitopenia é comum nos pacientes agudamente enfermos, independente da natureza da doença subjacente. A obesidade é caracterizada por um estado de baixo grau de inflamação. O motivo para afirmar isso é o aumento dos níveis circulantes de vários marcadores inflamatórios, como as citocinas pró-inflamatórias e as proteínas de fase aguda, este estado pode ser considerado pelos linfócitos como uma resposta à infecção.

Após a sepse causada pela endotoxina bacteriana, os animais obesos aumentaram seus níveis circulantes de neutrófilos, porém este aumento foi significativamente menor que o acréscimo ocorrido no grupo dieta padrão. De acordo

com Bain (1997), a resposta usual a uma infecção bacteriana é a neutrocitose, aumento de neutrófilos, com redução das contagens de linfócitos e eosinófilos. Na sepse avassaladora, a infecção pode estar associada a leucopenia ou neutropenia paradoxais. A neutropenia, em infecções que na maioria das vezes causam neutrofilia, pode decorrer do aumento da marginação dos leucócitos, da redução da granulopose ou da migração dos leucócitos em número maior que sua substituição, devido à escassez das reservas da medula óssea. Pode-se concluir que obesos reagem à infecção com aumento de neutrófilos, no entanto esta reação não consegue atingir os mesmos níveis alcançados por um eutrófico.

Vistas as alterações que o excesso de gordura pode causar, é importante atentar às principais causas da obesidade. A acumulação excessiva de tecido adiposo (obesidade) deriva de um aporte calórico excessivo e crônico de substratos combustíveis presentes nos alimentos e bebidas (proteínas, hidratos de carbono, lipídios e álcool) em relação ao gasto energético (metabolismo basal, efeito termogênico e atividade física). Nessa acumulação intervêm tanto os hábitos alimentares e de estilo de vida, os fatores sociológicos e as alterações metabólicas e neuro-endócrinas, como os componentes hereditários (MARTÍNEZ; FRÜHBECK, 1996; MARQUES-LOPES et al., 2001, 2004; CORBALAN et al., 2002).

## **CONCLUSÃO**

As alterações encontradas nos parâmetros hematológicos em resposta ao desenvolvimento da obesidade mostram o quanto comum tais anormalidades podem ser encontradas em hemogramas e reforçam a importância do conhecimento de tais alterações por parte dos profissionais da saúde, especialmente os analistas clínicos. É de relevante importância o hábito de uma dieta adequada e da atividade física contínua para manutenção da gordura corporal e no combate às alterações causadas pela obesidade.

## **REFERÊNCIAS**

ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H. **Imunologia celular e molecular**. 6º Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

- BAIN, B.J. **Células sanguíneas um guia prático**. 2º Ed. Porto alegre: Artes Médicas, 1997.
- BATISTA FILHO, M., RISSIN, A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. **Cad. Saúde Pública**, v.19, p. 181-191, 2003.
- CORBALAN, M.S., MARTI, A., FORGA, L., MARTINEZ-GONZALEZ, M.A., MARTÍNEZ, J.A., FRÜHBECK, G. Regulation of energy balance and adiposity: a model with new approaches. **J Physiol Biochem**, v. 52, p. 255-258, 1996.
- COSTA, J.V., DUARTE, J.S. Tecido adiposo e adipocinas. **Acta Med. Port.**, v. 19, p. 251-256, 2006.
- DE CASTRO, C.M.M.B., DE CASTRO, R.M., ANDRADE, A.D., BRANDT, C.T. LPS bacteriano: um mediador de inflamação. **Fac. Méd. Univ. Fed. Pernamb.**, v. 42, n. 2, p. 78-83, 1997.
- DIEMEN, V.V., TRINDADE, E.N., TRINDADE, M.R.M. Experimental model to induce obesity in rats. **Acta Cir. Brás.**, v. 21, n.6,p. 425-29, 2006.
- DINARELLO, C.A. Biological basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, v. 87, 2065-2147, 1996.
- FISBERG, M. Primeiras palavras: uma introdução ao problema do excesso de peso. In: **Atualização em Obesidade na Infância e na Adolescência**. São Paulo: Atheneu, cap. 1, p. 1-9, 2004.
- KATAN, M.B. Fatty acids and health: an update. **Scand. J. Nutr.**,v. 43, p. 26, 1999.
- KERSHAW, E.E., FLIER, E.S. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 89, n. 6, p. 2548–2556, 2004.
- MARQUES-LOPES, I., ANSORENA, D., ASTIASARAN, I., FORGA, L., MARTÍNEZ, J.A. Postprandial de novo lipogenesis and metabolic changes induced by a high- carbohydrate, low-fat meal in lean and overweight men. **Am J Clin Nutr**, v. 73, p. 253-261, 2001.
- MARQUES-LOPES, I., MARTI, A., MORENO-ALIAGA, M.J., MARTÍNEZ, A. Aspectos genéticos da obesidade. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 3, p. 327-338, 2004.
- MARTÍ, A., MARCOS, A., MARTINEZ, J.A. Obesity and immune function relationships. **Obes. Reviews**, v. 2, p. 131-140, 2001.
- MARTÍNEZ, J.A., FRÜHBECK, G. Regulation of energy balance and adiposity: a model with new approaches. **J Physiol Biochem**, v. 52, p. 255-258, 1996.

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

ROITT, I.M. **Imunologia**. 5º Ed. Rio de Janeiro: Atheneu, 1995.

WILLET, W. Is dietary fat a major determinant of body fat? **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 67, p. 556-562, 1998.

WOMACK, J., TIEN, P.C., FELDMAN, J., SHIN, J.H., FENNIE, K., ANASTOS, K., COHEN, M.H., BACON, M.C., MINKOFF, H. Obesity and immune cell counts in women. **Metab. Clin. and Expe.**, v. 56, p. 998–1004, 2007.

World Health Organization (WHO). **Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases**. Report of the joint WHO/FAO expert consultation WHO Technical Report Series, No. 916 (TRS 916), 2003. Disponível na URL: <http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/trs916/download/en/>

## **EFFECTS OF OBESITY ON CHANGES IN THE ORAL MICROBIOTA**

Karla Melo Ferreira da Silva<sup>1</sup>  
Solange Maria Magalhães da Silva Porto<sup>2</sup>,  
Rosangela Rosendo da Silva<sup>3</sup>,  
Bruno Sampaio<sup>4</sup>,  
Rafael Acioli Medeiros<sup>5</sup>,  
Célia Maria Machado Barbosa de Castro<sup>6</sup>.

1 MSc in Nutrition, Department of Nutrition, Center for Health Sciences - Federal University of Pernambuco.

2 / 3 Ph.D. in Nutrition, Department of Nutrition, Center for Health Sciences - Federal University of Pernambuco.

4 / 5 Graduating in Biomedicine, Center of Biological Sciences - Federal University of Pernambuco.

6 Associate Professor in the Department of Tropical Medicine, Vice-coordinator of Nutrition Graduation, Center for Health Sciences - Federal University of Pernambuco.

Running title: Influence of consumption of hyperlipidic diet on oral microbiota

Correspondence to Karla Melo Ferreira da Silva.

Address: Estrada das Ubaias, 245, Casa Forte - Recife - Pernambuco - Brazil.

ZIPCODE: 52061-080. Phone: 55 81 88095817

E-mail: karlamfsilva@hotmail.com

## **ABSTRACT**

**OBJECTIVE:** This study investigated the influence of continuous consumption of hypercaloric diet on body weight gain, visceral adiposity, growth and pattern of bacteria from the oral cavity.

**METHODS:** 20 rats were divided into 2 groups: group hyperlipidic, treated with high-fat diet, and the control group, fed a standard diet. The consumption lasted 18 weeks. Was held collection of the microbiota oral using sterile swabs. Culture was held for identification of bacteria and count of colony forming units. All animals were weighed on alternate days and the visceral fat was removed and weighed.

**RESULTS:** A high-fat diet did not cause weight gain, however, led to a statistically significant increase in visceral fat. The oral flora tended to decrease in the number of bacteria in the group hyperlipidic, but this reduction was not statistically significant. The continuous use of high-fat diet alters the pattern of the bacteria, the frequency of some microorganisms and leading to the appearance of some bacteria not found in animals fed diet normocaloric.

**CONCLUSION:** The consumption of high-fat diet and probably obesity, can alter the pattern of the microflora of the oral cavity, thus changing the relationship of microorganisms found there, which facilitates the entry and residence of pathogenic microbes, promoting a possible infection.

**Key-Words:** Microbiota oral, bacteria, immunity, high-fat diet, obesity.

## INTRODUCTION

The etiology of obesity is multifactorial, it is becoming a public health problem because of its increasing prevalence and the consequent impact of comorbidities on the population health.<sup>1</sup>

The increasing prevalence of obesity around the world indicates that behavioral and environmental aspects play an important role as causative factors. There are various environmental influences and the percentage of fat in daily diet and lack of physical activity are the most important factors.<sup>2</sup>

Exposure to a high-fat diet for a prolonged period can result in a positive energy balance and the obesity obtained in experimental models in rodents, can be considered as an appropriate model of obesity in humans.<sup>3,4</sup>

Rats fed with high-fat diet have been widely used as an experimental model for the study of obesity and energy expenditure.<sup>5</sup> In these studies, several energy-rich foods are offered to the animal and may result in increased body weight and adiposity, but occasionally this condition may not occur.<sup>6</sup>

Obesity is characterized by generating losses in the normal state of body and for a completely change of some of the vital functions, among them, the immune system<sup>7</sup>, whose disability is accompanied by an increased rate of infections.<sup>8,9</sup>

A variety of organisms that cause infectious diseases can be grouped into six main categories: viruses, bacteria, fungi, protozoa, helminths and arthropods. Each of these categories shows distinct features that determine ways of interacting with the host and thus contribute to the characteristics of the diseases that these organisms cause. The disease is a complex phenomenon resulting from the invasion and tissue destruction, the elaboration of toxins and the host response.<sup>10</sup>

Some species, however, are positively beneficial to host health and are part of innate immunity. The microbiota is composed of organisms that live in our body without causing disease, which is essential for the protection against the establishment of pathogenic microbes.<sup>11</sup> In the microbiota are included all organisms (bacteria, fungi, protozoa and viruses) that reside within or on the surface of human body healthy.<sup>12</sup> When the usual number of microorganisms living is very low, the opportunistic attackers can then be established more easily.<sup>13</sup>

The oral cavity, for example, is one of the most concentrated and varied microbial populations, whose main location is on the tongue back, the gingival sulcus

and dental plaque disease.<sup>14</sup> It is estimated that the saliva contains  $10^8$  bacteria / mL and the dental plates  $10^{11}$  bactérias/mL.<sup>15</sup>

Porto et al.<sup>16</sup> in their study indicates that the microbiota of the oral cavity of rats subjected to malnutrition early in lactation, showed significant difference compared with the control group, nourished animals, according to the number of bacteria, this group was higher.

