



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA**



ADENILDA QUEIRÓS SANTOS DEIRÓ

TESE DE DOUTORADO

**ASPECTOS DA RESPOSTA IMUNE INATA DE RATOS OBESOS
SUBMETIDOS À SEPSE ABDOMINAL**

**Salvador – Bahia – Brasil
2010**



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



ADENILDA QUEIRÓS SANTOS DEIRÓ

TESE DE DOUTORADO

**ASPECTOS DA RESPOSTA IMUNE INATA DE RATOS OBESOS
SUBMETIDOS À SEPSE ABDOMINAL**

*Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde
da Universidade Federal da Bahia para obtenção
do título de Doutor em Imunologia*

**Orientadora: Maria José Pedreira Ramalho
Co-orientador: Roberto José Meyer Nascimento**

Salvador – Bahia – Brasil
2010

Ficha Catalográfica elaborada pela

Biblioteca do Instituto de Ciências da Saúde da UFBA – Salvador – Bahia

D324 Deiró, Adenilda Queirós Santos,
Aspectos da Resposta imune inata de ratos obesos
submetidos à sepse abdominal / Adenilda Queirós Santos Deiró. -
Salvador, 2010. 128 f. ; il.

Tese (doutorado) - Universidade Federal da Bahia,
Instituto de
Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em
Imunologia, 2010.

Orientadora: Maria José Pedreira Ramalho
Co-orientador: Roberto José Meyer Nascimento

1. Obesidade. 2. Sepse. 3. Macrófago Alveolar. 4.
Pulmão 5. Óxido

“Dê ao mundo o melhor de você. Mas isso pode não ser o bastante. Dê o melhor de você assim mesmo. Veja você que, no final das contas, é tudo entre VOCÊ e DEUS. Nunca foi entre você e os outros.”

Madre Tereza de Calcutá

Ao meu marido Ricardo pelo amor e compreensão que tem me dedicado ao longo desse período. E ao meu bebê que em breve estará conosco, mas que já tem acompanhado do interior do meu ventre esses últimos momentos da finalização de mais uma etapa da minha vida.

Obrigada, meus amores!!!

AGRADECIMENTOS

À Deus por tudo que tenho conquistado ao longo da minha vida.

Aos meus pais: Helena Queiroz Santos e Antonio Almeida Santos (In Memoriam) e minhas irmãs Aidil, Déa e Izis pelo apoio e companhia incondicional.

Aos meus orientadores e amigos: Maria José Ramalho, Roberto José Meyer Nascimento e Célia Maria Machado Barbosa de Castro por todo o apoio e incentivo durante a realização deste trabalho.

Aos professores, colegas e amigos do Departamento de Ciências da Nutrição Jairza Medeiros, Tereza Cristina, Mônica Portela, Ana Marlúcia Assis, Ester Conceição e Lígia Amparo por toda compreensão, apoio e ajuda durante essa caminhada.

Aos amigos do Programa de Pós-Graduação em Imunologia (PPGIIm) e Laboratório de Imunologia (Labimuno): Gabriele Rodrigues, Marquinhos, Patrícia Cisneiros, Rosa Guedes, Alex Barbosa, Dilcéia Reis, Daniela Santana, Sonia e Geraldo.

Aos professores e colegas do PPGIm pelo apoio e companhia durante todo o período do curso.

Aos amigos que me ajudaram nas dosagens e análises dos resultados desse trabalho: Paula Moreira, Rosa Guedes, Bruno Andrade e Victor Luiz Nunes.

Aos amigos da UFPE que me apoiaram nas técnicas utilizadas neste trabalho e nos momentos de sufoco: Wylla Ferreira e Silva, Bruno Galvão e Rosangela Rosendo e Lúcia Pires.

Aos estagiários e amigos que ajudaram no cuidado com os animais e nos experimentos para produção dos resultados encontrados: Gabriela Prado, Yanna Matos, Luís Carlos, Leilane Calixto, Vivian Leal, Edmara Xavier e Naiana Rocha.

Aos funcionários que colaboraram sempre que foram requisitados para qualquer atividade: D. Chica, Sr. Luis, Sr. Novato e todos que me ajudaram de alguma forma. Agradecimento especial ao Sr. Renato Bueno (Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação - UFBA) – In memoriam – pelo auxílio e dedicação no atendimento às solicitações feitas pelos pós-graduandos da UFBA.

Aos responsáveis pelos Laboratórios onde realizei os experimentos: Dra. Maria José Ramalho - Laboratório de Neuroimunoendocrinologia (LABNIE-UFBA); Dr. Roberto José Meyer - Laboratório de Imunologia (LABIMUNO-UFBA); Dr. Ramon El-Blachá - Laboratório de Neuroquímica, (LABNq-UFBA) e Dra. Célia Castro - Laboratório de Imunopatologia Keiso Azami (LIKA-UFPE).

Ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia (PPGIIm) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por todo o apoio logístico e financeiro.

À Fundação de Apoio à Pesquisa e Extensão do Estado da Bahia (FAPESB) pelo apoio financeiro através de bolsa de doutorado.

SUMÁRIO

página

Lista de Siglas	
Lista de Abreviaturas	
Resumo	
Abstract	
1. Introdução	01
2. Objetivos	11
3. Hipótese	12
4. Material e Métodos	14
4.1. Animais	14
4.2. Manipulação Nutricional	14
4.3. Coleta de sangue da cauda	16
4.4. Indução de Sepse – Ligação e perfusão do ceco (CLP)	16
4.5. Cirurgia - Sham CLP	17
5. Avaliação murinométrica – peso corporal	18
5.2. Peso da gordura retroperitoneal	18
5.3. Análise Histológica do Pulmão	19
6. Leucograma	20
6.1. Contagem total de leucócitos	20
6.2. Diferencial de leucócitos	22
7. Avaliação Imunológica	24
7.1. Obtenção de Macrófagos	
7.2. Cultura de Macrófagos	25
7.3. Avaliação do índice de aderência dos macrófagos	27
7.4. Avaliação da taxa de fagocitose	27
7.5. Dosagem de óxido nítrico	29
7.6. Análise de Citocinas	29
7.6.1. Dosagem de Interleucina -12	29
7.6.2. Dosagem de Interferon-gama (IFN- γ)	30

8. Avaliação bioquímica - Determinações séricas	30
8.1. Proteína C-reativa	30
9. Análise Estatística	31
10. Resultados	32
10.1. Artigo 1	33
10.2. Artigo 2	68
11. Considerações Finais	103
12. Referências Bibliográficas	105
ANEXOS	111
Anexo I	112
Tabela 1- Composição da Dieta Padrão	112
Tabela 2- Composição da Dieta Hiperlipídica	113
Anexo II	115
Certificado de Aprovação do Comitê de ética em Experimentação	
Animal	115
Anexo III	116
Publicações de Resumos em Anais de Congressos	116

RESUMO

A obesidade é uma doença multifatorial que tem em sua origem fatores genéticos, psicossociais, nutricionais, metabólicos e endócrinos. A obesidade e a sepse em conjunto, são uma causa de crescente preocupação no mundo ocidental e o aumento da morbidade e mortalidade têm sido relatados em pacientes obesos criticamente enfermos. O mecanismo exato para este fenômeno ainda não está esclarecido. O presente trabalho teve como objetivo avaliar eventuais conseqüências da obesidade sobre aspectos da resposta imune inata de ratos submetidos à sepse polimicrobiana. No primeiro artigo foram avaliadas as conseqüências da sepse em ratos obesos através da análise do leucograma e da histologia do pulmão. Neste trabalho encontramos aumento de leucócitos totais tanto nos ratos submetidos à cirurgia de indução da sepse (CLP) quanto aqueles sham-operados nos tempos de 4 e 24 horas após os procedimentos. Os ratos obesos sépticos apresentam maior lesão pulmonar após 24h da sepse do que os outros grupos. No segundo artigo avaliou-se a função de macrófagos alveolares de ratos obesos frente à sepse polimicrobiana. Foram analisados o índice de aderência, a taxa de fagocitose, a produção de óxido nítrico e a produção de citocinas IFN- γ e IL-12 de ratos normais e obesos sépticos ou sham-operados nos tempos de 4 e 24 horas. Os resultados desse trabalho mostraram que os ratos obesos sépticos produziram maior quantidade de NO após 4h e 24h da cirurgia de indução da sepse (CLP) em relação aos demais grupos. Assim, o resultado deste trabalho demonstrou que a obesidade em situações de estresse orgânico como a sepse pode exacerbar a resposta imune inata deixando o indivíduo susceptível à piora do quadro clínico comprometendo a sobrevivência do indivíduo nesta situação.

ABSTRACT

Obesity is a multifactorial disease that has its origins in genetic, psychosocial, nutritional, metabolic and endocrine disturbances. Obesity and sepsis together, are a cause of increasing concern in the Western world and the increased morbidity and mortality have been reported in critically ill obese patients. The exact mechanism for this phenomenon is still unclear. This study aimed to evaluate possible consequences of obesity on innate immune system of rats submitted to polymicrobial sepsis. In the first article we evaluated the consequences of sepsis in obese rats by analysis of WBC and lung histology. In this study we found increased total leukocytes both in rats subjected to surgical induction of sepsis (CLP) and sham-operated ones in times of 4 and 24 hours after the procedures. Obese rats have more severe septic lung injury after 24 hours of sepsis than other groups. In the second article evaluated the function of alveolar macrophages from obese rats against the polymicrobial sepsis. We analyzed the rate of adherence, the rate of phagocytosis, nitric oxide production and the production of cytokines IFN- γ and IL-12 in normal rats and obese septic or sham-operated at times of 4 and 24 hours. The results of this study showed that obese rats produced higher amounts of NO 4 h and 24h after surgery induction of sepsis (CLP) compared to other groups. Thus, the results of this study demonstrated that obesity in stress situations such as organic sepsis may exacerbate innate immune response leaving the individual susceptible to worsening of clinical compromising the survival of the individual in this situation.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A obesidade é uma doença multifatorial que tem em sua origem fatores genéticos, psicossociais, nutricionais, metabólicos e endócrinos (WHO, 2006) e tornou-se um grave problema de saúde pública nas últimas décadas. Segundo o World Health Organization (WHO), existem aproximadamente 1,6 bilhões de adultos com sobrepeso e 500 milhões de adultos com obesidade em todo o mundo e a projeção é que em 2015 esses valores cheguem a 2,3 bilhões de adultos com sobrepeso e mais de 700 milhões serão obesos.

O surgimento e a manutenção da obesidade contam com a contribuição de fatores que atuam na regulação da ingestão de alimentos através de um complexo sistema de sinais centrais e periféricos que interagem para modular a ingestão de nutrientes de forma individual (Valassi *et al.*, 2008) e no armazenamento de energia (Bouchard, 2000). Assim, a principal causa da obesidade é o desequilíbrio entre a quantidade de energia consumida e o gasto desta, levando a um acúmulo no organismo. Esse armazenamento tem como consequência o excesso de massa gordurosa que se traduz não apenas em um depósito de energia, mas também em um órgão endócrino (Garruti *et al.*, 2008). Essa gordura encontra-se dispersa por todo o organismo e sua atividade secretória é regulada por mecanismos humorais e hormonais pouco esclarecidos.

O excesso de gordura corporal tem sido associado ao aumento da morbimortalidade, condição que aumenta o risco de desenvolvimento de

patologias como diabetes, hipertensão, dislipidemias e até mesmo certos tipos de câncer (Fujimoto *et al*, 1999, Halpern *et al*, 2004). Vale salientar que existem dois tipos de tecido adiposo com funções fisiológicas diferentes. Assim são classificados como tecido adiposo branco, aquele localizado na região subcutânea e abdominal (ou visceral); e tecido adiposo marrom que está bem distribuído no organismo, além disso, em humanos, o tecido adiposo marrom apresenta-se em maior quantidade no início da vida e é reduzido na fase adulta (Lazar, 2008). O tecido adiposo marrom tem função importante no metabolismo oxidativo, através da oxidação de ácidos graxos para geração de calor; e sua coloração amarronzada se dá pelo grande número de mitocôndrias, ou seja, o citocromo contido dentro desta organela (Lazar, 2008). Já o tecido adiposo branco, atualmente, é reconhecido por possuir diversas funções tais como barreira física, isolamento térmico, armazenamento de energia e secreção de substâncias bioativas com ação local e à distância (Fantuzzi, 2005).

Nos depósitos de gordura também é possível encontrar diversos tipos de células como macrófagos, pré-adipócitos e adipócitos (Trayhurn and Wood, 2005). Produtos do tecido adiposo como adipocinas desempenham um importante papel no equilíbrio energético, na sensibilidade à insulina e doença vascular e na resposta imunológica (Prins, 2002).

O tecido adiposo possui, neste momento, um importante papel em pesquisas que tratam da obesidade devido a um novo entendimento sobre a biologia do adipócito e a descoberta de suas funções endócrinas e de sinalização (Ahima and Flier, 2000). Sendo assim, o estudo da obesidade tem

se tornado atraente do ponto de vista da biologia celular e molecular. Logo, o principal alvo dessas pesquisas é o tecido adiposo branco por ser um grande armazenador de energia na forma de triglicerídeos e por apresentar um grande número de células secretórias, o que o torna um dos maiores órgãos endócrinos do nosso corpo (Trayhurn, 2007).

A obesidade em indivíduos adultos tem sido associada com elevada concentração de leptina circulante devido a sua produção quase exclusiva no tecido adiposo correlacionando-se com a massa adiposa, e a tendência ao ganho de peso em populações não obesas com altos níveis basais de leptina podendo sugerir uma resistência a leptina nesses indivíduos (Lissner *et al.*, 1999). Alguns autores também têm sugerido que a elevada concentração de leptina no plasma pode estar associada a um transporte prejudicado da leptina na barreira hemato-encefálica, e conseqüentemente uma resistência central ao sinal da leptina (Banks *et al.*, 1999). Uma das ações periféricas da leptina é a redução da síntese e da secreção de insulina formando assim um eixo adipo-insular. A resistência a ação da leptina pode levar a interrupção do eixo adipo-insular, hiperinsulinismo e diabetes mellitus tipo 2 associada à obesidade (Seufert, 2004). Nesse sentido, a adiposidade central tem sido relacionada com resistência à insulina e com as doenças cardiovasculares.

Além da leptina, outros produtos do tecido adiposo com suas diversas estruturas e funções têm demonstrado grande importância. As adipocinas, como são chamadas incluem citocinas clássicas, fatores de crescimento e proteínas do sistema complemento; incluem ainda, proteínas envolvidas na

regulação da pressão sanguínea, homeostase vascular, metabolismo dos lipídios, da glicose e angiogênese (Trayhurn, 2007).

Os adipócitos possuem propriedades inflamatórias intrínsecas, são sensíveis a agentes infecciosos e a sinais inflamatórios mediados por citocinas, além disso, essas células expressam receptores que são capazes de detectar a presença de patógenos e de mediadores inflamatórios (Ramalho and Guimarães, 2008). Os adipócitos podem reagir a vários mediadores inflamatórios tais como IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-11, IFN- γ e diversos componentes da parede celular de microrganismos (Bergh and Scherer, 2005). Os receptores ao serem estimulados ativam diversos sinais de transdução da cascata inflamatória, induzindo assim, a expressão e secreção de proteínas de fase aguda e mediadores da inflamação como TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, fatores B e C3 do complemento, prostaglandina E2 entre outros, e ainda moduladores inflamatórios como a adiponectina, resistina e leptina (Bergh and Scherer, 2005).

A elevada quantidade de tecido adiposo em indivíduos obesos tem contribuído para uma relação direta entre obesidade e inflamação sistêmica (Bergh and Scherer, 2005). Em 1993, Hotamisligil *et al.*, demonstrou pela primeira vez a existência de um estado inflamatório relacionado ao tecido adiposo e seu papel na obesidade. Observou ainda, a expressão da citocina pró-inflamatória (TNF- α) no tecido adiposo branco induzida pela obesidade, além disso, demonstrou que a elevada expressão desta citocina contribuiu para

a resistência à insulina de forma sistêmica e para uma relação direta entre obesidade e inflamação sistêmica (Bergh and Scherer, 2005).

Sabe-se atualmente que a obesidade está associada com um baixo grau de inflamação, porém os mecanismos envolvidos ainda são pouco esclarecidos (Bastard *et al.*, 2006). Alguns autores relatam a existência de uma resposta inflamatória crônica, caracterizada por uma produção excessiva de adipocinas, ativação de algumas vias de sinalização pró-inflamatória e conseqüentemente a indução de diversos marcadores de inflamação (Sartipy and Loskutoff, 2003). Os marcadores que estão presentes em níveis elevados na obesidade são a proteína C-reativa (PCR), o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), a interleucina-6 (IL-6), entre outros. Além disso, a quantidade elevada de IL-6 circulante leva a um aumento nos níveis séricos de proteína C-reativa que em indivíduos obesos pode causar o diabetes do tipo 2 em pouco tempo, por contribuir com resistência a insulina (Barzilay *et al.*, 2001).

Além dos sinalizadores e marcadores inflamatórios, estudos têm identificado células do sistema imune (monócitos/macrófagos) como participantes ativos na inflamação induzida pela obesidade e suas complicações (Ferrante Jr, 2007). A infiltração e ativação de macrófagos no tecido adiposo branco parecem ser multifatoriais. As vias de sinalização sejam elas parácrinas, autócrinas ou endócrinas assim como as modificações mecânicas (hiperplasia e hipertrofia do adipócito) parecem possuir um papel importante nesse processo (Cancello and Clément, 2006). A atração e retenção de macrófagos no tecido adiposo branco parecem estar relacionadas com uma

hipoxia do tecido adiposo. Sabe-se que a hipoxia tecidual local induz a atração e manutenção de macrófagos em alguns tumores sólidos e placas de aterosclerose (Murdoch *et al.*, 2005).

Em indivíduos obesos, o tecido adiposo encontra-se pouco vascularizado devido à grande expansão desse tecido e o consequente afastamento entre vasos e adipócitos levando-os a hipoxia e posterior necrose (Beltowski, 2006). Diversos autores têm sugerido que essa hipoxia estimula a liberação de citocinas pró-inflamatórias e fatores angiogênicos como o VEGF (Fator de Crescimento do Endotélio Vascular) levando a um aumento do fluxo sanguíneo e estimulando a vascularização (Trayhurn and Wood, 2005). Outro fator que participa da resposta metabólica a hipoxia é o HIF-1 (Fator Induzível de Hipoxia – 1) ativado nos estados de hipoxia através da estimulação da expressão de sua subunidade alfa, tornando-se assim, um fator de transcrição ativado (Trayhurn and Wood, 2005).

Estudos têm demonstrado que a maioria dos agregados de macrófagos no tecido adiposo está localizada em torno de adipócitos mortos, sugerindo que esses macrófagos possuem uma função de limpeza de células necrosadas do tecido adiposo (Cinti *et al.*, 2005). Também foi observado um agregado de macrófagos no processo de formação de novos vasos em locais de inflamação e áreas isquêmicas (Cursiefen *et al.*, 2004). A angiogênese que ocorre com a participação dos macrófagos leva a uma hipoxia local.

Assim, os macrófagos podem contribuir para o controle local da expansão de massa gorda e a sua função biológica (Canello and Clément, 2006). Neste sentido, o macrófago produz duplo efeito sobre o tecido adiposo branco – um efeito benéfico local, controlando e limitando o desenvolvimento de massa gorda e simultaneamente um efeito deletério sistêmico através da produção e secreção de quimiocinas e citocinas inflamatórias que favorecem a geração e progressão das complicações relacionadas à obesidade (Permana *et al.*, 2006). Esse conjunto de células e substâncias mediadoras do sistema imunológico são essenciais para o controle de uma resposta imunológica efetiva.

Nesse sentido, a resposta imune é fundamental na defesa contra agentes infecciosos e se constitui no principal impedimento para a ocorrência de infecções locais e disseminadas. Sabe-se que para a quase-totalidade das doenças infecciosas, o número de indivíduos expostos à infecção é bem superior ao dos que realmente apresentam doença, indicando que a maioria das pessoas tem condições de destruir esses microorganismos e impedir a progressão da infecção (Janeway, 2001). Por outro lado, as deficiências imunológicas, sejam da imunidade inata (disfunções de células fagocíticas e deficiência de complemento) ou da imunidade adaptativa (deficiência de produção de anticorpos ou deficiência da função de células T), são fortemente associadas com aumento de susceptibilidade a infecções (Machado *et al.*, 2004).

A sepse é uma síndrome clínica que resulta de uma interação complexa entre o hospedeiro e os agentes infecciosos, e é caracterizada pela ativação

sistêmica de múltiplas vias inflamatórias, incluindo a rede de citocinas e coagulação levando ainda a uma inflamação descontrolada e supressão imunológica (Van der Poll, 2001; Hotchkiss and Karl, 2003). Alterações celulares, distúrbios microcirculatórios difusos e desequilíbrio hemodinâmico, levam a uma ruptura entre o fluxo sanguíneo e os requerimentos metabólicos implicando no desenvolvimento da disfunção de múltiplos órgãos, responsável pela maioria das mortes (Giantomasso et al., 2003). Dessa forma, todas as alterações que ocorrem num quadro de sepse exigem investigação: o foco infeccioso, as alterações hemodinâmicas e a resposta inflamatória local e generalizada. Vale ressaltar que a ativação das células inflamatórias é primordial para o desenvolvimento da sepse (Galanos and Freudenberg, 1993).

A sepse é mediada por estímulo infeccioso e muitas manifestações clínicas da sepse podem ser aplicadas em modelos experimentais com animais (Bleuter, 2004). Alguns modelos têm sido propostos tais como: administração endovenosa de LPS (endotoxemia) ou de bactérias como a E.Coli (bacteremia), usadas devido ao seu poder de mimetizar as manifestações que ocorrem na sepse; administração intraperitoneal da bactéria viva ou de componentes microbianos como o LPS; modelos de injúria do intestino com consecutiva liberação da flora microbiana, tais como: ligadura e perfuração do ceco (cecal ligation and puncture – CLP) e introdução de cateter no cólon ascendente (colon ascendens stent peritonitis – CASP) (Macarthur et al, 2000). Os modelos de liberação da flora bacteriana (CLP e CASP) são os que mais se assemelham ao quadro de sepse em humanos. Nesses modelos, depois que ocorre a perfuração da parede intestinal, a liberação do conteúdo cólico ocorre

gradativamente em direção à cavidade peritoneal. A chegada deste conteúdo na cavidade induz a peritonite, que pode evoluir para um quadro de sepse ou choque séptico (Benjamim, 2001).

Estudos têm demonstrado que o processo de infecção sistêmica tem prejudicado diversos órgãos sendo o pulmão um dos mais afetados. Existem evidências de que a sepse causa prejuízos à função imune por induzir defeitos na imunidade inata (Cohen, 2002). Particularmente existe um importante defeito no recrutamento de neutrófilos durante a sepse severa caracterizada pela falha de migração para o local da infecção associado ao seqüestro dessas células pelo pulmão. Neutrófilos e macrófagos são capazes de gerar espécies reativas de oxigênio e enzimas, que medeiam fagocitose de micróbios (Segal, 2005). Nitrito Inorgânico (NO_2^-) encontrado em meio de cultura de macrófagos ativados e a secreção de espécies reativas de oxigênio por macrófagos durante a fagocitose está associado com atividade antimicrobiana (Tasat et al., 2003).

Assim como as espécies reativas de oxigênio, as citocinas também possuem papel importante na condução do processo infeccioso.

Diversos estudos têm demonstrado que indivíduos sépticos, especialmente aqueles que possuem algum grau de desnutrição ou excesso de peso e obesidade, apresentam piora no equilíbrio metabólico e na resposta imune. O presente estudo pretende avaliar possíveis efeitos danosos às células do sistema imunológico e avaliar aspectos da resposta imune inata, de ratos que receberam dietas hiperlipídicas por longo período. Sabe-se que a sepse é uma síndrome inflamatória sistêmica onde a resposta imune inata está presente e precisa ser estudada no sentido de compreender melhor o seu

mecanismo de desenvolvimento. Os resultados do presente trabalho poderão auxiliar o estudo e a compreensão de eventuais efeitos maléficos da obesidade sobre o sistema imune inato de ratos sépticos comparados àqueles sadios. Ou seja, o tratamento da sepse em indivíduos obesos merece maior atenção devido à sua vulnerabilidade imunológica.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar as conseqüências da obesidade sobre aspectos da resposta imune inata de ratos obesos submetidos à sepse.

2.2. Específicos

- Avaliar em macrófagos alveolares, após 4 e 24 horas de sepse: o índice de aderência, a taxa de fagocitose, a produção de óxido nítrico e a liberação de citocinas (IFN- γ e IL-12);

- Avaliar ainda, após 4 e 24 horas de sepse: o perfil de células da série branca do sangue periférico (leucograma); os níveis de proteína C-reativa e a histologia do pulmão de ratos dos grupos estudados.

3. HIPÓTESES

H_0 – Ratos obesos apresentam resposta imunológica semelhante aos ratos normais após indução de sepse abdominal.

H_1 – Ratos obesos apresentam resposta imune inata aumentada, quando submetidos à sepse polimicrobiana abdominal.

MÉTODOS

4. METODOLOGIA

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA) da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia, em 24 de Abril de 2007.

4.1. Animais

Ratos, albinos, machos da linhagem Wistar, foram obtidos da colônia de criação do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, e foram mantidos no biotério sob temperatura de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ e ciclo claro/escuro de 12 horas (claro - 6 às 18h; escuro - 18 às 6h), recebendo *ad libitum*, as respectivas rações e a água.

4.2. Manipulação nutricional

Após o nascimento, os filhotes machos foram mantidos com suas mães, em número de seis. Quando necessário, procedeu-se a uma redução ou complementação da prole, através da escolha aleatória de filhotes machos de outras ninhadas da mesma idade. Em seguida, segundo o regime dietético empregado, foram obtidos os grupos:

Grupo DP (Dieta Padrão): constituído por animais que receberam dieta padrão (NUVILAB – Nuvital Nutrientes S/A) durante toda a vida (Tabela 1).

Grupo Dieta Hiperlipídica (DH): constituído por animais que receberam dieta hiperlipídica (Tabela 2) durante 20 semanas, após desmame.