This study will evaluate the effect of continued consumption of a hyperlipidic palatable diet after the period of lactation and the microbiota of the oral cavity in adult rats. The study of these aspects is important in terms of experimental and clinical, since nutritional modifications caused in recent decades with the consumption of high-fat foods and calories, highly palatable, stimulate consumption, leading to obesity. Thus, obesity installed in early life of the animal could impair the organic defense mechanisms because of the different reactions of the organism.

## **METHODS**

### **Animals**

We used 20 male rats, albino, Wistar line from the colony of the Department of Nutrition, Federal University of Pernambuco. The animals were kept in captivity at a temperature of  $23 \pm 1$  °C in light / dark cycle of 12 h (light-7 to 19 h, dark-19 to 7 h) and had free access to food and water. The project was accepted by the ethics committee of the Center of Biological Sciences, Federal University of Pernambuco.

The animals were obtained from mating male and female adults, the proportion of one male to three females, for a period of 16 days.<sup>17</sup> diagnosis of pregnancy was done by observing the growth of the womb. One day after birth, the litter was standardized at six male pups per mother.

### **Experimental Groups**

After weaning at 22° days of life, the litters were divided into two groups according to dietary regimen: hyperlipidic group (H) - consisting of 10 animals submitted to the consumption of high-fat diet, and the control group (C) - consisting of 10 animals fed with standard diet as used by the bioterium, Labina- Purina of Brazil S/A.

### **Weight Gain**

The weight of all animals was measured daily from the first day of life until the end of the lactation period (21 days) in order to identify possible abnormalities in body

weight before the imposition of the diets. After weaning until the end of the administration of diets, weighting was performed on alternate days.

### **Hypercaloric diet**

The hypercaloric diet used consisted of a calorie mixture (normal protein and fat diet) previously described and used by Estadella et al.<sup>18</sup> and Duarte et al.<sup>19</sup> It is comprised of commercial feed LABINA®, roasted peanuts, milk chocolate and cookies cornstarch in proportion 3:2:2:1. All constituents feed, peanuts and biscuits were ground and chocolate was melted in water bath. After this first phase, all ingredients are mixed to form a mass which was then heated in an oven and offered in the form of pellets.

The calorie density found for the hypercaloric palatable diet was 4.8 kcal/100g (24.5% of lipids), whereas the standard diet had 2.7 kcal/100g (4% of lipids).

### **Oral Microbiota**

#### **Collection of material for culture**

It was done collection of the oral cavity of all animals after 18 weeks of administration of diets. Each animal was held upright so that its legs were immobilized. Then, the oral bacterial flora was collected using sterile swabs soaked in 40 µl of saline 0.9% NaCl, sterile.

#### **Bacteriological analysis**

After collection, each swab was placed in sterile tube containing 960 µl of culture medium BHI (Brain Heart Infusion) broth that allows bacterial growth. Later, there was also the homogeneity of each of these samples. So of 1000µl, withdrew 1µl with the aid of calibrated loop. This rate was sown in Petri dishes containing blood-agar and Levine-agar, for isolation and identification of Gram-positive and Gram-negative, respectively. These plates were incubated in a bacteriological incubator 37°C for 48 hours. The bacteria that grew were isolated and subsequently slides were prepared for the execution of the Gram stain and with the result, specific tests were performed. The colony forming units (CFU) were counted and their percentages calculated.

#### **Collection of visceral fat**

Visceral fat was collected after the oral microbiota, with the animal anesthetized by a mixture of chloralose and urethane anesthesia in their concentrations of 0.5 and 12.5%, intraperitoneal, and ratio of 1mL/100g per pound of body weight. There was an incision in the abdomen and all organs of this site were removed and the fat separate for later weighting.

### Statistical analysis

For the comparison between groups, we used the Student t test for parametric data and Mann-Whitney for nonparametric. The results are presented as mean  $\pm$  standard error. The significance was set at  $p < 0.05$ .

## RESULTS

### Weight evolution

From the beginning of administration of diets until 18 weeks thereafter, the body weight of animals that received high-fat diet, showed no significant difference as compared with those fed with the standard diet. (Figure 1)



Figure 1. Body weight evolution throughout the period of administration of the diets.

### Visceral fat

Visceral fat group fed with High-fat diet was  $14.5 \pm 0.8$  grams, representing an increase over the standard diet group,  $4.8 \pm 0.3$  grams.  $P = 0.002$ . (Figure 2)

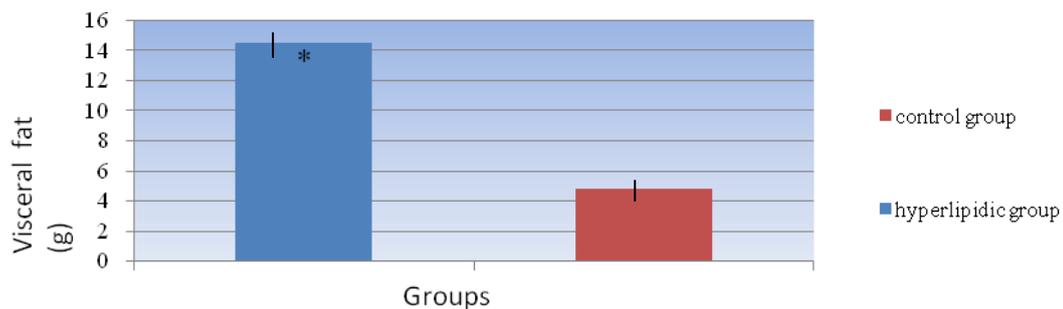


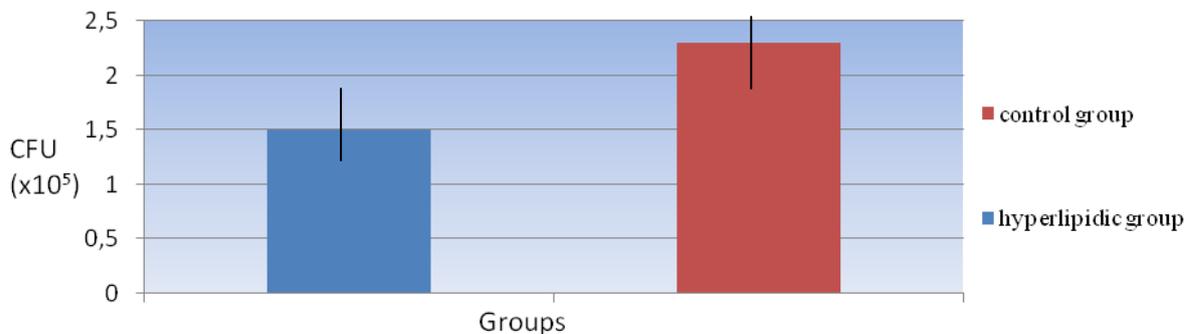
Figure 2. Visceral fat after 18 weeks of administration of diets

Note: Results shown as mean  $\pm$  standard error.

Presence of \* means statistically significant difference,  $p \leq 0.05$ .

## Oral microbiota

After examining the material collected from rats in both groups, was observed that the oral microbiota was composed of fewer bacteria in the group fed high-fat diet,  $CFU = 1.5 \times 10^5 \pm 0.29$  as compared to the group that consumed a standard diet,  $CFU = 2,3 \times 10^5 \pm 0.43$ , although this difference did not have statistical significance. (Figure 3)



**Figure 3. Colony forming units (CFU) found in groups**

Note: Results shown as mean  $\pm$  standard error.

Lack of \* means no statistically significant difference,  $p \leq 0.05$ .

The oral cavity of animals that were fed a standard diet had the following bacteria, in order of frequency: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus sp.*, *Streptococcus viridans*, *Corynebacterium sp.*, *Staphylococcus Saprophyticus* and *Escherichia coli*. In the group fed with high-fat diet, from the bacteria reported, we only did not find the *Corynebacterium sp.*, however, there was growth of bacteria not found in the control group: *Group B Streptococcus*, *Streptococcus group D enterococcus* and *Streptococcus Group D not enterococcus*. In both groups, there was growth of just one type of Gram negative bacteria, while all others were Gram positive. (Table1 and Table2)

**Table 1. Different bacteria and the number of cases in 10 animals of hyperlipidic group**

BACTERIA FOUND	CASES
<b>GRAM +</b>	
<i>Bacillus sp</i>	9
<i>Staphylococcus aureus</i>	9
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	4
<i>Streptococcus group viridans</i>	3
<i>Streptococcus group B</i>	2
<i>Streptococcus group D not enterococcus</i>	1
<i>Streptococcus group D enterococcus</i>	1
<b>GRAM -</b>	
<i>Escherichia coli</i>	1

**Table 2. Different bacteria and the number of cases in 10 animals from control group**

BACTERIA FOUND	CASES
<b>GRAM +</b>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	10
<i>Bacillus sp</i>	8
<i>Streptococcus group viridans</i>	8
<i>Corynebacterium sp</i>	2
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	1
<b>GRAM -</b>	
<i>Escherichia coli</i>	1

## DISCUSSION

In this study, we used a hyperlipidic diet after the period of lactation with evaluations in adult life of the animal. In this study, the consumption of this type of diet started early, from weaning, caused no significant increase in body weight when compared to the control group. These data corroborate those of Eguchi et al.<sup>20</sup> who studied the use of a similar diet and levels of leptin and ghrelin in rats after chronic exercise performance. These results are also in agreement with those of Estadedella et al.,<sup>18</sup> Gaíva et al.,<sup>4</sup> who found that there was no prevalence of animal weight up to 145 days of age, checking weight equivalence between groups. These results are still in agreement with those of Damasus et al.,<sup>18</sup> who also found no change in body weight between the groups using the high-fat diet and standard diet (control) even into adulthood. However, several studies have employed the high-fat diet and that is enough calories, in all its constituents, as an experimental model of obesity.<sup>1,3,5,6,18-20</sup>

The animals from hyperlipidic group had higher adiposity in the visceral region, confirming that the cafeteria diet used is useful to induce exogenous obesity as a factor

in rats, since the World Health Organization (WHO) <sup>21</sup> defines obesity as "abnormal or excessive fat accumulation, with risk to health".

Although there are few studies of the oral microbiota of obese individuals, the results show that an abnormal nutritional manipulation, or malnutrition or obesity, leads to a quantitative and sometimes qualitative change of the bacterial microbiota. The analysis of the oral microbiota of animals obtained in this study revealed that the group hyperlipidic tended to reduce the number of bacteria when compared to the control group.

In this study, we found only one type of Gram negative bacteria, making a percentage of 12.5 in hyperlipidic group and 16.5 in the control group. These percentages indicate that the prevalence for the same bacteria was found in normal microbiota for both groups. These data are consistent with data from the study of Koller et al., <sup>2</sup> they reported that the microbiota of the oral cavity were found in up to 80%, gram-positive bacteria.