Emprego da Dieta Hiperlipídica (DH) na obtenção dos obesos

A Dieta Hiperlipídica (DH) é uma dieta baseada em alimentos ou preparações consumidas por grande parte da população urbana de diversos países. Dietas hiperlipídicas palatáveis têm sido utilizadas para a reprodução de modelos experimentais de sobrepeso/obesidade e alterações metabólicas relacionadas. Nesse estudo, utilizamos a dieta hiperlipídica constituída de alimentos hipercalóricos: biscoito maisena, amendoim, chocolate ao leite e a ração padrão para murinos (Nuvilab[®]) na proporção de 1:2:2:3 (Estadella, 2004). Todos os ingredientes foram triturados, misturados e peletizados. Após a secagem em estufa, a dieta era oferecida aos animais de acordo com o grupo experimental.

Table 1. Composition of the standard diet (NUVILAB – Nuvital Nutrientes S/A, Brazil)

Nutrients	Diet (g/100g)	
	SD	HF
Carbohydrates	57	46
Proteins	22	17
Fats	4	23
Ashes	9	4
Humidity	8	10
Energy (Kcal/g)	3,5	4,5

Table 2. Composition of the fat acids of the Standard and High Fat Diet

Fatty Acids	Total Fatty Acids %	
	SD	HF
C12:0	ND	13,81
C14:0	ND	5,81
C16:0	15,86	12,65
C18:0	3,31	6,08
C18:1 ω -9 cis	26,24	34,52
C18:1 ω -9 trans	1,18	0,41
C18:2 ω -6 cis	49,68	21,68
C18:3 ω -3	3,72	0,27
C20:0	ND	0,77

C20:1 ω -9	ND	0,80
C22:0	ND	1,58
C24:0	ND	1,01
Total SFAs	19,17	41,71
Total MUFAs cis	26,24	35,32
Total PUFAs cis	53,4	21,95
Total TFAs	1,18	0,41
PUFA: SFA	2,78	0,53
Ω -6: ω -3	13,35	80,3

OLIVEIRA, et al. 2011.

4.3. Coleta de Sangue

Antes da cirurgia, os ratos foram anestesiados com Uretana a 14% e logo após tiveram sua jugular canulada para coleta de sangue utilizado para dosagem bioquímica nos tempos: 0 e 04 e 24h após cirurgia de indução da sepse.

4.4. Indução de Sepse por Ligadura e perfuração do ceco (LPC)

Os ratos foram anestesiados com uretana 14% e mediante pequena incisão mediana de 1cm logo acima da sínfise púbica, a peritonite foi induzida pela técnica modificada de ligadura e punção do ceco (Wichterman *et al*, 1979).

Um molde rígido de plástico com 3mm de diâmetro foi aplicado junto à parede do ceco com a finalidade de calibrar a ligadura que foi realizada com fio 2-0. Na seqüência, o ceco foi puncionado uma única vez com uma agulha 18

G, que perfurou o ceco transpassando de um lado a outro (Figura 1). Após a cirurgia, os ratos foram suturados e postos em suas respectivas gaiolas. As análises foram realizadas após 04 e 24 horas da indução da sepse.

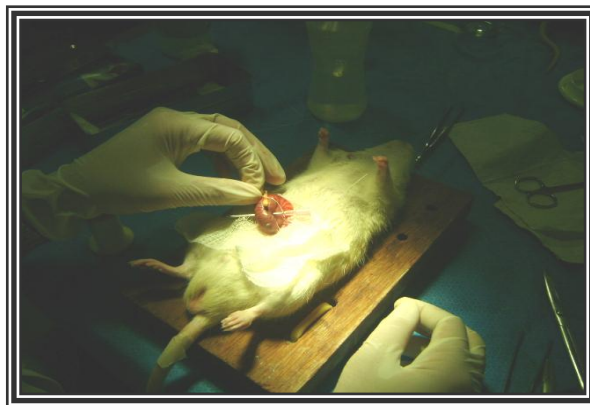


Figura 1 - Indução de Sepse por Ligadura e punção do ceco (LPC)

4.5. Cirurgia Sham LPC - Laparotomia

Os ratos foram anestesiados com uretana 14% e mediante pequena incisão mediana de 1cm logo acima da sínfise púbica, o ceco foi exposto e colocado de volta dentro do abdomen que foi imediatamente suturado. Após a cirurgia, os ratos foram colocados em gaiolas individuais para realização das avaliações após 4 e 24h de cirurgia, respectivamente.

Assim, os grupos foram constituídos sendo denominados da seguinte forma:

Grupo DP (Dieta Padrão / Sham): constituído por animais que receberam dieta padrão por todo o período.

Grupo DH (Dieta Hiperlipídica / Sham): constituído por animais que receberam dieta hiperlipídica durante 20 semanas, após desmame.

Grupo DPS (Dieta Padrão / Séptico): constituído por animais que receberam dieta padrão por todo o período do experimento, e foram submetidos à sepse pelo método CLP.

Grupo DHS (Dieta Hiperlipídica / Séptico): constituído por animais que receberam dieta hiperlipídica durante 20 semanas, após desmame e foram submetidos a sepse pelo método CLP.

Modelo esquemático do estudo

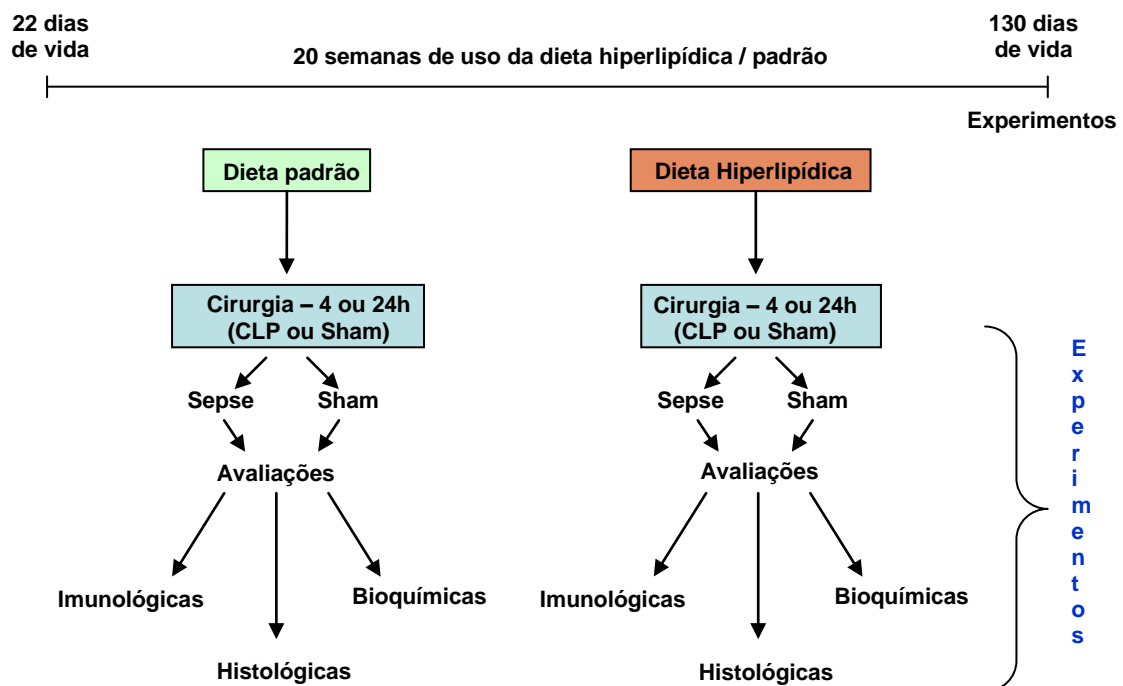


Figura 2 – Modelo Esquemático do estudo.

5.1. Peso dos animais

O peso corporal dos animais era aferido, após o desmame, em dias alternados, até o dia do experimento (20^a semana). Para isso, utilizou-se balança eletrônica com capacidade para 3 Kg (marca FILIZOLA, modelo MF-3).

6. CONTAGEM TOTAL E DIFERENCIAL DE LEUCÓCITOS

- ***Procedimento de coleta do sangue para realização do leucograma***

Para coleta do sangue, o rato era anestesiado. Uma vez anestesiado, realizava-se um pequeno corte com bisturi na extremidade da cauda do rato para a coleta de sangue necessário para realização do leucograma.



Figura 3 – Procedimento de coleta de sangue da cauda do animal.

As amostras de sangue então coletadas, eram distribuídas em tubos. Para análise do leucograma (contagens total e diferencial de leucócitos), era extraído 0,5 ml de sangue e depositado em tubo de 5 ml previamente acrescido

de uma gota (20 µl) de anticoagulante (EDTA - ácido etileno diamino-tetra-acético a 3%).

- **Contagem total de leucócitos**

Para contagem dos leucócitos era utilizada uma solução diluidora de leucócitos (solução de TURK). A solução de TURK consiste de uma solução de ácido acético a 3% com a propriedade de destruir os eritrócitos e corar ligeiramente o núcleo dos leucócitos.

Os leucócitos eram contados à microscopia (Microscópio óptico, utilizando-se uma lente de aumento de 40x). Para isso, uma amostra de sangue era cuidadosamente diluída: 1:20 em solução de Turk, em uma câmara de volume conhecido (hemocitômetro ou Câmara de Neubauer). Em seguida, fazia-se a contagem de todos os leucócitos encontrados nos quadros marcados pela letra “L” na figura relativa ao hemocitômetro (Figura 4). O resultado era obtido utilizando-se a seguinte fórmula:

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

Onde:

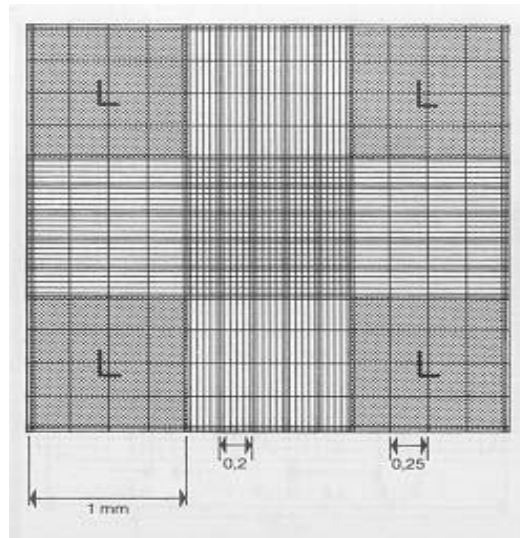
Lc = número total de leucócitos contados em 4 de mm²

4 = fator de conversão para 1 mm³

20 = fator de conversão da diluição utilizada

10 = fator de conversão para 1mm³ (profundidade da lâmina)

Figura 4 – Hemocitômetro utilizado para contagem de células



L = 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 espalhado 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.

O preparo do esfregaço consiste em colocar uma pequena gota de sangue sobre uma lâmina e com a ajuda de outra lâmina com inclinação de 45° em relação à primeira, aproximá-la da gota, permitindo que o sangue toque e espalhe-se pelo vértice do ângulo. Em seguida, deslizá-la com um movimento uniforme e para frente, mantendo a mesma angulação e o contato inicial entre

as duas lâminas. Assim, a gota de sangue será distendida, formando uma película.

Para a coloração do esfregaço foi utilizado o kit Panótico Rápido LB – Laborclin Ltda. O método de coloração May-Grünwald-Giemsa constitui um sistema de coloração diferencial dos elementos figurados do sangue, onde as estruturas celulares se coram nos mais diversos nuances entre o vermelho e o azul, permitindo a identificação e a diferenciação entre elas. O kit consiste de uma solução fixadora e duas soluções corantes.

Depois de seca, a lâmina era examinada ao Microscópio óptico com objetiva de 100X por imersão. A leitura se dava no esfregaço pela contagem de cem células fazendo-se movimentos de zigue-zague sobre a lâmina num único sentido. Os diferentes elementos eram contabilizados através da utilização de um contador manual de células da marca DIGITIMER com 8 teclas correspondentes a cada tipo de célula. A partir dos dados obtidos eram calculados os valores relativos para cada tipo de célula.

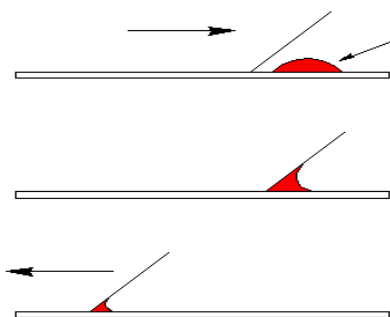


Figura 5 – Técnica do esfregaço sanguíneo.

7. AVALIAÇÃO IMUNOLÓGICA

7.1. Cultura e análise de função de macrófagos

- ***Obtenção de macrófagos***

Foram utilizados ratos com idade entre 130 e 140 dias, os quais foram distribuídos nos quatro grupos anteriormente descritos.

Antes do procedimento cirúrgico, os ratos eram pesados e anestesiados com uretana a 14% na proporção de 1ml/100g de peso do animal.

Com o animal anestesiado seguia-se o procedimento cirúrgico de traqueostomia, colocando-se o animal numa superfície plana em posição dorsal.

Para limpeza da área a ser trabalhada, era utilizado álcool a 70%. Após a limpeza, cortava-se a pele na porção média do pescoço do animal abrindo-se a camada de músculos e afastando-as até obter acesso à traquéia.

Com uma pequena pinça isolava-se e prendia-se a traquéia onde era feito um pequeno corte entre dois anéis da traquéia na parte superior. Após a abertura do orifício era inserida na traquéia uma cânula de plástico acoplada a uma seringa contendo 2 a 4ml de soro fisiológico à temperatura ambiente. Posteriormente fazia-se a introdução do líquido com movimentos de entrada e saída por 3 a 5 vezes. O material recolhido era colocado em tubo Falcon de 50ml.



Figura 6 – Procedimento para coleta do lavado broncoalveolar.

O procedimento de coleta do material era realizado até que se completasse cerca de 30ml de lavado broncoalveolar, por rato. O material recolhido ficava armazenado em recipiente estéril e em banho de gelo, protegido da luz até que se iniciasse a próxima etapa.

- ***Cultura de macrófagos***

Todo o procedimento com os macrófagos era realizado em fluxo laminar objetivando não contaminar as culturas de células.

O lavado broncoalveolar recolhido era centrifugado a 1500rpm durante 10 minutos. Após essa etapa o precipitado correspondente às células era ressuspenso em meio RPMI 1640 e, em seguida, contadas.

A contagem era feita na Câmara de Neubauer colocando-se a suspensão de células e o corante azul tripan a 0.05% em uma diluição de 1:10. O azul tripan é um corante vital que tem a propriedade de corar as células mortas, excluindo-as das células vivas. Esse corante é, portanto, utilizado para avaliar a viabilidade e fazer ao mesmo tempo a contagem das células. Do total

de células recuperadas, os macrófagos encontram-se no lavado broncoalveolar em uma proporção de aproximadamente 95%.

Após a contagem, as células eram ressuspensas em meio de cultura RPMI 1640 contendo soro fetal bovino inativado à 3% e antibióticos (penicilina 100U/ml e estreptomicina 100 μ g/ml).

Para a cultura de macrófagos foram utilizadas placas tipo Falcon, com 6 poços de 35 milímetros de diâmetro cada, onde eram dispensados 1ml da suspensão de células em uma proporção de 10^6 células/ml de meio de cultura em cada poço. Após 1h na incubadora, o sobrenadante da cultura era desprezado e fazia-se uma lavagem do poço com soro fisiológico estéril para retirada de células não aderentes. Imediatamente após, colocava-se 1ml/poço de meio RPMI 1640 sobre a monocamada e deixava-se por mais 1 hora na incubadora para estabilizar os macrófagos.

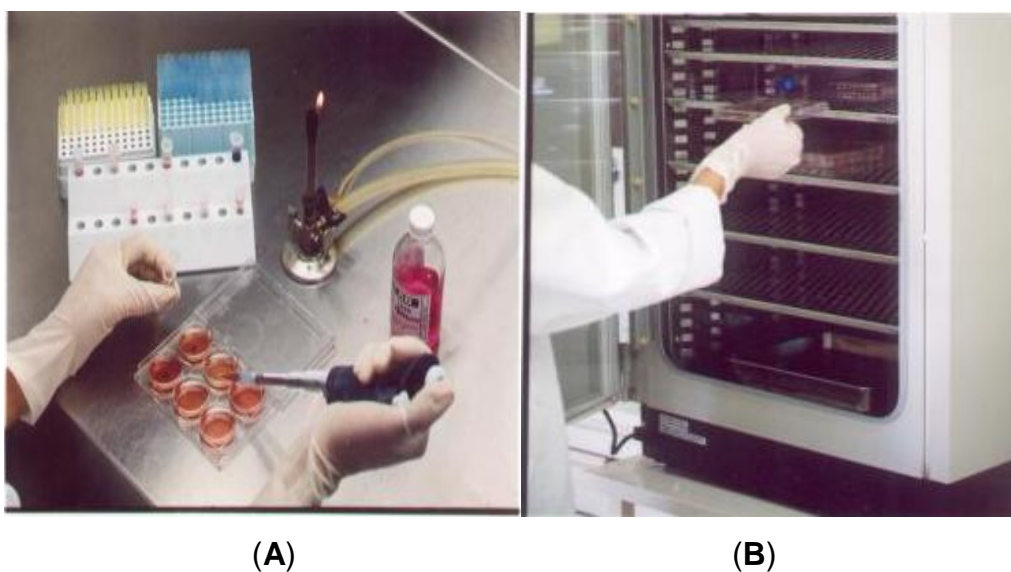


Figura 7 – Procedimento de cultura de macrófagos no fluxo laminar (A) e na Incubadora com CO₂ (B) para estabilização das células.

7.2. Avaliação do índice de aderência dos macrófagos

Para determinar o índice de aderência de macrófagos foi utilizada a técnica descrita por Segura et al,1997. Os macrófagos eram colocados em placas de cultura na quantidade de 1×10^6 células/ml de meio RPMI 1640. Antes de incubar, a cultura era estimulada com 10μ

l/poço de lipopolissacarídeo (LPS, Sigma-Aldrich, SP, Brazil) ou apenas cultura (controle negativo).

Decorrido o período de 1 hora, em incubadora com 5% de CO₂ e a 37°C, o sobrenadante era homogeneizado e uma alíquota de 10 μ l era adicionada a 90 μ l de azul tripan (diluição de 1:10). Assim, a contagem de células era realizada em câmara de Neubauer e o cálculo para o índice de aderência era feito segundo fórmula abaixo:

$$IA = 100 - \frac{\text{células não aderidas/ml}}{\text{n}^\circ \text{ inicial de células/ml}} \times 100$$

7.3. Avaliação da taxa de fagocitose

Em uma suspensão com 1×10^6 de macrófagos adicionava-se a levedura (*Saccharomyces* sp.) previamente contada (1×10^7) para avaliar a taxa de fagocitose. No preparo, a alíquota de levedura foi retirada da placa de crescimento e colocada em 1 ml de PBS em um tubo de ensaio. Contava-se 10^7 fungos para cada 200 μ l de PBS.

A contagem de leveduras era feita em Câmara de Neubauer. Após a contagem, as leveduras eram adicionadas à suspensão de macrófagos que estavam em 800 μ l de RPMI 1640 obtendo-se assim um volume final de 1ml para cada tubo. O conteúdo de cada tubo era homogeneizado, distribuído delicadamente e de maneira uniforme em lâminas para microscopia óptica. Em seguida, as lâminas eram colocadas em uma câmara úmida e em estufa a 37°C por um período de 1 hora. Decorrido esse tempo, as lâminas eram lavadas com PBS para a remoção das células não aderentes e, então, coradas e secas à temperatura ambiente.

Para a coloração foi utilizado o *Kit* Panótico Rápido da Laborclin Ltda. Depois de coradas, as lâminas eram levadas para a leitura em microscópio óptico, lidas com objetiva de 100x sob imersão. A taxa de fagocitose era avaliada a partir da contagem de macrófagos que fagocitaram, isto é, o resultado era dado em percentual de células que fagocitaram as leveduras em uma contagem total de 100 células por lâmina (Malagueno *et al.*, 1998).

7.4. Dosagem de óxido nítrico

A liberação de óxido nítrico foi mensurada indiretamente por método colorimétrico quantitativo baseado na reação de GRIESS (DING *et al.*, 1988).

No presente estudo, alíquotas de 500 μ l em duplicata dos sobrenadantes de cultura que foram incubados à temperatura ambiente por 10 min com 500 μ l de reagente de Griess (sulfanilamida a 1% e naftiletileno 0,1% em ácido

ortofosfórico a 5%). A absorbância foi mensurada a 540nm (UV Spectrophotometer Cary 50 Bio, Varian, INC®).

A concentração de nitrito foi determinada a partir de uma curva padrão construída com nitrito de sódio nas concentrações de 0-100 μ M. Todas as amostras foram avaliadas em relação a um branco correspondente a RPMI 1640 incubado por 24h nas mesmas placas das amostras, mas na ausência de células. Todos os reagentes foram adquiridos na Sigma-Aldrich®, SP, Brasil. Os resultados foram expressos em μ M de nitrito por 5×10^5 células.

7.5. Análise de Citocinas

Dosagem de IL-12

A determinação de IL-12 foi realizada pelo método ELISA (Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay) sandwich, utilizando-se Kit Biosource Rat IL-12 +p40 (Invitrogen Corporation®). Para análise do conteúdo de IL-12 no Lavado Bronco-alveolar (LBA) e no soro dos ratos comparou-se as concentrações obtidas nas amostras com a curva padrão do kit utilizado. A leitura foi realizada em leitor BIO-RAD, em comprimento de onda de 450-620nm.

Dosagem de IFN- γ

A análise foi realizada pela técnica de ELISA (Enzyme Linked-Immuno-Sorbent Assay) sandwich utilizando-se o Kit Quantikine Rat IFN- γ (R&D Systems®).

8.0. Dosagem sérica de Proteína C-reativa

A dosagem de proteína C-reativa (PCR) foi realizada através de um sistema para determinação quantitativa da PCR em amostras de soro por imunoturbidimetria. Esse método baseia-se no princípio de que as partículas de látex estabilizadas e sensibilizadas com anticorpo anti-proteína C-reativa são aglutinadas quando a PCR está presente na amostra. A intensidade da aglutinação, medida em absorvância, é proporcional a quantidade de PCR. Para isso, foi utilizado o kit PCR Turbiquest, Labtest® Diagnóstica S.A. (Lagoa Santa, Brasil). A absorvância foi medida entre o comprimento de onda de 250 a 280nm.

9.0. Análise Histológica do Pulmão

As amostras do pulmão direito foram obtidos após 4 ou 24 horas após o procedimento cirúrgico, fixados em formol a 10% e embebidos em parafina. Slides das amostras de tecido pulmonar foram corados com hematoxilina-eosina (HE). O exame microscópico foi realizado por um patologista independente, cegos para o protocolo experimental, que avaliou a arquitetura pulmonar e observou o grau de inflamação se houvesse. A resposta histológica foi classificado em cinco tipos: Tipo 0 - arquitetura broncoalveolar preservada e ausência ou presença mínima de células inflamatórias; Tipo 1 - hiperplasia reacional do tecido linfóide associado brônquico (BALT); Tipo 2 - leve infiltrado de neutrófilos com alterações inflamatórias agudas inespecíficas; Tipo 3 - moderado infiltrado inflamatório agudo com alterações da arquitetura pulmonar

representado pela destruição parcial da alveolar e / ou paredes brônquicas; e o tipo 4 - infiltração de leucócitos (neutrófilos) intensa com destruição total da arquitetura broncoalveolar e formação de abscesso (Ozturk et al., 2008 – modificado).

10. Peso da gordura retroperitoneal

Para a retirada da gordura retroperitoneal, a cavidade abdominal do animal era aberta expondo vísceras e gordura. O tecido adiposo era retirado separando-se as estruturas adjacentes – epidídimo, ducto deferente e os vasos próximos. Após a retirada do tecido, colocava-se o mesmo em uma placa de petri e seguia-se o protocolo de pesagem.

11. Análise estatística

A análise estatística foi realizada por métodos não paramétricos de Mann-Whitney, para comparação das alterações nos diferentes tempos de sepse; de Wilcoxon para comparação das alterações induzidas pela sepse em um mesmo grupo de ratos. Para isso, foi utilizado o pacote estatístico para computadores pessoais SPSS - Statistical Package for the Social Sciences, versão 13.0. Os resultados foram expressos em média \pm erro padrão e as diferenças com $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes.

RESULTADOS

12. RESULTADOS - 2 ARTIGOS ORIGINAIS

No presente trabalho de tese, foram examinadas as conseqüências da obesidade pela Dieta Hiperlipídica sobre a resposta imune inata, em ratos adultos. Dois artigos científicos originais serão apresentados a seguir em suas versões originais.

ARTIGO ORIGINAL 1**Activity of alveolar macrophages in obese rats submitted to sepsis by cecal ligation and puncture (CLP)****Authors**

Adenilda Queirós Santos ^{a,b*}

Bruno Andrade Galvão ^c

Rosalina Guedes ^a

Vivian Mascarenhas Leal ^b

Edmara Xavier ^b

Ricardo Davi Couto

Célia Maria Machado Barbosa de Castro ^c

Maria José Ramalho ^{a,d}

Author's Institutions

^{*}, ^a Programa de Pós-Graduação em Imunologia - Instituto de Ciências da Saúde/UFBA;

^b Escola de Nutrição/UFBA. Salvador, BA, Brazil

^c Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical – Centro de Ciências da Saúde, UFPE. Recife, PE, Brazil.

^d Departamento de Biorregulação, Instituto de Ciências da Saúde, UFBA.
Salvador, BA, Brazil.

* Corresponding author

Departamento de Ciência da Nutrição, Escola de Nutrição/UFBA. Av. Araújo Pinho,
32, Canela, CEP: 40110-150 Salvador- BA, Brazil. Tel.: +55 71 3283 7700; fax: +55 71
3283 7704. E-mail adress: aqueiros@ufba.br (Adenilda Queirós Santos)

Key-words: obesity, sepsis, macrophages function, nitric oxide.

Abstract

In the present study, the obesity repercussions on macrophages function were analyzed during the sepsis in adult rats. For this, the macrophages function were assays in the bronchoalveolar lavage (BAL) in response to the sepsis (CLP). The obese animals showed high weight, which persisted until 140th days of age. There was no difference neither in the index of adherence among the animals after 4 and 24h of surgery CLP. NO release by AMs from the obese septic group after four hours CLP surgery was higher ($p < 0.05$) compared to normal septic and to the sham operated. The NO analysis performed 24h after the surgery showed that alveolar macrophages from obese rats CLP release greater amounts of NO than the sham operated obese and normal rats CLP. IL-12 seems to act more quickly in the lungs of normal rats and sham-operated septicosis than in obese rats. In conclusion, alterations in the NO production in animals submitted to sepsis were observed only in obesities. The coordinated innate immune response during sepsis seems to protect normal mice within 24 hours of sepsis in order to preserve these important organs for survival.