It is known that nutritional manipulation can alter the functioning of various systems. The oral microbiota, in turn, is known to undergo significant changes due to modifications made by external factors, or those related to the host and / or bacteria. This may explain the changes in bacterial oral cavity caused by eating disorders.

<sup>12,14,15,22-25</sup> Most of the microorganisms that comprise the microbiota can be found in the oral cavity of healthy individuals.

Therefore, as a result of these changes, there may be an imbalance between the microbiota and the host. This fact may predispose the installation of inflammatory and / or infectious. <sup>26-29</sup> Totti et al. <sup>22</sup>, Yao et al. <sup>30</sup>, Chow et al. <sup>31</sup> reported that there are several factors that contribute to changes in the composition of the microbiota, such as certain genetic and racial, age, maturity of the immune system, diet, puberty, eruption of deciduous and permanent teeth, oral hygiene, caries, periodontal disease or infection, decreased salivary flow and use of medications. Studies with malnutrition show modifications in the amount of bacteria in the oral cavity, with an increase of colony forming units in the malnourished group when compared to the fed. <sup>16</sup>

It can be concluded that obesity imposed by continuous consumption of high fat diet is tasty able to change the pattern and growth of microbes in the oral cavity. This change is likely to growth and infection by pathogenic microbes, mainly due to lower growth of microorganisms protective microflora.

## ACKNOWLEDGEMENT

Several people were instrumental in completing this research. All researchers who study the subject helped with experience and wisdom on the subject. Trainees assisted in all phases of work and deserve our respect and gratitude. The coordination of the guideline was imprescindível for this research could start and be conducted. Finally, I must thank the support of post-graduation in nutrition at the Federal University of Pernambuco, which has all conditions for carrying out the research.

## BIBLIOGRAPHY

1. Diemen VV, Trindade EN, Trindade MRM. Experimental model to induce obesity in rats. *Acta Cir Bras* 2006; 21(6): 425-29.
2. Jequier E. Pathways to obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002;26:S12
3. Lin S, Thomas TC, Storlien LH, Huang XF. Development of high fat diet-induced obesity and leptin resistance in C57Bl/6J mice. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24:639,
4. Gaíva MHG, Couto RC, Oyama LM. Polyunsaturated fatty acid-rich diets: effect on adipose tissue metabolism in rats. *Br J Nutr* 2001; 86:371.
5. Coatmellec-Taglioni G, Dausse JP, Ribie`Re C, Giudicelli Y. Hypertension in cafeteria-fed rats: alterations in renal  $\alpha$ 2-adrenoceptor subtypes. *Am J Hypertens* 2000; 13:529–34.
6. Hill JO, Fried SK, Digirolamo M. Effects of a high-fat diet on energy intake and expenditure in rats. *Life Sci* 1983; 33:141– 9.
7. Conway B, René A. Obesity as a disease: no lightweight matter. *Obes Ver* 2004; 5(3): 145-51.
8. Khan LK, Bowman BA. Obesity: a major global public health problem. *Annu Rev Nutr* 1999; 19: 13–17.
9. Pi-Sunyer FX, Laferrere B, Aronne LJ, Bray GA. Obesity-A modern-day epidemic. *J Clin Endocrin* 1999; 84: 3-5.
10. Lawrence CM, Dennis LK. Introdução às doenças infecciosas: interações hospedeiro-patógeno. In: Harrison medicina interna/editores. Dennis L. Kasper et al. 16. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil Ltda., 2006.
11. Mandell GL; Douglas RG; Bennett JE; Dolin R. Principles and practice of infectious diseases. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2242, 2005.
12. Paste, BJ. Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J. Bacteriol* 2001; S. l., v. 183, p. 3770-3783.

13. Burton GRW, Engelkirk PG. Microbiologia: para as ciências da saúde. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2005.
14. Lindhe J. Microbiologia da doença periodontal associada à placa. In: Trat Perodontol Clín. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, c 1992. cap.4, p.88-106.
15. Gutierrez-Perez, JL. Infecciones orofaciales de origem odontogênico. Méd. Oral 2004; S.1.,v.9, p.280-287.
16. Porto SMMS, Viana MV, Ferreira da Silva KM, Diniz MFA, Castro CMMB. Desnutrição neonatal e microbiota normal da cavidade oral em ratos. Rev. Nutr 2007; 20(6)625-632.
17. Harkness, JE. Biologia e manejo. In Biologia clínica de coelhos e roedores. Roca 1993; cap. 2, p.9-55.
18. Estadella D, Oyama LM, Damaso AR, Ribeiro EB, Do Nascimento CMO. Effect of Palatable Hyperlipidic Diet on Lipid Metabolism of Sedentary and Exercised Rats. Basic nutri invest 2004; 20: 218 –24.
19. Duarte ACGO, Fonseca DF, Manzoni MSJ, Soave CF, Sene-Fiorese M, Damaso AR, Cheik NC. Dieta hiperlipídica e capacidade secretória de insulina em ratos. Rev Nutr 2006; 19(3): 341-8.
20. Damaso A, Eguchi R, Cheik NC, Oyama LM, Do Nascimento CMO, De Mello MT, Tufik S. Efeitos do Exercício Crônico Sobre a Concentração Circulante da Leptina e Grelina em Ratos com Obesidade Induzida por Dieta. Rev Bras Med Esporte 2008; 14(3).
21. World Health Organization (WHO). Overweight and obesity - a new nutrition emergency? Introduction, SCN News 2005; Number 29: 3-4, Geneva.
22. Totti, MAG. Recuperação de *Candida Albicans*, *C. Tropicalis*, *C. Guilliermondii* e *C. Krusei* na cavidade bucal de ratos normais e sialoadenectomizados. Rev Odonto UNESP 1996; v. 25, n. 1, p. 119-124,
23. Koller MM. Desipramine changes salivary gland function, oral microbiota, and oral health in rats. Europ Jour of Pharmacol 2000; S. 1., v. 408, p. 91-98.
24. Darby I, Curtis M. Microbiology of periodontal disease in children and young adults. Periodontology 2000; S. 1., v. 26, p. 33-53, 2001.
25. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. Periodontology 2000, S. 1., v. 38, p. 135-187.
26. Swartz MN, Gibbons, R.; SOCRANSKY, S. Bacterias endógenas. Microbiología

- oral. In: DAVIS, B. D. et al. (Org.). Tratado de Microbiología. 4. ed. Barcelona: Masson 1996; cap. 42, p. 697-705.
27. Marcotte H, Lavoie MC. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 1998; S. 1., v. 62, n. 1, p. 71-109.
28. Tortora GJ, Funke BR, Case CL. Princípios de doença e epidemiologia. In: *Microbiologia*. 6. ed. Porto Alegre 2000: Artes Médicas Sul., cap. 14, p. 394-420.
29. Rodrigues AM, Newman MG. Microbiologia e imunologia periodontal. In: Cardoso, R. J. A.; Gonçalves, E. A. N. (Org.). *Periodontia/Cirurgia/Cirurgia para implantes*. São Paulo: Artes Médicas 2002, cap. 2, p. 21-50.
30. Yao ES, Lamont RJ, Leu SP. Interbacterial binding among strains of pathogenic and commensal oral bacterial species. *Oral Microbiology and Immunology* 1996; S. 1., p. 11-35.
31. Chow AW. Infections of the oral cavity, neck, and head. In: mandell, g. L.; bennett, j. E.; dolin, r. (org.). *Principles and Practice of Infectious diseases*. 5. ed. Churchill Livingstone: Philadelphia 2000; p. 689-701.

## **EFEITO DA OBESIDADE SOBRE PERFIL BIOQUÍMICO DA ENDOTOXEMIA**

Karla Melo Ferreira da Silva<sup>1</sup>,  
Solange Maria Magalhães da Silva Porto<sup>2</sup>,  
Rosangela Rosendo da Silva<sup>3</sup>,  
Tatianne Luiza Ribeiro de Siqueira<sup>4</sup>.  
Bruno Sampaio<sup>5</sup>,  
Célia Maria Machado Barbosa de Castro<sup>6</sup>.

<sup>1</sup> Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco<sup>a</sup>.

<sup>2/3</sup> Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco.

<sup>4</sup> Biomédica.

<sup>5</sup> Aluno de Iniciação Científica, Graduando do curso de Biomedicina, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco.

<sup>6</sup> Professora e Vice-coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco.

<sup>a</sup>Av. Prof. Moraes Rego s/n - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife – PE.

Autor para tramitação:

Karla Melo Ferreira da Silva

Endereço: Estrada das Ubaias, 245, Casa Forte – CEP: 52061-080 – Recife- PE.

Telefone: (81) 34410080 / (81) 88095817

E-mail: [karlamfsilva@hotmail.com](mailto:karlamfsilva@hotmail.com)

## **RESUMO**

### **Objetivo**

Analisar o consumo continuado de uma dieta hipercalórica e alterações sorológicas em perfil bioquímico e em estados de endotoxemia.

### **Material e métodos**

40 ratos machos da linhagem *Wistar* foram utilizados. Grupo controle composto por 20 animais mantidos com dieta padrão do biotério e grupo obeso formado por 20 animais alimentados com dieta hipercalórica e hiperlipídica. Após 18 semanas, metade dos animais de cada grupo foi submetida à endotoxemia, constituindo então quatro grupos: controle endotoxêmico e não endotoxêmico, dieta hiperlipídica endotoxêmico e não endotoxêmico. Dosaram-se três parâmetros bioquímicos: glicose, colesterol total e triglicerídeos. Além da aferição do peso corporal e da gordura abdominal.

### **Resultados**

Não houve aumento de peso corporal no grupo de dieta hipercalórica, porém, a gordura abdominal foi três vezes maior no grupo obeso. Nos grupos não endotoxêmicos a dieta hipercalórica aumentou a taxa de glicose em 31% e a de triglicerídeos em 61%, enquanto o colesterol não apresentou modificação. Na endotoxemia, a dieta rica em lipídios aumentou, agora, o colesterol total em 43% e os triglicerídeos em 59%, nesse caso, os valores da glicose não foram modificados.

### **Conclusão**

Nem sempre o alto consumo de dieta hipercalórica se acompanha de aumento considerável no peso corporal, porém, na maioria dos casos, há acúmulo de gordura especialmente, na região abdominal. Os riscos causados pelo consumo excessivo de gordura são vários e utilização desta requerer cuidados especiais. Há grande interesse em se conhecer dosagens bioquímicas, nos casos de infecção grave em indivíduos com excesso de gordura corporal, uma vez que há alteração da glicose e dos lipídios sanguíneos.

**Termos de indexação:** Gorduras na dieta; Obesidade, Fenômenos metabólicos; Distribuição da gordura corporal; Bioquímica.

## **ABSTRACT**

### **Purpose**

Analyze the continued consumption of a high-fat diet and changes in serologic biochemical states of endotoxemia.