1. Introduction

Epidemiological studies have demonstrated that obesity is associated with higher morbidity and mortality rates in the general population (Hedlund et al, 1995; Calle et al, 1999; Grady et al, 1999). Obesity is considered as a 'chronic low-grade' inflammatory state, like numerous other associated pathologies such as atherosclerosis, type II diabetes, among others (Zeyda and Stulnig, 2007; Galic et al, 2010). Moreover, the obesity is characterized by a series of physiologic and immunologic changes that may impair the ability to adapt to the stresses of critical illness.

Sepsis is a complex clinical syndrome resulting from the damaging effects of a dysregulated host response to infection, including uncontrolled inflammation and immune suppression (Hotchkiss and Karl, 2003). Bacterial sepsis commences with the initiation of the host's innate immune response to bacterial infection. The Gram-negative bacterial cell wall component, LPS, mediates many of the pathophysiological symptoms of sepsis by inducing the release of TNF- α and IL-1 (Steinhauser et al, 1999).

The cecal ligation and puncture (CLP) model, the complete spectrum of enteric pathogens is present in the septic focus and infective selection is undisturbed. CLP resembles the clinical situation of bowel perforation, with the resulting mixed bacterial infection of intestinal origin and may therefore be the most realistic model of clinical sepsis (Brooks et al, 2007). This technique is easily reproducible and due to peritoneal contamination with a mix of intestinal flora induce peritonitis (Parker and Watkins, 2001). During peritonitis, there is expression of adhesion molecules on the endothelium and cells polymorphonuclear (PMN), initiating transmigration of PMN from the circulation into the abdominal cavity and the lungs. Neutrophils and macrophages are

major effect cells at the frontier of innate immune responses, and they play a critical role in host defense against invading microorganisms (Guo et al, 2006).

The lung has a large area exposed to external agents such as toxic substances and bacteria, thus becomes one of the most affected organs during sepsis. In the lung, the alveolar macrophages are avidly phagocytic and readily kill ingested organisms (Calder, 2007). In the presence of a strange stimulus, the macrophage becomes activated and can respond to the stimulus in three different ways: the phagocytosing foreign element, thanks to a system of lysosomal enzymes, eliminating the interstitial fluid, when assisted by lymphocytes T or releasing a broad spectrum of mediators, including reactive oxygen species and nitrogen as well as hydrolytic enzymes, bioactive lipids and cytokines (Gordon, 2003). The respiratory tract, frequently exposed to organisms and particles in the air, defends himself from possible harmful effects by mechanisms microbicides, with and without phagocytosis, made by alveolar macrophages. (AM) (Reynolds, 2005).

The participation of innate immunity occurs through phagocyte cells, the activation of a complement system through an alternative path and by production of chemokines and cytokines. In addition, C-reactive protein (CRP), an acute phase protein produced mainly by hepatic cells in bacterial infections, exerts a diversified range of action against the bacteria. When binding to phospholipids of the membrane of some bacteria (for example, pneumococcus) CRP works like opsonin, facilitating the phagocytosis by neutrophils. CRP also has the capacity to activate the complementary system and stimulates the synthesis of TNF alpha, which induces the synthesis of NO and consequently the destruction of various microorganisms.

Activated alveolar macrophages and other cells of the lung are involved in the progression of inflammatory lung diseases (Sibille and Reynolds, 1990). This cell type also differs from peritoneal macrophages with regard to their ability to release tumour necrosis factor-alpha (TNF), interleukin-6 (IL-6), nitric oxide (NO) or reactive oxygen species (ROS). NO may induce toxic reactions against other tissues of the host and because it is generated at high levels in certain types of inflammation (Albina & Reichner, 1995; Evans, 1995; Wong & Billiar, 1995; Rothe & Kolb, 1999)

As obese patients have higher risk for infections, the question is whether they are also at increased risk for sepsis. In this context, more research is needed to clarify the clinical implications of the alterations induced by obesity on the immune function. This study aimed to evaluate some functions of alveolar macrophages as an index of cell adhesion, phagocytic capacity as well as production of nitric oxide and cytokines in obese rats.

2. Materials and Methods

2.1. Animals and Experimental Groups

Male wistar rats were used. Rats were kept at a temperature of $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ in a 12 hour light-dark cycle. After birth, the neonates were randomly distributed to litters of 6 pups per dam. The experimental groups were based on the diet after suckling. Control group was fed a 22% protein diet (NUVILAB – Nuvital Nutrientes S/A, Brazil). The composition of Nuvilab is given in table 1. The obese group was fed a High Fat Diet

(HF) starting after suckling (22 days). The HF consists of foods constitute the basic meals of cafeteria (Estadella, 2004) and the composition is given in table 2. This diet has 17% protein and a high fat content (23%) leading to the great weight gain reproducing obesity. All rats received these diets during experiment of the 20 weeks. On the 140th days of life, sepsis was induced by Cecal Ligation and Puncture (CLP) (Wichterman *et al*, 1980). The Federal University of Bahia Committee of Ethics in Animal Experimentation - (CEEA/UFBA) approved this study, which has followed the Brazilian School of Animal Experimentation established norms (COBEA).

2.2. Body Weight and Abdominal Fat

The weight of all animals was measured on alternate days of the first day of life until the end of the lactation period (21 days). After, the body weight of the animals was checked on the 22th, 30th, 45th, 60th, 90th and 140th days of life, using a FILIZOLA, model MF-3 with 3000g capacity. Abdominal fat was collected after the experimentation. There was an incision in the abdomen and all organs of this site were removed and the fat separate for later weighting.

2.3. Induction of sepsis by CLP

Sepsis was induced through cecal ligation and puncture (CLP) in rats (Wichterman *et al*, 1980). The rats were anesthetized with urethane 14%. The abdominal skin was disinfected with alcohol 70%. The abdominal cavity was opened with a midline laparotomy, which was made using small dissection and the cecum was ligated below the valve ileocaecal with silk 2-0, maintaining the intestinal continuity.

The cecum was then subjected to a single ‘through and through’ perforation with a sterile 18 gauge needle and gently compressed until its contents began to exude. The bowel was then returned to the abdomen and the incision was closed.

2.4. Total and differential leukocytes counting in blood

The extremity of the tail of an anesthetized animal was cut using a scalpel and 0.2 mL of blood was collected. The blood was picked in glass tubes previously added of 3% EDTA. The total leukocyte’s counting was done in a Neubauer counting chamber. The differential counting was done starting from blood smear slides. The slides were fixed, stained (Kit Panótico Rápido LB – Laborclin Ltda®), and examined using a light microscope equipped with an immersion lens. The different types of white globules were quantified by an electronic counter.

2.5. Bronchoalveolar lavage fluid (BAL)

The Bronchoalveolar lavage fluid was carried out according to techniques used by De Castro et al. (2000). The animals were anesthetized with urethane 14% in the proportion of 1ml /100g i.p. BALs were performed by using 0.9% NaCl injected at room temperature through a plastic cannula inserted into the trachea. Several aliquots of 5 ml were injected and collected into a 15 ml conical polypropylene tube (Falcon, Sigma). The recovery of BAL was of approximately 30 ml for each animal.

2.6. Culture of alveolar macrophages

Alveolar macrophages were cultured as previously described in De Castro et al., 2000. The cells were resuspended in RPMI-1640 medium (Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Sigma). Alveolar macrophages (5×10^5 /well) were plated on culture plates (Costar, Cambridge, MA) and allowed to adhere for 2 h at 37 °C in 5% CO₂. Non-adhering cells were removed by gentle washing with 0.9% NaCl, and 1 ml of fresh media was added for further cell culture. Adherent alveolar macrophages were incubated with water (negative control, \emptyset), or with 10 µl/well lipopolysaccharide (LPS, Sigma). After 24 h of LPS incubation, culture supernatants were collected and the NO assay was performed.

2.7. Adherence Index (AI) Assay

To determine the rate of adherence of macrophages we used the technique described by Segura et al, 1997. The macrophages were placed in culture dishes in the amount of 1×10^6 cells / ml RPMI 1640. Before hatching, the culture was stimulated with 10 µl/well of lipopolysaccharide (LPS, Sigma-Aldrich, SP, Brazil) or culture only (negative control). At the end of 1 hour in an incubator with 5% CO₂ and 37 ° C, the supernatant was homogenized and an aliquot of 10µl was added to 90 ml of trypan blue (1:10 dilution). Thus, the cell count was performed in a Neubauer chamber and calculating the rate of adherence was made according to the formula below:

$$\text{A.I.} = 100 - \frac{\text{Non-adherent macrophages/ml}}{\text{Initial macrophages/ml}} \times 100$$

2.8 Phagocytosis Capacity

The entire procedure was performed in a laminar flow hood in order to maintain the aseptic environment by avoiding contamination of cell cultures. In a suspension of 1×10^6 macrophages they added the yeast (*Saccharomyces* sp.) previously added (1×10^7) to assess the rate of phagocytosis.

In preparation, the aliquot of yeast was removed from the growth plate and placed in 1 ml of PBS in a test tube. It was counted 10^7 fungi for every 200 μ l of PBS. The yeast count was done in Newbauer chamber. After counting, the yeasts were added to the suspension of macrophages that were in 800 μ l of RPMI 1640 resulting in a final volume of 1 ml for each tube. The contents of each tube were homogenized and distributed evenly and gently on slides for microscopy. Then, the slides were placed in a moist chamber and incubated at 37°C for 1 hour. After this time, the slides were washed with PBS to remove non-adherent cells and then stained and dried at room temperature.

For staining kit was used Panoptic Quick Laborclin Ltda. After staining, the slides were taken for examination under optical microscope, read with a 100x objective under immersion. The rate of phagocytosis was evaluated by counting macrophages that phagocytosed and the result was given in percentage of cells that phagocytosed yeast in a total count of 100 cells per slide (Malagueno et al., 1998).

2.8. Nitric oxide (NO) assay

NO release was measured indirectly using a quantitative, colorimetric assay based on the Griess reaction (Ding et al., 1988). In the present study, triplicate 500 μ l aliquots of cell culture supernatants were incubated with 500 μ l of freshly prepared Griess

reagent (1% sulfanilamide, 0.1% naphthylethylene diamide dihydrochloride and 5% ortho-phosphoric acid) at room temperature for 10 min. The absorbance of the azochromophore was measured at 540 nm (UV Spectrophotometer Cary 50 Bio, Varian, INC®).

The nitrite concentration was determined using sodium nitrite as a standard (0–100 μM). All samples were assayed against a blank comprising complete RPMI-1640 incubated for 24 h in the same plates as the samples, but in the absence of cells. All reagents were purchased from Sigma Chemical Company, St. Louis, MO. The results were expressed in micromoles nitrite per 5×10^5 macrophages.

2.10. Cytokine assays in the culture of alveolar macrophages

IFN γ and Il-12 were determined by a double-ligand ELISA (R&D Systems and BIOSOURCE) according to manufacturers' instruction. Results are expressed as picograms per milliliter of duplicate assays.

2.11. Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm SEM and were analyzed by the nonparametric Mann-Whitney test to determine the significance of differences two groups, and by the Wilcoxon test for comparisons of sepsis-induced in each group of rats, with the level of significance set at 5%. A computer statistics package was used for statistical analyses (SPSS, version 13.0).

3. Results

3.1. Body Weight

At birth, the body weights of animals in both groups were similar. However, From the beginning of administration of diets until 20 weeks thereafter, the body weight of animals that received high-fat diet, showed significant increase as compared with those fed with the standard diet (Control = 431.5 ± 7.81 g and Obese = 472.5 ± 6.96 g), ($p < 0.05$) (figure 1). Abdominal fat of the group fed with high-fat diet was higher than group fed standard diet (SD= 8.42 ± 5.42 g; HF= 21.77 ± 9.71 g), $p = 0.000$.

3.2. Adherence Index Assay

In comparing all groups, there was no observable difference in the adherence index after four hours of CLP surgery (Figure 2). As there was no difference in adherence index after twenty-four hours of CLP surgery (Figure 3).

3.3. Phagocytosis Capacity

There was no observable difference in the phagocytic capacity after four hours of CLP surgery (Figure 4). However, when evaluating the rate of phagocytosis after twenty-four hours after CLP surgery, the normal septic group had a higher rate of phagocytosis ($p=0.03$) in the relationship normal sham group. (figure 5).

3.4. Nitric oxide (NO) assay

NO release by AMs from the obese septic group after four hours CLP surgery was higher ($p < 0.05$) compared to normal septic and to the sham operated (figure 6).

The NO analysis performed 24h after the surgery showed that alveolar macrophages from obese rats CLP release greater amounts of NO than the sham operated obese and normal rats CLP (figure 7).

3.5. Cytokine assays in the culture of alveolar macrophages

We examined the role of IFN γ and IL-12 in the outcome of polymicrobial septic induced by CLP. We did not observe IFN- γ production by alveolar macrophages in all groups.