### **Material and methods**

40 male Wistar rats were used. The Control Group consisted of 20 animals fed standard diet and the Obese Group consisting of 20 animals fed high-calorie diet. After 18 weeks, half the animals in each group were subjected to endotoxemia then constituting four groups: control endotoxemic and not endotoxemic, high-fat diet endotoxemic and not endotoxemic. Dosed to three biochemical parameters: glucose, total cholesterol and triglycerides. Besides the measurement of body weight and abdominal fat.

### **Results**

There was no increase in body weight in the group of high-fat diet, however, abdominal fat was three times higher in the obese group. In the not endotoxemic groups, the fat diet increased the rate of glucose in 31% and triglycerides by 61%, while cholesterol showed no change. In endotoxemia, a diet rich in lipids increased, now, total cholesterol by 43% and triglycerides by 59%, in this case, the glucose values were not modified.

### **Conclusion**

Not always the high consumption of high calorie diet is accompanied by a significant increase in body weight, however, in most cases, there is accumulation of fat especially in the abdominal region. The risks caused by excessive consumption of fat and many are using this require special care. There is great interest in knowing biochemical, in cases of severe infection in individuals with excess body fat, since no modification of the glucose and blood lipids.

**Index terms:** Dietary fats, obesity, metabolic phenomena; distribution of body fat; Biochemistry.

## INTRODUÇÃO

Uma vez considerado um problema em países de rendimento elevado, sobrepeso e obesidade, estão agora aumentando drasticamente em países de baixa e média renda. Estes países estão agora a enfrentar uma "dupla carga" de doença: enquanto eles continuam a lidar com os problemas das doenças infecciosas e desnutrição ao mesmo tempo, estão experimentando um rápido surto de fatores de risco para doenças crônicas tais como, a obesidade e o sobrepeso. (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 FILHO; RISSIN, 2003; BERMUDEZ; TUCKER, 2003).

A obesidade pode ser induzida em animais por alterações neuroendócrinas, dietéticas ou genéticas (DIEMEN et al., 2006). Ainda de acordo com estes autores, a administração de dieta hipercalórica é o modelo mais simples para indução da obesidade e um dos que mais se assemelha à realidade da obesidade em seres humanos.

A organização mundial da saúde (WHO, 2005) define sobrepeso e obesidade como anormal ou excessiva acumulação de gordura que apresenta um risco para a saúde. A morbidade associada inclui, por exemplo, diabetes tipo II, dislipidemias, hipertensão, doença coronariana e cerebrovascular (MUÑOZ et al., 2004).

O ganho ponderal é preditor para desenvolver síndrome metabólica (SM). A distribuição da gordura corporal é relevante, especificamente a gordura visceral (GV). Diversos estudos revelam a estreita relação da adiposidade abdominal com a tolerância à glicose, hiperinsulinemia, hipertrigliceridemia e hipertensão arterial. Mais que uma simples associação, recentemente acredita-se que a GV desempenha um papel central na fisiopatologia da SM. Assim, a quantificação da GV se torna importante para identificar indivíduos com maior risco para o desenvolvimento da SM (FILHO et al., 2006).

As endotoxinas ou lipopolissacarídeos (LPS) são produzidos por bacilos gram negativos, desencadeando reação inflamatória sistêmica. O LPS se localiza na parte externa da membrana bacteriana e é liberado a partir da replicação e/ou morte bacteriana (DE CASTRO et al., 1997). O efeito biológico da endotoxina é gerar e amplificar resposta inflamatória. A administração parenteral 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).

Assim, a aplicação do LPS funciona como um adequado modelo para o estudo das alterações fisiológicas durante infecções bacterianas, já que reproduzem muitos dos sintomas clínicos observados em pacientes com septicemia por bactérias gram negativas (LUCHI; MORRISON, 2000). Tais reações apresentam-se mais exacerbadas após 24 horas da aplicação do LPS (DE CASTRO et al., 1997).

Assim, o presente estudo pretende analisar o padrão de dados bioquímicos em ratos alimentados com dieta hipercalórica e qual o comportamento destes parâmetros na presença de septicemia.

## MÉTODOS

### Delineamento experimental

Foram utilizados 40 ratos machos, albinos, da linhagem Wistar, provenientes da colônia de criação do Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos no biotério em temperatura de  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , sob ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo ração e água *ad libitum*, segundo recomendação ética do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética do Centro de ciências Biológicas da universidade Federal de Pernambuco.

### Grupos

Os animais foram divididos inicialmente em dois grupos segundo o regime dietético empregado. O grupo controle (DP) foi constituído de 20 animais que receberam dieta padrão do biotério (Labina-Purina do Brasil S/A). O grupo obeso (DH) foi formado por 20 animais que receberam dieta hipercalórica.

Aos 147 dias de idade, após terem recebido as respectivas dietas por 18 semanas, os dois grupos iniciais foram subdivididos em endotoxêmicos e não endotoxêmicos.

Para obtenção dos grupos endotoxêmicos, os animais receberam injeção intraperitoneal de LPS, lipopolissacarídeo, (sorotipo *Escherichia coli*; 055: B5, Sigma) na dose de 1mg/Kg de peso corporal, preparado com NaCl a 0,9%. Os grupos que não sofreram endotoxemia, apenas receberam, pela mesma via, NaCl a 9% em igual proporção, como uma forma de igualar o estresse sofrido pela injeção. Vinte e quatro horas após a administração do LPS ou do NaCl, foram coletadas amostras de sangue de cada animal para as dosagens bioquímicas (De Castro et al., 1997).

### **Dieta Hipercalórica**

A dieta hipercalórica e hiperlipídica empregada consiste em uma mistura hipercalórica (normoprotéica e hiperlipídica). É composta por ração comercial LABINA<sup>®</sup>, amendoim torrado, chocolate ao leite e biscoito maisena, na proporção 3:2:2:1. Destes constituintes: a ração, o amendoim e o biscoito são moídos e o chocolate é derretido em banho Maria. Após essa primeira fase todos os ingredientes são misturados até formarem uma massa, que posteriormente é aquecida em estufa e oferecida em forma de péletes.

A densidade calórica para a dieta hiperlipídica palatável foi de 4,8 kcal/100g (24,5% de Lipídeos) enquanto que, a dieta padrão, apresentou 2,7 kcal/100g (4% de Lipídeos).

### **Dosagens bioquímicas**

O sangue foi coletado da extremidade da cauda do animal e a partir deste, foram dosados três parâmetros bioquímicos: glicose, colesterol total e triglicerídeos. Foram utilizados tubos com anticoagulante fluoreto de sódio para dosagem de glicose e tubos secos para quantificação de colesterol e triglicerídeos. Após ser coletado, o sangue foi centrifugado para obtenção do soro/plasma necessário para as dosagens. As análises foram realizadas por método enzimático colorimétrico.

### **Massa corporal**

O peso corporal dos animais foi aferido diariamente do primeiro dia de vida até o final do período de aleitamento (21 dias). Entretanto, após o desmame, a pesagem foi realizada em dias alternados até o final da administração da dieta.

### **Gordura visceral**

A coleta da gordura visceral foi realizada após a coleta do sangue, com o animal anestesiado por mistura dos anestésicos cloralose e uretana, em concentrações respectivas de 0,5 e 12,5%, via intraperitoneal, na proporção de 1mL/100g de peso corporal. Realizou-se uma incisão na região abdominal. Em seguida, todos os órgãos deste local foram retirados e a gordura separada para pesagem posterior.

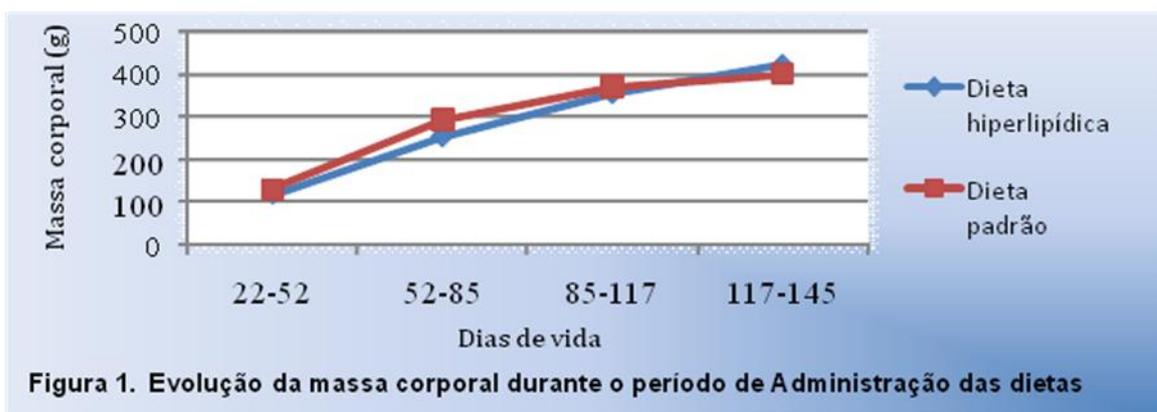
### **Análise estatística**

Na comparação entre os grupos, 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. Utilizou-se para isto, o Software SigmaStat 2.0. A significância foi definida para  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### Massa corporal

Após as 18 semanas de administração das dietas os animais obesos (DH) não apresentaram diferença na massa corporal em relação aos controles (DP). A massa corporal média nos 2 grupos foi considerada semelhante, DP igual a  $273.6 \pm 8.9$  g e DH igual a  $268.7 \pm 5.5$  g.

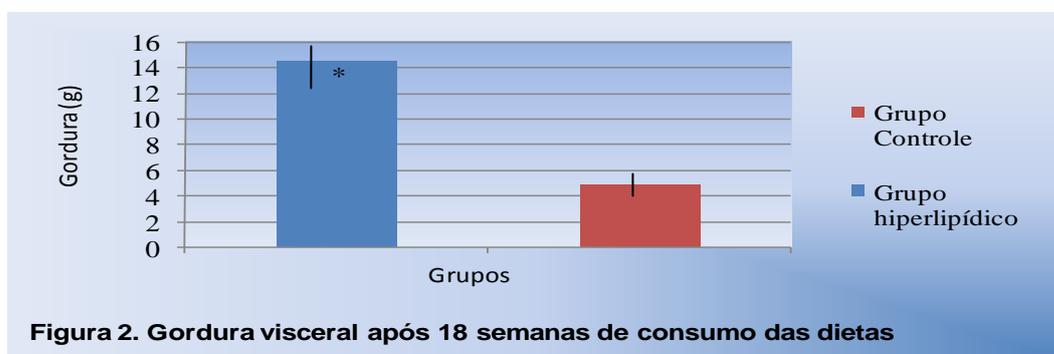


Nota: Resultados mostrados em média.

Ausência de \* significa falta de diferença estatisticamente significante,  $p \leq 0,05$ .

### Gordura Visceral

Apesar de não causar aumento na massa corporal, o consumo da dieta hipercalórica aumentou a quantidade de gordura visceral no grupo DH ( $14.5 \pm 0.8$  g). Visto que o grupo DP apresentou um terço da gordura visceral do grupo obeso ( $4.8 \pm 0.3$  g).



Nota: Resultados mostrados em média  $\pm$  erro padrão.

Presença de \* significa diferença estatisticamente significante,  $p \leq 0,05$ .

## Bioquímica

### Glicose (mg/100mL):

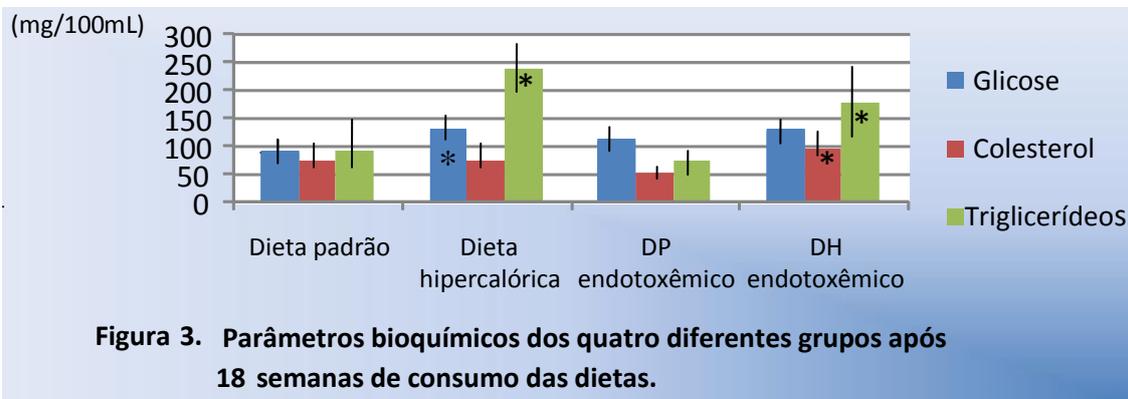
Observou-se um aumento nos valores da glicose sanguínea no grupo submetido à dieta hiperlipídica (DP= 89.0 ± 11.3, DH= 129.1 ± 10.7). Na comparação entre os 2 grupos: endotoxêmicos e não endotoxêmicos (DPE e DHE) não houve diferença entre os valores médios da taxa de glicose (DPE=110.5 ± 20.0, DHE= 122.8 ± 10,1).

### Colesterol (mg/100mL)

Na comparação entre os grupos que não sofreram endotoxemia os valores de colesterol não diferiram (DP= 75.5 ± 12.2, DH= 74.7 ± 10.1). As taxas de colesterol apresentaram diferença significativa apenas na comparação entre os dois grupos submetidos à endotoxemia (DPE e DHE), com valores maiores no grupo que recebeu dieta hiperlipídica (DPE=55.1 ± 4.7, DHE= 96.1 ± 11.7).

### Triglicerídeos (mg/100mL)

Os valores de triglicerídeos encontraram-se aumentados nos grupos que receberam dieta rica em calorias, tanto nos endotoxêmicos (DPE=74.0 ± 12.7, DHE= 179.3 ± 17) quanto nos não endotoxêmicos (DP= 92.4 ± 16.6, DH= 238.3 ± 31.9).



Nota: Resultados mostrados em média ± erro padrão.

Presença de \* significa diferença estatisticamente significativa,  $p \leq 0,05$ .

## DISCUSSÃO

Apesar dos vários estudos realizados com dieta hiperlipídica, os resultados de massa corporal e consumo deste tipo de dieta, ainda são conflitantes na literatura. No presente estudo, a massa corporal do grupo que utilizou dieta hiperlipídica não modificou mesmo após 18 semanas de sua utilização. Este resultado está de acordo com estudos de Franco (2009) e Estadella et al. (2004 e 2008). Porém, outros estudos apresentaram resultados diferentes com aumento da massa corporal, ou até mesmo,

diminuição desta no grupo alimentado com dieta rica em lipídios (PAULI, 2009; DUARTE, 2006; BERNARDES, 2004; SANTOS, 2007). Tais discordâncias de resultados podem ser decorrentes dos diferentes períodos na administração da dieta e pelo tipo de ingrediente utilizado na sua elaboração.

Embora a massa corporal tenha sido mantida, neste estudo houve aumento na gordura visceral. Aumento da adiposidade também foi encontrado por vários autores que utilizaram dieta hiperlipídica (GONÇALVES et al., 1990; BELLAVÉR et al., 2001; GAÍVA et al., 2001; ESTADELLA et al., 2004 e 2005; DUARTE et al., 2006). Tal achado pode ser devido ao equilíbrio entre menor consumo alimentar no grupo de dieta rica em calorias e maior teor de lipídios desta alimentação, o que pode manter o peso e levar ao acúmulo de gordura.

O padrão das análises bioquímicas mostrou-se diferente nos animais submetidos à endotoxemia. Cada parâmetro estudado mostrou comportamento particular após uma dieta hiperlipídica, com ou sem, a presença de endotoxemia. Há uma diversidade de estudos relacionando uma dieta rica em calorias com análises bioquímicas, no entanto, a correlação com casos de infecção grave ainda é escasso na literatura.

Após 18 semanas de consumo de dieta hipercalórica imposta no presente estudo, os níveis de glicose aumentaram consideravelmente. Este resultado está de acordo com os de Estadella et al. (2004) e Bernardes et al. (2004), após administrarem dieta hipercalórica por apenas 8 semanas. A hiperglicemia é um dos fatores mais importantes para o aparecimento e progressão das complicações vasculares do Diabetes Mellitus (SILVA, 2008) que pode ser consequência da resistência à insulina. Segundo Gross et al. (2002), a hiperglicemia causa danos, disfunções e até falência de vários órgãos, envolvendo severas alterações na micro e na macrovasculatura. Em estudo de Pauli (2009), após a alimentação com a DH, foi evidenciado significativo prejuízo na ação da insulina, indicando insulino-resistência quando comparado com o grupo controle.

Quando o grupo hipercalórico sofre um processo inflamatório intenso pela presença da endotoxina, as taxas de glicose se igualam aos valores do grupo controle. Quanto a isto, estudos prévios já destacaram o papel de dietas hiperlipídicas reduzindo estoques de glicogênio frente à exposição prolongada (AOKI; SEELAENDER, 1999; KIM et al., 2000; SCHRAUWEN et al., 1998; BERNARDES, 2004). É provável que ao aumentar o metabolismo, como parte da resposta inflamatória à sepse, o organismo tenha dificuldade em repor glicose para o sangue, pela pouca reserva de glicogênio.

A oxidação lipídica pode estar relacionada com a taxa de glicólise através do ciclo glicose - ácido graxo. Neste caso, a utilização de glicose é diminuída para que haja reposição do conteúdo de glicogênio (AOKI; SEELAENDER, 1999). A concentração de triglicerídeos perfaz um total de 65% de todo tecido adiposo, enquanto o colesterol corresponde a concentrações bem menores nas reservas lipídicas. No caso de consumo de lipídeos, a utilização de triglicerídeos ocorre antes que o colesterol, o que pode resultar em maior absorção deste e sua maior liberação pelo fígado. Este fato pode explicar o aumento das taxas de triglicerídeos acompanhado da manutenção dos níveis de colesterol após as 18 semanas de consumo da dieta rica em lipídios.

Após a sepse, as taxas de colesterol se elevaram e o teor de triglicerídeos no sangue aumentou ainda mais. Tal fato pode ser devido à necessidade de nutrientes, tendo em vista à baixa de glicose, somado ao aumento do metabolismo causado pela resposta inflamatória. Os adipócitos são metabolicamente muito ativos, respondendo rapidamente ao estímulo hormonal em uma ação metabólica conjunta com o fígado, músculos esqueléticos e coração. Quando há necessidade de combustível, os triacilgliceróis armazenados no tecido adiposo são hidrolisados pelas lípases no interior dos adipócitos para a liberação de ácidos graxos livres, que podem então ser liberados, via corrente sanguínea, para músculos esqueléticos e coração. Parte da acetil-CoA proveniente dos ácidos graxos é usada para a biossíntese do colesterol, o que vai gerar aumento deste na corrente sanguínea (LEHNINGER, 2002). Após a utilização das reservas de triglicerídeos, através de possível mecanismo de *feed-back* negativo, o fígado pode liberar este lipídeo para circulação, sendo assim, um fator condizente com seu aumento.

A impossibilidade de utilização da glicose, seja por resistência à insulina ou por baixo teor de glicogênio, pode prejudicar a resposta imune ao agente infeccioso e tornar-se um fator favorável ao agravamento da infecção e conseqüente instalação de choque séptico.

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

Geraldo e. Alfenas (2008) sugerem que o consumo de dieta saudável seja capaz de reduzir os níveis de marcadores inflamatórios, favorecendo a produção de citocinas

antiinflamatórias, contribuindo para a prevenção ou o controle da resistência insulínica, das dislipidemias e de outras condições metabólicas relacionadas à manifestação de doenças crônicas não-transmissíveis. Tal dieta deve apresentar teor energético capaz de manter o peso corporal adequado, sendo composta por teor moderado de gordura, baixos teores de açúcares simples, de gorduras trans e saturada, sendo rica em frutas, hortaliças e alimentos integrais.

## **CONCLUSÃO**

É importante atentar ao fato de que nem sempre a obesidade é acompanhada de aumento considerável de peso corporal, porém, em sua maioria, há acúmulo de gordura em alguma região, especialmente a abdominal. Ao contrário do que se esperava a obesidade imposta por dieta hipercalórica hiperlipídica não ocasionou aumento nas taxas de colesterol total, o que pode indicar um maior tempo requerido para o aumento deste na circulação. É relevante para o analista, o nutricionista, assim como o médico, conhecerem as alterações nas dosagens bioquímicas nos casos de infecção grave em indivíduos obesos, como diminuição da glicose e aumento dos lipídeos.

Levando-se em consideração que a síndrome metabólica é definida por um conjunto de fatores de risco cardiovasculares relacionados à obesidade visceral e resistência a insulina, que levam a um aumento da mortalidade geral, especialmente cardiovascular (JUNQUEIRA 2008), fica ainda mais evidenciada a importância do consumo consciente de alimentos gordurosos.

Sugere-se que mais estudos em relação aos efeitos da obesidade induzida por dieta hipercalórica e hiperlipídica na resposta a processos infecciosos sejam realizados. Sobre tudo com mensurações de outros parâmetros bioquímicos envolvidos, como LDL, HDL, lipólise, glicogenólise e neoglicogênese.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem à Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco e ao Laboratório de Imunopatologia Keiso Asami pela oportunidade de realização do presente estudo.