The dosage of IL-12 was performed in BAL 24 hours after surgery (CLP) and serum was determined before and after 24 hours of surgery. Found in BAL increased amount of IL-12 in normal sham-operated group compared to sham-operated obese ($p = 0.03$); but the sham-operated obese group showed lower production of IL-12 than the obese group CLP. The obese CLP group had higher production of IL-12 than the normal group CLP.

When the assessment was conducted in the serum of rats obtained the following results: normal sham-operated rats showed lower basal IL-12 than the obese sham-operated. The sham-operated obese rats produced more IL-12 than normal sham-

operated after 24 hours. However, when comparing obese and normal 24 hours after surgery (CLP) found no difference.

4. Discussion

Excess body weight has long been recognised as a harbinger of disease and early death in the general population (McGee, 2005). Diet-induced obese animals are considered a more comparable model for human obesity than genetically obese animals (Uysal et al., 1997). The weight gain with high fat diets has been controversial in last studies. In this study showed significant increase in weight gain and in central adiposity when compared with those fed with the standard diet showing an important contribution of the hyperlipidic diet to this result.

Obesity has been associated with immune dysfunction. Some authors report alterations of the immune response in obese subjects as T helper lymphopenia and lower mitogenic response of splenocytes in diet-induced (cafeteria) rats (Lamas et al., 2002). Multiple mechanisms including secretion of pro-inflammatory adipokines, increased secretion of various cytokines, activation of macrophages and oxidative stress along with increased insulin resistance act together to produce a milieu that leads to endothelial dysfunction in obesity. When exposed to an acute inflammatory insult these tissues are more vulnerable to tissue injury via exaggerated inflammation (Singer and Granger, 2007; Ronti et al., 2006). This study showed that the index of adhesion of alveolar macrophages from normal and obese rats was similar, there was no prejudice in the adhesion of these cells after 4h and 24h of surgery (CLP).

Macrophages are recognized for their role in protecting the body against invasion by foreign antigens. These cells can migrate into the interstitium of the focus of reaction after adhering to endothelial cells (Calder, 2007). Another important function was evaluated in this study the phagocytic capacity of alveolar macrophages from normal and obese rats after surgery (CLP). In this study, we found no changes in alveolar macrophages phagocytic capacity of normal and obese rats four hours after CLP surgery performed. On the other hand, when we evaluated the phagocytosis of these cells in the same groups after twenty-four hours of surgery, we found a higher phagocytic capacity in normal animals after CLP when compared to the sham-operated demonstrating a more effective response against the aggressors. The obese rats do not exhibit alterations in their phagocytic capacity.

Chronic inflammation and progressive damage to normal tissues is characteristic of chronic obstructive pulmonary diseases and may be due in part to reactive oxygen and nitrogen species released by activated macrophages alveolares (AM) (Morgan and Shines, 2004). Many mediators released by AM are directed at specific target cell receptors and cause a controlled change in cell function. However, mediators such as reactive oxygen and nitrogen species are nonspecific in their action and cause injury to surrounding normal lung cells. Oxidants that are generated in excess of antioxidant defenses or that are lacking in antioxidant defenses can result in severe pulmonary inflammation (Chabot et al., 1998). Nitric oxide (NO) released by activated alveolar macrophages can mediate effects on target cells. In this study we evaluated the release of NO in normal and obese rats subjected to sepsis by CLP, and found high amounts of NO produced by alveolar macrophages from obese rats in the first 24 hours after CLP surgery.

Systemic inflammatory response is considered a central deleterious pathogenic event in severe sepsis. High levels of serum inflammatory cytokines are involved in development of multiple organ failure and cardiovascular collapse (Bone et al., 1997; Zimecki et al., 2004). The pathobiology of IFN- γ in clinically relevant models of septic shock, such as CLP, is not well understood. Romero et al. (2010) demonstrated that after CLP, concentrations of IFN- γ in plasma and peritoneal lavage fluid were low in comparison with concentrations of other cytokines. In this study we found no IFN- γ production after 4 and 24 hours of surgery CLP in all groups. Some authors report that IFN- γ may have a modulatory role during sepsis by CLP. The presence of IFN- γ stimulates macrophages to release a protein (HMGB1) released after 16 hours of sepsis and is associated with high mortality of septic individuals (Pahuja et al., 2008).

IL-12 has been widely accepted as an important regulator of T-helper 1 cell (Th1) responses and is predominately produced by dendritic cells (DCs), monocytes, and macrophages (Gately et al., 1998). IL-12 seems to act more quickly in the lungs of normal rats and sham-operated septic rats than in obese rats. This fact occurred in this work.

In conclusion, alterations in the NO production in animals submitted to sepsis were observed only in obese rats. The coordinated innate immune response during sepsis seems to protect normal rats within 24 hours of sepsis in order to preserve these important organs for survival.

Acknowledgements

This work was supported by Foundation for Research of the State of Bahia (FAPESB–BAHIA-BRAZIL) and Coordination of Development of Senior Staff (CAPES-BRAZIL).

5. References

1. De Castro CM, Manhães-de-Catro R, Fernandes de Medeiros A, Queirós-Santos A, Ferreira-e-Silva WT, Lima-Filho, JL. Effect of stress on the production of O_2^- in alveolar macrophages. *J Neuroimmunol*, 108(1-2):68-72, 2000.
2. Hedlund J, Hansson LO, Ortqvist A. Short- and long-term prognosis for middle-aged and elderly patients hospitalized with community-acquired pneumonia: impact of nutritional and inflammatory factors. *Scand J Infect Dis*, 27: 32–37, 1995.
3. Calle EE, Thun MJ, Petrelli JM, Rodriguez C, Heath CW Jr. Body-mass index and mortality in a prospective cohort of U.S. adults. *N Engl J Med*, 341:1097–1105, 1999.
4. Grady KL, White-Williams C, Naftel D, Costanzo MR, Pitts D, Rayburn B, VanBakel A, Jaski B, Bourge R, Kirklin J. Are preoperative obesity and cachexia risk factors for postheart transplant morbidity and mortality: a multi-

- institutional study of preoperative weight–height indices. Cardiac Transplant Research Database (CTRD) Group. *J Heart Lung Transplant*, 18:750–763, 1999.
5. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH: Sepsis and septic shock: a review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* 29:189–201, 1980.
 6. Segura, JJ; Llamas, R; Rubio-Manzanares, AJ; Jimenez-Planas, A; Guerrero, JM; Calvo, JR. Calcium Hydroxide Inhibits Substrate Adherence Capacity of Macrophages. *Journal of Endodontics*, 23(7): 444-447, 1997.
 7. Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol*, 141(7):2407-12, 1988.
 8. Malagueño, E; Albuquerque, C; De Castro, CM; Gadelha, M; Irmão, JI; Santana, JV. Effect of *Biomphalaria straminea* plasma in the phagocytosis of *Biomphalaria glabrata* hemolymph cells. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 93 (Suppl 1):301-2, 1998.
 9. Zeyda, M; Stulnig, TM. Adipose tissue macrophages, *Immunology Letters*, 112: 61–67, 2007.
 10. Galica, S; Oakhilla, JS; Steinberg, GR. Adipose tissue as an endocrine organ. *Molecular and Cellular Endocrinology* 316:129–139, 2010.

11. Hotchkiss, RS; Karl, IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med* 348(2):138–50, 2003.
12. Steinhauser, ML; Hogaboam, CM; Lukacs, NW; Strieter, RM; Kunkel, SL. Multiple roles for IL-12 in a model of acute septic peritonitis. *The Journal of Immunology*, 1999, 162: 5437–5443.
13. Guo, RF; Riedemann, NC, Sun, L; Gao, H; Shi, KX; Reuben, JS; Sarma, VJ; Zetoune, FS; Ward, PA. Divergent Signaling Pathways in Phagocytic Cells during Sepsis. *The Journal of Immunology*, 177:1306–1313, 2006.
14. Brooks, HF; Osabutey, CK; Moss, RF; Andrews, PLR; Davies, DC. Caecal ligation and puncture in the rat mimics the pathophysiological changes in human sepsis and causes multi-organ dysfunction, *Metab Brain Dis*, 22:353–373, 2007.
15. Reynolds, HY. Lung inflammation and fibrosis. An alveolar macrophage-centered perspective from the 1970s to 1980s. *Am J Respir Crit Care Med*, 171:98-102, 2005.
16. Parker, SJ; Watkins, PE. Experimental models of gram-negative sepsis. *Br J Surg*, 88:22-30, 2001.
17. Calder, PC. Immunological Parameters: What Do They Mean? *J. Nutr.* 137: 773S–780S, 2007.

18. Sibille, Y, Reynolds, HY. Macrophages and polymorphonuclear neutrophils in lung defense and injury. *American Review of Respiratory Disease*, 141:471–501, 1990.
19. Albina JE and Reichner JS. Nitric oxide in inflammation and immunity. *New Hori.*, 3: 46–64, 1995.
20. Evans, CH. Nitric Oxide: what role does it play in inflammation and tissue destruction? *Agents Actions Suppl.*, 47:107–116, 1995.
21. Wong, JM and Billiar, TR. Regulation and function of inducible nitric oxide synthase during sepsis and acute inflammation. *Adv Pharma.*, 34:155–170, 1995.
22. Rothe, H and Kolb, H. Strategies of protection from nitric oxide toxicity in islets inflammation. *J Mol Med.*, 77: 40–44, 1999.
23. McGee, DL. Body mass index and mortality: a meta-analysis based on person-level data from twenty-six observational studies. *Ann Epidemiol*, 15:87–97, 2005.
24. Uysal KT, Wiesbrock SM, Marino MW, Hotamisligil GS. Protection from obesity-induced insulin resistance in mice lacking TNF- α function. *Nature* 1997;389:610–4.

25. Lamas O, Martinez JA, Marti A. T helper lymphopenia and decreased mitogenic response in cafeteria diet-induced obese rats. *Nutr Res.*, 22:496–507, 2002.
26. G. Singer, D.N. Granger, Inflammatory responses underlying the microvascular dysfunction associated with obesity and insulin resistance, *Microcirculation*. 14 375–387, 2007.
27. T. Ronti, G. Lupattelli, E. Mannarino, The endocrine function of adipose tissue: an update, *Clin. Endocrinol.* 64:355– 365, 2006.
28. Chabot F, Mitchell JA, Gutteridge JM, and Evans TW. Reactive oxygen species in acute lung injury. *Eur Respir J*, 11:745–757, 1998.
29. Bone, RC; Grodzin, C J;Balk, RA. Sepsis: a new hypothesis for pathogenesis of the disease process. *Chest*, 112: 235–243, 1997.
30. Zimecki, M., J. Artym, G. Chodaczek, M. Kocieba, and M. L. Kruzel. Protective effects of lactoferrin in *Escherichia coli*-induced bacteremia in mice: relationship to reduced serum TNF α level and increased turnover of neutrophils. *Inflamm. Res.*, 53: 292–296, 2004.
31. Romero CR, Herzig DS, Etogo A, Nunez J, Mahmoudizad R, Fang G, Murphey ED, Toliver-Kinsky T, Sherwood ER. The role of interferon- γ in the pathogenesis of acute intra-abdominal sepsis. *J Leukoc Biol.*, 88(4):725-35, 2010.

32. Gately MK, et al. The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol* 1998;16:495–521.
33. Pahuja, M; Tran, C; Wang, H; Yin, K. Alveolar Macrophage Suppression in Sepsis Is Associated With High Mobility Group Box 1 Transmigration. *Shock*, 29(6):754-760, 2008.