## **REFERÊNCIAS**

AOKI, M.S., SEELAENDER, M.C.L. Suplementação lipídica para atividades de “endurance”. **Ver. Paul. de Ed. Fís.**, v. 13, n. 2, p. 230-238, 1999.

- BATISTA FILHO, M., RISSIN, A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. **Cad. Saúde Pública**, v. 19, p. 181-191, 2003.
- BELLAVER, L., VITAL, M.A., ARRUDA, A.M., 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. Brás. End. e Met.**, v. 45, n. 2, p. 167-712, 2001.
- BERMUDEZ, O.I., TUCKER, K.L. Trends in dietary patterns of Latin American populations. **Cad. Saúde Pública**, v.19, p. 87-99, 2003.
- BERNARDES, D., MANZONI, M.S.J., DE SOUZA, C.P., TENÓRIO, N., DÂMASO, A.R. Efeitos da dieta hiperlipídica e do treinamento de natação sobre o metabolismo de recuperação ao exercício em ratos. **Rev. Bras. Educ. Fís. Esp.**, v. 18, n. 2, p. 191-200, 2004.
- 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.
- DE CASTRO, C.M.M.B., DE CASTRO, R.M., ANDRADE, A.D., BRANDT, C.T. LPS bacteriano: um mediador de inflamação. **Fac, Méd. Univ. Fed. Pernamb.**, v. 42, n. 2, p. 78-83, 1997.
- DIEMEN, V.V., TRINDADE, E.N., TRINDADE, M.R.M. Experimental model to induce obesity in rats. **Acta Cir. Brás.**, v. 21, n. 6, p. 425-429, 2006.
- DINARELLO CA. Biological basis for interleukin-1 in disease. **Blood**, 1996; 87: 2065-147.
- 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. **Ver. Nutr.**, v. 19, n. 3, p. 341-348, 2006.
- ESTADELLA, D., OYAMA, L.M., DAMASO, A.R., RIBEIRO, E.B., DO NASCIMENTO, C.M.O. Effect of Palatable Hyperlipidic Diet on Lipid Metabolism of Sedentary and Exercised Rats. **Basic Nutri. Invest.**, v. 20, p. 218 –224, 2004.
- ESTADELLA, D. Dieta palatável hiperlipídica modifica o metabolismo cerebral e do tecido adiposo de ratos, dependendo da idade e do tempo de tratamento. São Paulo; s.n; 2005. [112] p. Apresentada a Universidade Federal de São Paulo. **Escola Paulista de Medicina**. Curso de Nutrição para obtenção do grau de Doutor
- FILHO, G. B. **Bogliolo Patologia**. 6º Ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1328 p.

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 operation. **Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v. 40, p. 126-129, 1992.

FRANCO, L.D.P., CAMPOS, J.A.D.B., DEMONTE, A. Teor lipídico da dieta, lipídios séricos e peso corporal em ratos exercitados. **Rev. Nutr.**, Campinas, v. 22, n. 3, p. 359-366, 2009.

GAÍVA, M.H.G., COUTO, R.C., OYAMA, L.M., COUTO, G.E.C., SILVEIRA, V.L.F., RIBEIRO, E.B., NASCIMENTO, C.M.O. Polyunsaturated fatty acids rich diets: effect on adipose tissue metabolism in rats. **British Jour. of Nut.**, v. 86, p. 371-377, 2001.

GERALDO, J.M., ALFENAS, R.C.G. Papel da Dieta na Prevenção e no Controle da Inflamação Crônica – Evidências Atuais. **Arq. Brás. Endocrinol. Metab.**, v. 8, p. 52-56, 2008.

GONÇALVES, E.L., WAITZBERG, D.L., BEVILACQUA, R.G., BEVILACQUA, L.R. Composição corpórea em diferentes condições nutricionais: estudo experimental. **Rev. Paul. Med.**, v. 108, n. 3, p. 125-133, 1990.

GOTTSCHLICH, M.M., MAYES, T., KHOURY, J.C., WARDEN, G.D. Significance of obesity on nutritional, immunologic, hormonal and clinical outcome parameters in burns. **J. Am. Diet. Assoc.**, v. 93, p. 1261-1268, 1993.

GROOSS, J.L., SILVEIRO, S.P., CAMARGO, L.L. Diabetes mellito: diagnóstico, classificação do controle glicêmico. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.** v. 46, n. 1, p. 16-26, 2002.

JUNQUEIRA, A.S.M., FILHO, L.J.M.R., JUNQUEIRA, C.L.C. Avaliação do grau de inflamação Vascular em Pacientes com Síndrome metabólica. **Arq. Brás. Cardiol.**, v. 93, n. 3, p. 360-366, 2009.

LEHNINGER, A.L., NELSON, D.L., COX, M.M. **Lehninger Princípios de Bioquímica**. 3a edição, Ed. Sarvier, São Paulo, S. P., 2002

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.

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

MOULTON, M.J., CRESWELL, L.L., MACKEY, M.E., COX, J.L., ROSENBLOOM, M.R. Obesity is not a risk factor for significant adverse outcomes after cardiac surgery. **Circulation**, v. 94, p. 87-92, 1994.

PAULI, J.R., ROPELLE, E.R., CINTRA, D.E., SOUZA, C.T. Efeitos do Exercício Físico na Expressão e Atividade da AMPK $\alpha$  em Ratos Obesos Induzidos por Dieta Rica em Gordura. **Rev. Bras. Med. Esporte**, v. 15, n. 2, p. 98-103, 2009.

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

SANTOS, R.S., VIANNA, L.M. Dieta hipercalórica agrava a hipertensão arterial em ratos espontaneamente hipertensos. **Nutrire Rev. Soc. Bras. Aliment. Nutr**, v. 32, n. 1, p. 1-9, 2007.

SILVA, N.R., COSTA, C.E.M. A hiperglicemia e os mecanismos envolvidos nas disfunções vasculares do Diabetes Mellitus. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar**, v. 12, n. 3, p. 265-70, 2008.

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

World Health Organization (WHO). Overweight and obesity - a new nutrition emergency? **SCN News**, Geneva, n. 29, p. 3-4, 2005.

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar de os animais que se receberam dieta hipercalórica e hiperlipídica consumirem menos alimento, ainda assim, ingeriram mais calorias devido ao aporte calórico da dieta. É importante atentar de que nem sempre um peso corporal compatível, se traduz em quantidades aceitáveis de gordura corporal.

A dieta hipercalórica utilizada foi útil em promover obesidade visceral nos ratos, uma vez que a gordura desta região foi estatisticamente superior nos ratos alimentados com a dieta hipercalórica. Somando-se a este resultado, esta dieta também aumentou os níveis de glicose e triglicerídeos nestes animais.

Pode-se concluir que a endotoxemia promovida pelo LPS produz uma resposta inflamatória em ratos saudáveis, representada por recrutamento de neutrófilos para o pulmão e efetivo aumento da atividade fagocitária.

Neste particular, o efeito negativo da obesidade sobre o sistema imune fica claro quando os animais obesos são incapazes de obter o mesmo aumento no recrutamento de neutrófilos para o local da infecção, além de não conseguirem estimular um reforço na fagocitose por parte dos macrófagos alveolares.

Outro componente do sistema imune alterado pela obesidade é a microbiota normal do organismo. Esta apresenta alterações tanto no padrão, quanto no número de bactérias.

A modificação no perfil das células hematológicas é outro componente adicional no que diz respeito às alterações provocadas pelo excesso de gordura. A obesidade causa não só mudança na distribuição das células pertencentes à série branca, como nos valores dos componentes da série vermelha.

As alterações nutricionais causadas pelo consumo excessivo de calorias e lipídios, com conseqüente obesidade, são conhecidas como estímulo para diversos tipos de alterações malélicas para o organismo. Dentre estas, podemos destacar o comportamento dos componentes da resposta imunológica, do perfil hematológico e de análises bioquímicas.

É de grande relevância o conhecimento destas alterações por parte dos profissionais da área de saúde, em especial os analistas clínicos, nutricionistas e médicos. A difusão destas informações para tais profissionais pode levar ao acompanhamento singular e ao melhor entendimento das modificações orgânicas em pacientes com excesso de gordura.

Diante o escasso número de trabalhos que pesquisam os efeitos da obesidade sobre os diversos sistemas do organismo, em presença de processo inflamatório sistêmico, fica evidenciada a necessidade de novos estudos com este tema, toma-se então como perspectivas os seguintes estudos: trabalhos com ratas fêmeas; dieta padrão que siga a AIN (American Institute of Nutrition); outras análises bioquímicas como glicogênese, gliconeogênese, lipogênese e lipólise; análises hormonais; estudos das citocinas; gordura da carcaça; administração de diferentes períodos de administração da mesma dieta; análises do sistema de coagulação, dentre outros.

## 6 REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K., JANEWAY, C.A. J.R. Immunology: improving on nature in the twenty-first century. **Cell**, v. 100, p. 129–138, 2000.

ABBAS, A.K., LICHTMAN, A.H. **Imunologia celular e molecular**. 6° ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 580 p.

AHIMA, S.R., FLIER, J.S. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. **Trends. Endocrinol. Metab.**, v. 8, p. 327-332, 2000.

ALVES, M.N.R. Os efeitos da obesidade na resposta imune. **Ver. Bras. Nutr. Clin.**, v. 21, n. 4, p. 316-319, 2006.

AXEN, K.V., DIKEAKOS, A., SCALAFANI, A. High dietary fat promotes syndrome X in nonobese rats. **J. Nutr.**, v. 133, p. 2244-2249, 2003.

BATISTA FILHO, M., RISSIN, A. A transição nutricional no Brasil: tendências regionais e temporais. **Cad. Saúde Pública**, v.19, p. 181-191, 2003.

BERMUDEZ, O.I., TUCKER, K.L. Trends in dietary patterns of Latin American populations. **Cad. Saúde Pública**, v. 19, p. 87-99, 2003.

BERNARDES, D., MANZONI, M.S.J., SOUZA, C.P., TENÓRIO, N., DÂMASO, A.R. Efeitos da dieta hiperlipídica e do treinamento de natação sobre o metabolismo de recuperação ao exercício em ratos. **Ver. bras. Educ. Fís. Esp.**, v.18, n.2, p.191-200, 2004.

BOVILL, E.G., BILD, D.E., HEISS, G., KULLER, L.H., LEE, M.H., ROCK, R., EALHP, W. White blood cell counts in person 65 years or more from the Cardiovascular Health study: correlations with baseline clinical and demographic characteristics. **Am. J. Epidemiol.**, v. 143, p. 1107-1115, 1996.

BRUUN, J.M., PEDERSEN, S.B., KRISTENSEN, K., RICHELSEN, B. Opposite Regulation of Interleukin-8 and Tumor Necrosis Factor-alpha by Weight Loss. **Obes. Res.**, v. 10, n. 6, p. 499-506, 2002.

BRUUN, J.M., LIHN, A.S., VERDICH, C., PEDERSEN, S.B., TOUBRO, S., ASTRUP, A. Regulation of adiponectin by adipose tissue-derived cytokines: in vivo and in vitro investigations in humans. **Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.**, v. 285, n. 3, p. 527-533, 2003.

BULLÓ, M., GARCÍA-LORDA, P., MEGIAS, I., SALAS-SALVADÓ, J. Systemic inflammation, Adipose tissue, Tumor Necrosis Factor, and Leptin Expression. **Obes. Res.**, v. 11, n. 4, p. 525-531, 2003.

BURTON, G.R.W., ENGELKIRK, P.G. **Microbiologia: para as ciências da saúde.** Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2005.

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. Nutri.**, v. 66, p. 460-463, 1997.

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

CORBALAN, M.S., MARTI, A., FORGA, L., MARTINEZ-GONZALEZ, M.A., MARTINEZ, J.A. Beta(2)-Adrenergic receptor mutation and abdominal obesity risk: effect 2002modification by gender and HDL-cholesterol. **Eur. J. Nutr.**, v. 41, p. 114-118, 2002.

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

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.

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

DIEMEN, V.V., TRINDADE, E.N., TRINDADE, M.R.M. Experimental model to induce obesity in rats. **Acta. Cir. Brás.**, v. 21, n.6, p. 425-29, 2006.

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

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. **Ver. Nutr.**, v.19, n. 3, p. 341-348, 2006.

EGUCHI, R., CHEIK, N.C., OYAMA, L.M., NASCIMENTO, C.M.O., MELLO, M.T., TUFIK, S., DÂMASO, A. Efeitos do exercício crônico sobre a concentração circulante da leptina e grelina em ratos com obesidade induzida por dieta. **Rev. Bras. Med. Esporte**, v. 14, n. 3, p. 182-187, 2008.

ENGELI, S., FELDPAUSCH, M., GORZELNIAK, K., HARTWIG, F., HEINTZE, U., JANKE, J. Association Between Adiponectin and Mediators of Inflammation in Obese Women. **Diabetes**, v. 52, n. 4, p. 942-947, 2003.

ESTADELLA, D., OYAMA, L.M., DAMASO, A.R., RIBEIRO, E.B., DO NASCIMENTO, C.M.O. Effect of Palatable Hyperlipidic Diet on Lipid Metabolism of Sedentary and Exercised Rats. **Basic Nutri. Invest.**, v. 20, 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. **Endocrinology**, v. 145, p. 2273–2282, 2004.

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 operation. **Thorac. Cardiovasc. Surg.**, v. 40, p. 126-129, 1992.

FILHO, G. B. **Bogliolo Patologia**. 6° Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 1328 p.

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

FISHBECK, K.L., RASMUSSEN, K.M. Effect of repeated cycles on maternal nutritional status, lactational performance and litter growth in ad libitum-fed and chronically food-restricted rats. **Jour of Nutr**, v.117, n.11, p.1967-1975, 1987.

FRANCO, L.D.P., CAMPOS, J.A.D.B., DEMONTE, A. Teor lipídico da dieta, lipídios séricos e peso corporal em ratos exercitados. **Rev. de Nutr.**, v. 22, n. 3, p. 359-366, 2009.

GERALDO, J.M., ALFENAS, R.C.G. Papel da Dieta na Prevenção e no Controle da Inflamação Crônica – Evidências Atuais. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 8, p. 52-56, 2008.

GHIBAUDI, L., COOK, J., FARLEY, C., VAN HEEK, M, HWA, JJ. Fat intake affects adiposity, comorbidity factors and energy metabolism of Sprague-Dawley rats. **Obes Res**, v. 10, p. 956- 963, 2002.

GOTTSCHLICH, M.M., MAYES, T., KHOURY, J.C., WARDEN, G.D. Significance of obesity on nutritional, immunologic, hormonal and clinical outcome parameters in burns. **J. Am. Diet. Assoc.**, v. 93, p. 1261-1268, 1993.

GUTIÉRREZ, P.J.L., INFANTE, C.P., HITA, I.P., TORRES, L.D. Cuándo, cómo y por qué del tratamiento antibiótico en las enfermedades periodontales y perimplantarias. **Av. Periodon. Implantol.**, v. 15, p. 87-98, 2003.

HEWETT, J.A., ROTH, R.M. Hepatic and extrahepatic pathobiology of bacterial lipopolysaccharide. **Pharmacol. Rev.**, v. 45, p. 382-411, 1993.

HILL, J.O., LIN, D., YAKUBU, F., PETERS, J.C. Development of dietary obesity in rats: influence of amount and composition of dietary fat. **Int J Obes Relat Metab Disord**, v. 16, p. 321-333, 1992.

Instituto brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE. **Pesquisa de orçamentos familiares 2002-2003**: Análise da disponibilidade domiciliar de alimentos e do estado nutricional do Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, 2004; 74p.

JANEWAY, C.A., JR., TRAVERS, P., WALPORT, M., CAPRA, J.D. **Immunobiology**: the immune system in health and disease. New York: Elsevier Science Ltd./Garland Publishing, 1999. 180 p.

JAWETZ, E. **Microbiologia medica**. 18. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 519 p.

JORGE, A.O.C., **Microbiologia Bucal**, 2ª Ed. São Paulo: Santos, 1998. 122 p.

JUGE-AUBRY, C.E., MEIER, C.A. Immunomodulatory actions of leptin. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 194, p. 1-7, 2002.

JUNQUEIRA, A.S.M., ROMÊO FILHO, L.J.M., JUNQUEIRA, C.L.C. Avaliação do grau de inflamação Vascular em Pacientes com Síndrome metabólica. **Arq Bras Cardiol**, v. 93, n. 3, p. 360-366, 2009.

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

KERN, P.A., DI GREGORIO, G.B., LU, T., RASSOULI, N., RANGANATHAN, G. Adiponectin Expression From Human Adipose Tissue. **Diabetes**, v. 52, n. 7, p. 1779-1785, 2003.

KERSHAW, E.E., FLIER, E.S. Adipose Tissue as an Endocrine Organ. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 89, n. 6, p. 2548–2556, 2004.

KHAN, L.K., BOWMAN, B.A. Obesity: a major global public health problem. **Annu Rev Nutr**, v. 19, p. 13–17, 1999.

LEMIEUX, I., PASCOT, A., PRUD'HOMME, D., ALMÉRAS, N., BOGATY, P., NADEAU, A. Elevated C-Reactive Protein. Another Component of the Atherothrombotic Profile of Abdominal Obesity. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 21, n. 6, p. 961-967, 2001.

LINDHE, J. **Tratado de peridontia clínica e implantologia oral**. 4<sup>o</sup> Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005; 1048 p.

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.

MANDELL, G.L., DOUGLAS, R.G., BENNETT, J.E., DOLIN, R. **Principles and practice of infectious diseases**. 5 Ed. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2005. 2242 p.

MARQUES-LOPES, I., ANSORENA, D., ASTIASARAN, I., FORGA, L., MARTÍNEZ, J.A. Postprandial de novo lipogenesis and metabolic changes induced by

a high- carbohydrate, low-fat meal in lean and overweight men. **Am J Clin Nutr**, v. 73, p. 253-261, 2001.

MARQUES-LOPES, I., MARTI, A., MORENO-ALIAGA, M.J., MARTÍNEZ, A. Aspectos genéticos da obesidade. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 3, p. 327-338, 2004.

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

MARTÍNEZ, J.A., FRÜHBECK, G. Regulation of energy balance and adiposity: a model with new approaches. **J Physiol Biochem**, v. 52, p. 255-258, 1996.

MÁRTON, I.J., KISS, C. Protective and destructive immune reactions in a apical periodontitis. **Oral Micro. Imun.**, v. 15, p. 139-150, 2000.

MCHEYZER-WILLIAMS, M.G. Immune response decision at the single cell level. **Immunology**, v. 9, 219–227, 1997.

MOULTON, M.J., CRESWELL, L.L., MACKEY, M.E., COX, J.L., ROSENBLOOM, M.R. 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.

NAMMI, S., KOKA, S., CHINNALA, K.M., BOINI KM. Obesity: An overview on its current perspectives and treatment options. **Nutr J**, v. 3, p. 3, 2004.

NIEMAN, D.C., NEHLSSEN-CANNARELLA, S.L., HENSON, D.A., BUTTERWORTH, D.E., FAGOAGA, O.R., WARREN, B.J., RAINWATER, M.K. Immune responses to obesity and moderate weight loss. **Int. J. Obes.**, v. 20, p. 353–360, 1996.

NIEMAN, D.C., HENSON, D.A., NEHLSSEN-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.

O'KEEFE, R.J., TEOT, L.A., SINGH, D., PUZAS, J.E., ROSIER, R.N., HICKS, D.G. Osteoclasts constitutively express regulators of bone resorption: an immunohistochemical and in situ hybridization study. **Lab. Invest.**, v. 76, n. 4, p. 457-465, 1997.

OTERO, M., LAGO, R., LAGO, F., CASANUEVA, F.F., DIEGUEZ, C., GÓMEZ-REINO, J.J. Leptin, from fat to inflammation: old questions and new insights. **FEBS Lett**, v. 579, n. 2, p. 295-301, 2005.

PAULI, J.R., ROPELLE, E.R., CINTRA, D.E., SOUZA, C.T. Efeitos do Exercício Físico na Expressão e Atividade da AMPK $\alpha$  em Ratos Obesos Induzidos por Dieta Rica em Gordura. **Ver. Bras. Med. Esporte**, v. 15, n. 2, p. 98-103, 2009.

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

PI-SUNYER, F.X., LAFERRERE, B., ARONNE, L.J., BRAY, G.A. Obesity-A modern-day epidemic. **J Clin Endocrin**, v. 84, p. 3-5, 1999.

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

ROITT, I.M. **Imunologia**. Atheneu, Rio de Janeiro, 5<sup>o</sup> ed., p. 149-151, 1995.

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

SAMARTÍN, S., CHANDR, R.K. Obesity, overnutrition and the immune system. **Nutri Research**, v. 21, p. 243–262, 2001.

SÁNCHEZ-MARAGALET, V., MARTÍN-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, n. 1, p. 11-19, 2003.

SIBILLE, Y., REYNOLDS, H.Y. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. **Am. Rev. Resp. Disea.**, v. 141, p. 1052-1061, 1990.

SIITERI, P.K. Adipose tissue as a source of hormones. **Am. J. Clin. Nutr.**, v. 45, p. 277-282, 1987.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE CARDIOLOGIA. I Diretriz brasileira de diagnóstico e tratamento da síndrome metabólica. **Arq Bras Cardiol.** v. 84, p. 3-28, 2005.