Figure 1. *Body weight of rats normals and obeses*

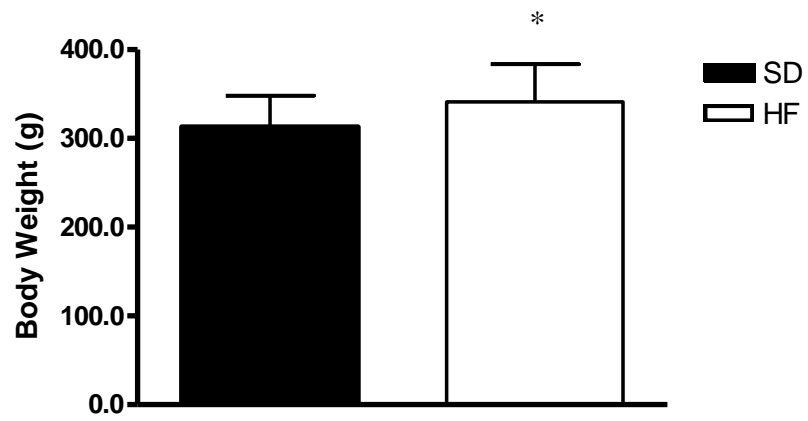


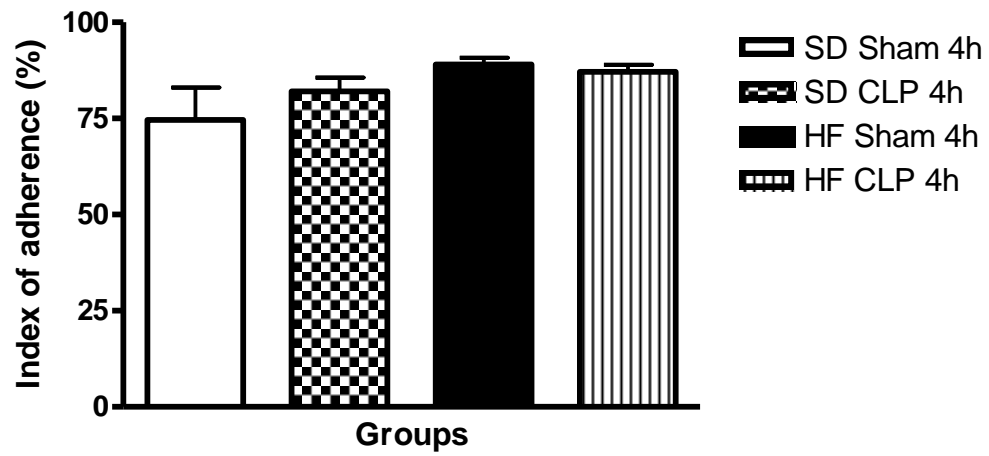
Figure 2. *Index of Adherence 4 hours post CLP*

Figure 3. Index of Adherence 24 hours post CLP

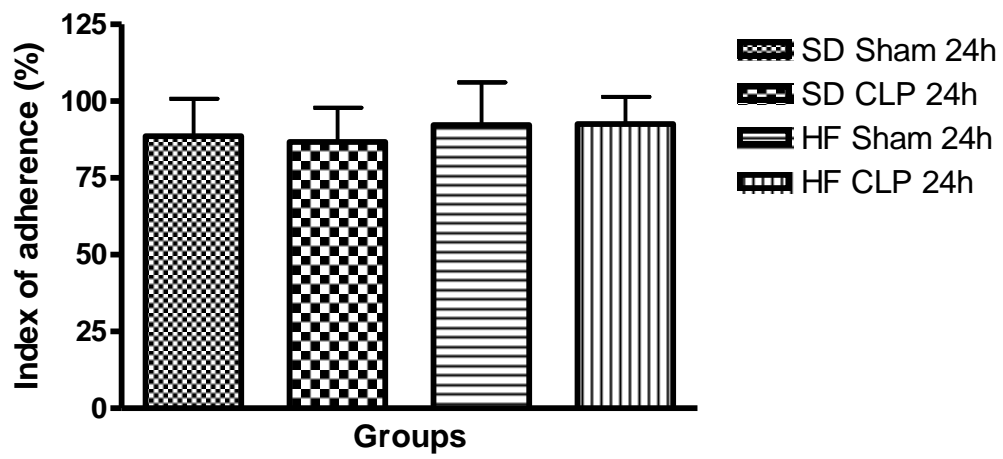


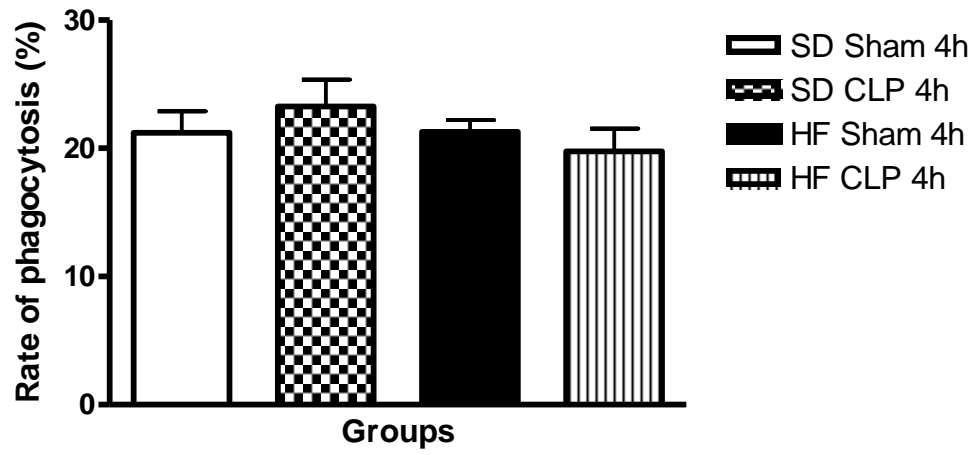
Figure 4. *Rate of Phagocytosis 4 hours post CLP*

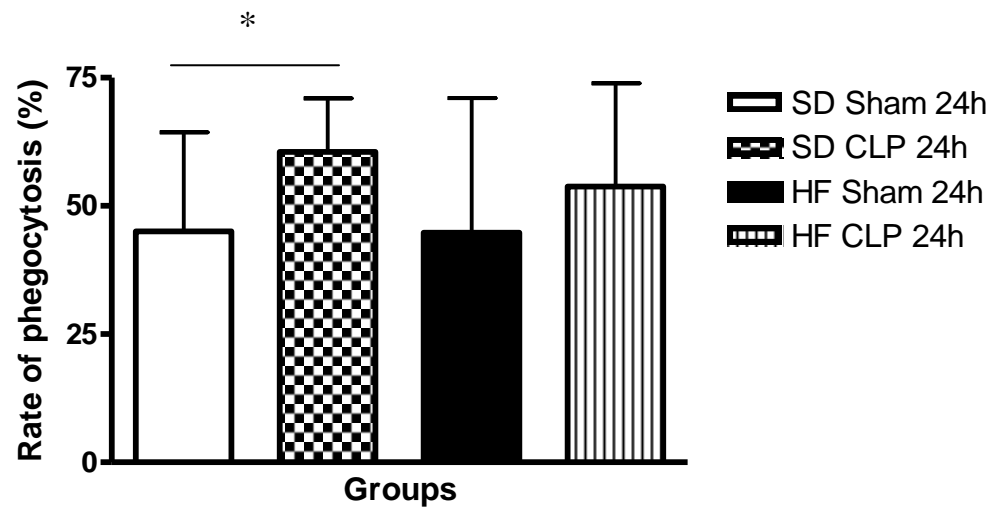
Figure 5. *Rate of Phagocytosis 24 hours CLP*

Figure 6. Nitric oxide assay after 4 hours sepsis (CLP)

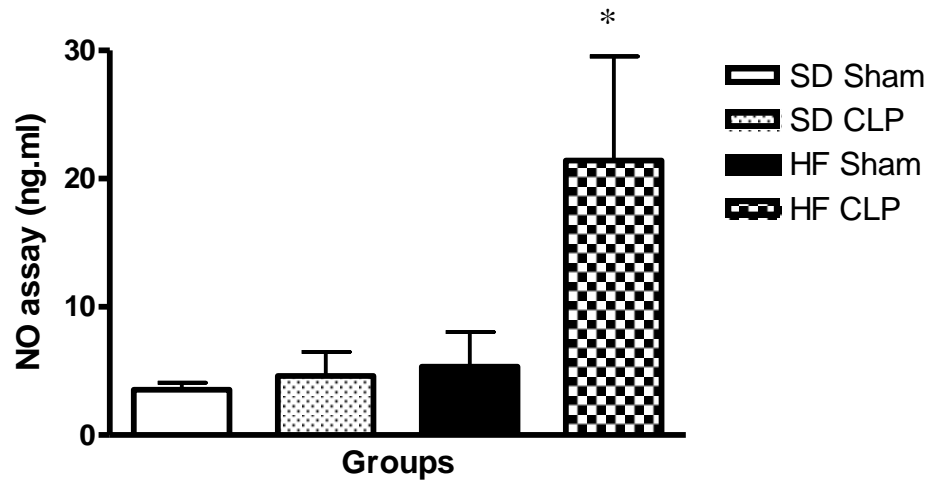


Figure 7. Nitric oxide assay after 24 hours sepsis (CLP)

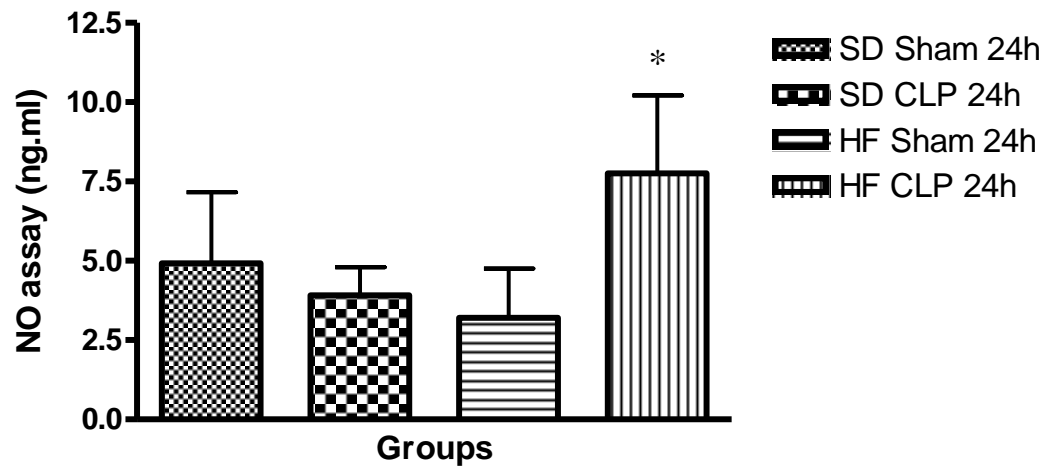


Figure 8. Cytokines Assay in BAL (24h)

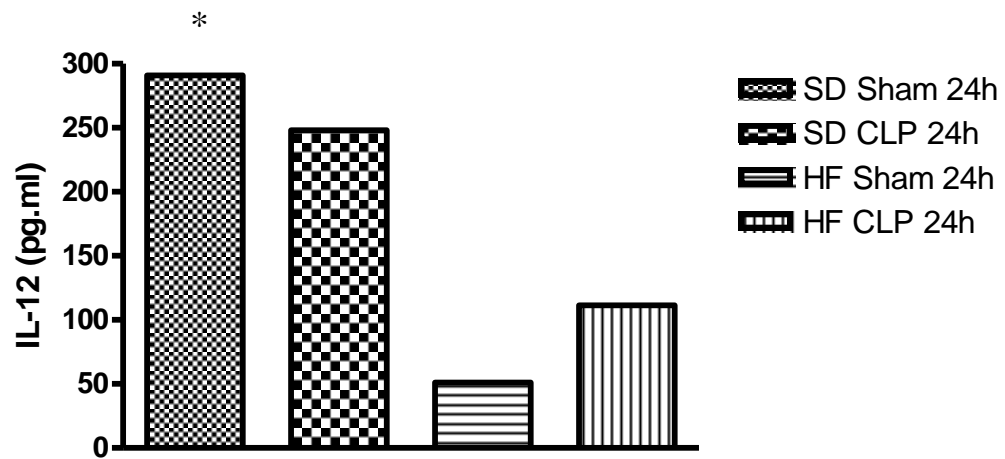
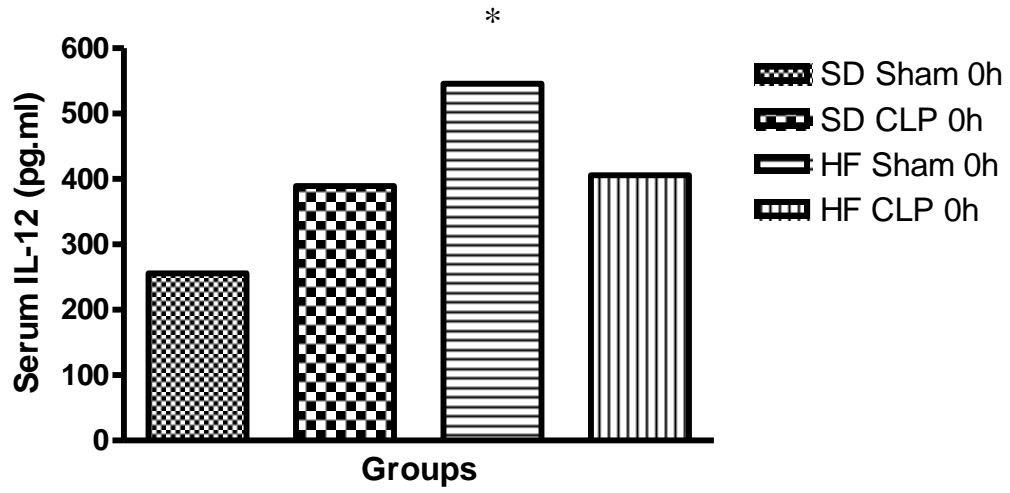
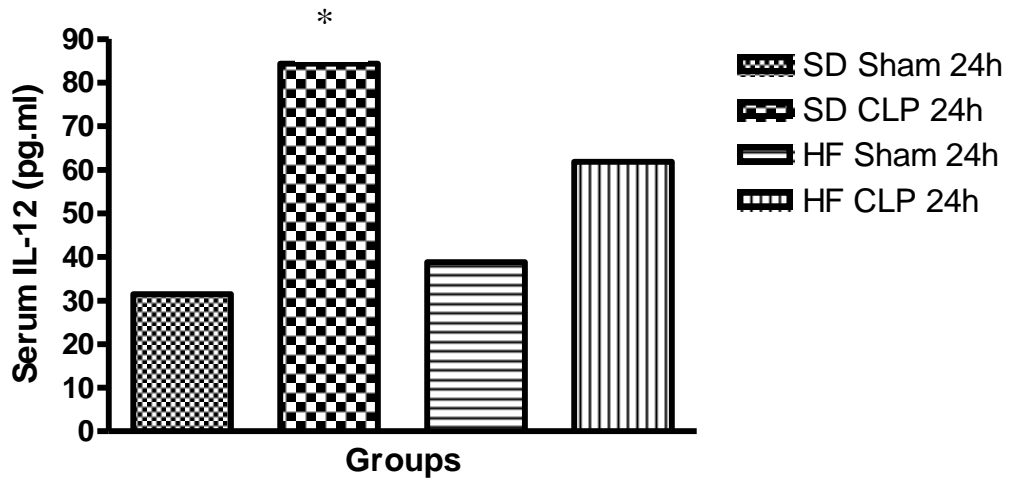