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

STRACZKOWSKI, M., DZIENIS-STRACZKOWSKA, S., STÊPIEŃ, A., KOWALSKA, I., SZELACHOWSKA, M., KINALSKA, I. Plasma Interleukin-8 Concentrations Are Increased in Obese Subjects and Related to Fat Mass and Tumor Necrosis Factor-alpha System. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 87, n. 10, p. 4602-4606, 2002.

SUNIL, V.R., CONNOR, A.J., ZHOU, P., GORDON, M.K., LASKIN, J.D. Activacion of adherent vascular neutrophils in the lung during acute endotoxemia. **Respire. Res.**, v. 3, p. 23, 2002.

SWEETMAN, P.M., THOMAS, H.F., YARNELL, J.W.G., BAKER, I.A., ELWOOD, P.C. Total and differential leukocyte counts as predictors of ischemic heart disease: the Caerphilly and Speedwell studies. **Am J Epidemiol**, v.145, p. 416-421, 1997.

TANAKA, S., INOUE, S., ISODA, F., WASEDA, M., ISHIHARA, M., YAMAKAWA, T., SUGLYAMA, A., TAKAMURA, Y., OKUDA, K. Impaired

immunity in obesity: suppressed, but reversible lymphocyte responsiveness. **Int. J. Obes.**, v. 17, p. 631-636, 1993.

TRAYHURN, P.E., WOOD, I.S. Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. **Br. J. Nutr.**, v. 92, n. 3, p. 347-355, 2004.

TRAYHURN, P., WOOD, I.S. Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 33, p. 1078-1081, 2005.

UTHAISANGSOOK, S., DAY, N.K., BAHNA, S.L., GOOD, R.A., HARAGUCHI, S. Innate immunity and its role against infections. **Ann. Allergy Asthma Immunol.**, v. 88, n. 3, p. 253-264, 2002.

VACHHARAJANI, V., VITAL, S. Obesity and Sepsis. **J Intensive Care Med**, v. 21, p. 287-295, 2006.

ZARAGOZA-HERMANS, N.M. Studies on the metabolic effects induced in the rat by a high-fat diet control of glucose metabolism in adipose tissue of fed and fasted rats. **Eur J Biochem**, v. 48, p. 579-582, 1974.

ZHANG, W., CHEN, H. The study on the interleukin-8 (IL-8). *Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi*, v. 19, n. 4, p. 697-702, 2002.

WAJCHENBERG, B.L. Subcutaneous and visceral adipose tissue: their relation to the metabolic syndrome. **Endocr. Rev.**, v. 21, p. 697-738, 2000.

WANG, C.Z., HERNDON, D.N., TRABER, L.D., YANG, S.F., COX, R.A., NAKAZAWA, H., BARROW, R.E., TRABER, D.L. Pulmonary inflammatory cell response to sustained endotoxin administration. **J. appl. Physiol.**, v. 76, p. 2785-2793, 1994.

WEBER, D.J., RUTALA, W.A., SAMSA, G.P., SANTIMAW, J.E., LEMON, S.M. Obesity as a predictor of poor antibody response to hepatitis B plasma vaccine. **JAMA**, v. 254, p. 3181-3189, 1985.

WEBER, D.J., RUTALA, W.A., SAMSA, G.P., BRADSHAW, S.E., LEMON, S.M. Impaired immunogenicity of hepatitis B vaccine in obese person. **N. Engl. J. Med.**, v. 314, p. 1393, 1986.

WELBOURN CRB, YOUNG Y. Endotoxin, septic shock and acute lung injury: neutrophils, macrophages and inflammatory mediators. **Br. J. Surg.**, v. 79, p. 998-1003, 1992.

WILLET, W. Is dietary fat a major determinant of body fat? **Am J Clin Nutr**, v. 67, p. 556-562, 1998.

WOMACK, J., TIEN, P.C., FELDMAN, J., SHIN, J.H., FENNIE, K., ANASTOS, K., COHEN, M.H., BACON, M.C., MINKOFF, H. Obesity and immune cell counts in women. **Metab. Clin. and Expe.**, v. 56, p. 998–1004, 2007.

World Health Organization (WHO). Overweight and obesity - a new nutrition emergency? **SCN News**, Geneva, n. 29, p. 3-4, 2005.

World Health Organization (WHO). **Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases**. Report of the joint WHO/FAO expert consultation WHO Technical Report Series, No. 916 (TRS 916), 2003. Disponível na URL: <http://www.who.int/dietphysicalactivity/publications/trs916/download/en/>

YOKOTA, T., ORITANI, K., TAKAHASHI, I., ISHIKAWA, J., MATSUYAMA, A., OUCHI, N. Adiponectin, a new member of the family of soluble defense collagens, negatively regulates the growth of myelomonocytic progenitors and the functions of macrophages. **Blood**, v. 96, n.5, p. 1723-1732, 2000.

## **ANEXOS**

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO B – Documentação de encaminhamento de artigo ao periódico

ANEXO C – Certificado de premiação por 1º lugar de trabalho em congresso

ANEXO D – Certificado de premiação por 2º lugar de trabalho em congresso

ANEXO D - Certificado de apresentação de trabalho em congresso

ANEXO E - Certificado de apresentação de trabalho em congresso

ANEXO F – Certificado de apresentação de trabalho em congresso

## Manuscript submitted - OMI-2010-0002

De:  **jslots@usc.edu**  
Enviada: sexta-feira, 8 de janeiro de 2010 3:20:03  
Para: karlamfsilva@hotmail.com

Dear Miss SILVA:

Your manuscript has been successfully submitted to the Oral Microbiology and Immunology Manuscript Central. As corresponding author, you will receive future communications via e-mail. Your manuscript number is: OMI-2010-0002. Please make note of your manuscript number for future reference. Please remember to quote the electronically generated manuscript number issued to you during this submission process.

You can keep track of your manuscript by logging on periodically to Manuscript Central where the status will be displayed in your Author Center, and also the name and email address of the Editor in charge of your review.

Thank you for your interest in the Oral Microbiology and Immunology

Sincerely yours,

Jorgen Slots  
Oral Microbiology and Immunology

**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, 12 de janeiro de 2009

Ofício nº 95/09

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE  
Para: **Prof.<sup>a</sup> Célia Maria Machado Barbosa de Castro**  
Departamento de Nutrição- CCS  
Universidade Federal de Pernambuco  
Processo nº 23076. 022048/ 2008 - 56

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 “*Efeitos da obesidade sobre parâmetros imunológicos de 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,

Observação:  
Origem dos animais: Biotério do Departamento de Nutrição;  
Animal; Rato; Wistar; Sexo: Machos; Idade: Adultos ( 90 a  
120 dias de vida; Número de animais previsto no protocolo:  
40 animais.

*Maria Teresa Jansen*  
Prof.<sup>a</sup> Maria Teresa Jansen  
Presidente da CEEA  
UFPE



Congresso Regional de  
Análises Clínicas do Nordeste  
17 a 20 de novembro de 2009  
Mar Hotel Recife/PE

CERTIFICADO

## CERTIFICAMOS

que o trabalho intitulado

### DOSAGENS BIOQUÍMICAS EM RATOS OBESOS SUBMETIDOS À ENDOTOXEMIA

dos autores Thays Miranda, Karla MF Silva, Solange MMS Porto, Rosângela R. Silva, Bruno Sampaio e Célia MMB de Castro

recebeu o **PRÊMIO GILSON CIDRIM** como **MELHOR TRABALHO** oferecido pelo 7º Congresso Regional de

Análises Clínicas do Nordeste (CRACNE).

Dr. Jurandi David da Silva  
Presidente do Congresso

Realização:



Sociedade  
Brasileira de  
Análises  
Clínicas



Organização:



Qualidade-Eventos

Patrocinio:



HERMES  
PARDINI



Congresso Regional de  
Análises Clínicas do Nordeste  
17 a 20 de novembro de 2009  
Mar Hotel Recife/PE

# CERTIFICADO

## CERTIFICAMOS

que o trabalho intitulado

### **EFEITO DA OBESIDADE SOBRE PARÂMETROS DA SÉRIE VERMELHA DO SANGUE**

dos autores Rafael Acioli, Karla MF Silva, Solange MMS Porto, Rosangeia R Silva, Etiene AA dos Santos e Célia MMB de Castro  
recebeu o **PRÊMIO GILSON CIDRIM de SEGUNDO COLOCADO** oferecido pelo 7º Congresso Regional de

Análises Clínicas do Nordeste (CRACNE).

Dr. Jurandi David da Silva  
Presidente do Congresso

Realização:



Organização:



Patrocínio:



**7<sup>o</sup>** CRACNE

Congresso Regional de  
Análises Clínicas do Nordeste  
17 o 20 de novembro de 2009  
Mar Hotel Recife/PE

# CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DE TEMA LIVRE

## DOSAGENS BIOQUÍMICAS EM RATOS OBESOS SUBMETIDOS À ENDOTOXEMIA

Autores: Thays Miranda, Karla M. F. Silva, Solange M. M. S. Porto,  
Rosângela R. Silva, Bruno Sampaio, Célia M. B. de Castro

  
Dr. Jurandi David da Silva  
Presidente do Congresso

Realização:



Sociedade  
Brasileira de  
Análises  
Clínicas

SBAC



SBAC-PE

Organização:



Qualidade Eventos  
Associação Brasileira de Qualidade em Eventos

Patrocínio:



HERMES  
PARDINI



Congresso Regional de  
Análises Clínicas do Nordeste  
17 a 20 de novembro de 2009  
Mar Hotel Recife/PE

# CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO DE TEMA LIVRE

## EFEITO DA OBESIDADE SOBRE PARÂMETROS DA SÉRIE VERMELHA DO SANGUE

Autores: Rafael Acioli, Karla M. F. Silva, Solange M. M. S. Porto, Rosângela R. Silva,

Etiene A. A. dos Santos e Célia M. M. B. de Castro

Dr. Jurandi David da Silva  
Presidente do Congresso

Realização:



Sociedade  
Brasileira de  
Análises  
Clínicas



Organização:



Qualidade Eventos  
Eventos Corporativos e Profissionais

Patrocinio:



Certificamos que o trabalho "REPERCUSSÃO DA DIETA HIPERLIPÍDICA SOBRE A TAXA DE FAGOCITOSE DE MACRÓFAGOS ALVEOLARES EM RATOS ADULTOS ENDOTOXÊMICOS" com o(s) autor(es) AMPAIO, B.; SILVA, K. M. F.; SILVA, R. R.; PORTO, S. M. M. S.; CASTRO, C. M. M. B. inscrito no tema: Infecção Bacteriana foi apresentado na forma de pôster, no XVI Congresso Brasileiro de Infectologia, realizado no período de 18 à 21 de outubro de 2009.

  
**Maria Raquel dos H. S. Guimarães**  
Presidente do Congresso



  
**Genivaldo José Durvally Furtado**  
Presidente da Sociedade Brasileira de Infectologia

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)