Figure 9. Cytokines Assay in Serum (0 e 24h)

A)



B)



Legends for the figures

Figure 1. Body weight of rats fed with High Fat (HF) or Standard Diet (SD) for twenty weeks. Data are expressed as means \pm SE, n=33 (SD) and n=39 (HF). Mann-Whitney *U* test were used to compare single groups. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Figure 2. The Adherence index of alveolar macrophages rats fed with High Fat (HF) or Standard Diet (SD) for twenty weeks and submitting sepsis induced-CLP for 4 hours. Data are expressed as means \pm SE. Mann-Whitney *U* test were used to compare single groups. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Figure 3. The Adherence index of alveolar macrophages rats fed with High Fat (HF) or Standard Diet (SD) for twenty weeks and submitting sepsis induced-CLP for 24 hours. Data are expressed as means \pm SE. Mann-Whitney *U* test were used to compare single groups. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Figure 4. The Rate of Phagocytosis of alveolar macrophages rats fed with High Fat (HF) or Standard Diet (SD) for twenty weeks and submitting sepsis induced-CLP for 4 hours. Data are expressed as means \pm SE. Mann-Whitney *U* test were used to compare single groups. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Figure 5. The Rate of Phagocytosis of alveolar macrophages rats fed with High Fat (HF) or Standard Diet (SD) for twenty weeks and submitting sepsis induced-CLP for 24 hours. Data are expressed as means \pm SE. Mann-Whitney *U* test were used to compare single groups. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Figure 6. CLP induces NO production. CLP or sham surgeries were performed. Bronchoalveolar lavage (BAL) collected at 4 h after surgery. NO concentrations were evaluated by GRIESS. Experimental $n = 7-8$ per group.

Figure 7. CLP induces NO production. CLP or sham surgeries were performed. Bronchoalveolar lavage (BAL) collected at 24 h after surgery. NO concentrations were evaluated by GRIESS. Experimental $n = 7-8$ per group.

Figure 8. CLP induces IL-12 production. CLP or sham surgeries were performed. Bronchoalveolar lavage (BAL) collected at 24 h after surgery. IL-12 concentrations were evaluated by ELISA. Experimental $n = 6-8$ per group.

Figure 9. CLP induces IL-12 production. CLP or sham surgeries were performed. Serum samples were collected at 0h (A) and 24 h (B) after surgery. IL-12 concentrations were evaluated by ELISA. Experimental $n = 6-8$ per group.

ARTIGO ORIGINAL 2**Lung health of obese rats is endangered by CPL-induced sepsis****Authors**

Adenilda Queirós Santos ^a

Victor Luiz Correia Nunes ^b

Paula Regina Moreira ^c

Gabriela Jesus Prado ^d

Yanna Silva Matos ^d

Célia Maria Machado Barbosa de Castro ^e

Maria José Ramalho ^{f,*}

Author's Institutions

^a Programa de Pós-Graduação em Imunologia - Instituto de Ciências da Saúde/UFBA;

^b Programa de Pós-Graduação em Patologia Clínica – FioCruz/Bahia, Brazil.

^c Mestre em Imunologia pelo PPGIm-UFBA, Hospital Espanhol.

^d Escola de Nutrição/UFBA. Salvador, BA, Brazil.

^e Departamento de Medicina Tropical, Centro de Ciências da Saúde, UFPE. Recife, PE, Brazil

^{*, f} Departamento de Biorregulação, Instituto de Ciências da Saúde, UFBA. Salvador, BA, Brazil.

Running title: Influence of consumption of hyperlipidic diet on lung injury in septic rats.

*** Corresponding author**

Departamento de Biorregulação, Instituto de Ciências da Saúde/ UFBA, Av. Reitor Miguel Calmon, s/n - Vale do Canela, CEP: 40110-902 Salvador- BA, Brazil. Tel.: +55 71 3283 8909; fax: +55 71 3283 8894.

E-mail adress: mariajos@ufba.br (Maria José P. Ramalho)

Abstract

The purpose of our study was to determine whether a high-fat diet (HF) would increase lung inflammation and decrease macrophages alveolar function in male obese rats submitted sepsis. Control group was fed a 22% protein diet (SD). The obese group was fed a High Fat Diet (HF) with 17% protein and 23% fat starting after weaning during 20 weeks. On the 140th day of life, sepsis was induced by Cecal Ligation and Puncture (CLP). The body weight, as well abdominal fat of rats that received high-fat diet, showed significant increase when compared to those fed with the standard diet. In this study, CLP induced sepsis resulted in a significant elevation white blood cell counts compared to sham CLP rats after four hours sepsis. A similar response occurred after 24 h of surgery. In both times of induction of sepsis was also observed neutrophilia and lymphopenia. When comparing the groups after 4 e 24 hours of sepsis found no difference between them. Thus, obesity does not appear to have influenced the levels of c-reactive protein in this model of sepsis. The findings in rat lungs after 4 hours of sepsis did not change, but the analysis of rat lungs after 24 h showed that this organ is seriously affected in obese rats septic. This finding is of great relevance to the health of obese individuals, since studies have shown high morbidity and mortality in this situation.

Key-words: obesity, leukocytes, C-reactive protein, lung lesion.

1. Introduction

Obesity is a worldwide concern and is the major cause of morbimortality in the world. WHO further projects that by 2015, approximately 2.3 billion adults will be overweight and more than 700 million will be obese. In a multinational European study (SOAP trial) 36% of intensive care unit (ICU) patients were overweight and 18% were obese or very obese (Sakr et al., 2008). Thus obesity is also of increasing relevance in intensive care medicine and therefore several specific issues concerning morbidity and care of obese patients need to be mentioned.

Overweight and obesity are defined as abnormal or excessive fat accumulation that presents a risk to health (WHO, 2006). Several studies in genetic animal models suggest that obesity and being overweight are associated with immunocompetence alterations (Tanaka Si Isoda et al., 1998; Hotamisligil and Erbay, 2008). Already in 1980, Chandra and Kutty, have found that 38% of obese children and adolescents showed a variable impairment of cell-mediated immune responses such as delayed cutaneous hypersensitivity, abnormal lymphoproliferative responses to mitogens and a reduction in intracellular bacterial killing capacity by polymorphonuclear leucocytes. Now, considering that obesity may be seen as a chronic inflammatory state one can imagine that obese patients might respond to sepsis differently than patients with normal Body Mass Index (BMI) (Vachharajani, 2008; Vachharajani and Vital, 2006). In this respect it is necessary to recognize that adipose tissue is not only a passive reservoir of energy and lipid soluble nutrients but an active metabolic and endocrine organ (Hauner, 2005).

Sepsis is characterized by the interplay of host responses to the invasion of pathogen in the form of activation of endothelial cells and monocytes and activation of inflammatory and coagulation pathways. This response to the pathogen is associated with collateral damage to the individual normal tissues. (Vachharajani and Vital, 2006). Sepsis induces lung inflammation with alveolar recruitment of inflammatory cells such as neutrophils and monocytes/macrophages (Chignard and Balloy, 2000). Roles of neutrophils and monocytes/macrophages recruited into the alveoli in sepsis-induced lung injury have been addressed by various studies (Ellaban et al., 2004; Lomas-Neira et al., 2006, Venet et al., 2009).

The lung is a potential site for infection and is the major organ identified to fail in sepsis. Because the extensive alveolar–capillary interface, provides exposure to large quantities of air, which normally are sterile, but may contain potentially infectious agents (Tsai and Grayson, 2008). Its large vascular network encourages the development of remote-borne infections due to rupture of the alveolar-capillary leading to endothelial dysfunction and interstitial or epithelial damage. The first line of lung defense is the innate immune system, which includes structural defenses and recruitment of antimicrobial molecules, alveolar macrophages, neutrophils, natural killer cells, and dendritic cells (Bals and Hiemstra, 2004). In intensive care units, a major complication in septic patients is impaired respiration, often leading to adult respiratory distress syndrome and onset of multiple organ failure. (Moore et al., 1993; Czermak et al, 1999; Del Sorbo and Slutsky, 2010). There is a gap in understanding the pulmonary events that follow CLP-sepsis in obese rats. This study examined the consequences of the obesity on body weight gain, abdominal adiposity, levels C-reactive protein and leukocytary and pulmonary pattern of septic rats.

2. Materials and Methods

2.1. *Animals and Experimental Groups*

Male Wistar rats were housed under a temperature of $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ in a 12 hour light-dark cycle. After birth, the neonates were randomly distributed to litters of 6 pups per dam. The experimental groups were based on the diet offer after weaning. Control groups were fed with a rat chow diet (22% protein diet and 4% fat – NUVILAB – Nuvital Nutrientes S/A, Brazil). The composition of Nuvilab is given in table 1. The obese group was fed with a high fat diet starting after weaning (22nd day). The high fat diet consists of foods that constitute the basic meals of cafeteria (Estadella, 2004) and the composition is given in table 2. This diet has 17% protein and a high fat content (23%) leading to the great weight gain reproducing obesity. All rats received these diets during experiment of the 20 weeks. On the 140th days of life, sepsis was induced by Cecal Ligation and Puncture (CLP) (Wichterman *et al*, 1980). The Federal University of Bahia Committee of Ethics in Animal Experimentation (CEEA/UFBA) approved this study, which has followed the Brazilian School of Animal Experimentation established norms (COBEA).

2.2. *Body Weight and Abdominal Fat*

The weight of all rats was measured on alternate days of the first day of life until the end of the lactation period (21 days). After, the body weight of the rats was checked on the 22th, 30th, 45th, 60th, 90th and 140th day of life, using a FILIZOLA, model MF-3

with 3000g capacity. Abdominal fat was collected after the experimentation through an midline incision the abdomen wall.

2.3. Induction of sepsis by CLP

Sepsis was induced through cecal ligation and puncture (CLP) in rats (Wichterman *et al*, 1980). The rats were anesthetized with urethane 14%. The abdominal skin was disinfected with alcohol 70%. The abdominal cavity was opened with a midline laparotomy, which was made using small dissection and the cecum was ligated below the ileocaecal valve with silk 2-0, maintaining the intestinal continuity. The cecum was then subjected to a single ‘through and through’ perforation with a sterile 18 gauge needle and gently compressed until its contents began to exude. The bowel was then repositioned and the abdominal incision was closed. Rats with sham operation underwent the similar procedure without CLP.

2.4. Total and differential leukocytes counting in blood

The extremity of the tail of anesthetized rats were cut using a scalpel and 0.2 mL of blood was collected. The blood was picked in glass tubes previously added 3% EDTA. The total leukocyte's counting was done in a Neubauer counting chamber. The differential counting was done starting from blood smear slides. The slides were fixed, stained (Kit Panótico Rápido LB – Laborclin Ltda), and examined using a light

microscope equipped with immersion lens. The different types of white globules were quantified by an electronic counter. Blood was collected before and 4 h after CLP.

2.5. C-Reactive Protein Assay

C-Reactive Protein levels were measured by immunotubidimetry, a latex particle-enhanced immunoassay (Labtest Diagnóstica S.A. Lagoa Santa, Minas Gerais, Brazil). The assay could detect 0.08 mg/L. Undetectable values were recorded as 0.002 mg/dl.

2.6. Histological examination

Samples from the right lung were achieved either 4 or 24 hours after the surgical procedure, fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. Slides from the lung tissue samples were then stained with hematoxylin-eosin (HE). Microscopic examination was performed by an independent pathologist, blinded to the experimental protocol, who evaluated the pulmonary architecture and observed the grade of inflammation if present. The histologic response was classified in four types: type 0 – preserved bronchoalveolar architecture and no or minimal presence of inflammatory cells; type 1 – reactional hyperplasia of the bronchial-associated lymphoid tissue (BALT); type 2 – mild neutrophil infiltrate with inespecific acute inflammatory changes; type 3 – moderate acute inflammatory infiltrate with pulmonary architecture changes represented by partial destruction of alveolar and/or bronchial walls; and type 4 – intense neutrophil

leukocyte infiltration with total destruction of the bronchoalveolar architecture and abscess formation.

2.7. Statistical analysis

Statistical analysis was performed using SPSS for windows 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Data were analyzed by the non-parametric Mann-Whitney method for evaluation of the alterations between the N and Obese group of rats, whether or not they were challenged with CLP protocol for induction of sepsis. The Wilcoxon test were utilized for comparisons of changes induced in each group of rats, The results are expressed as mean \pm SEM from the mean. Differences with $P < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Body Weight

At birth, the body weights of rats in both groups were similar. However, from the beginning of administration of diets until 20 weeks thereafter, the body weight of rats that received high fat diet, showed significant increase when compared with those fed with the standard diet (SD = 431.5 ± 7.81 g; HF = 472.5 ± 6.96 g), $p < 0,005$ (figure 1).

3.2. Abdominal Fat

Abdominal fat of the group fed with high-fat diet was higher than group fed standard diet (SD= 8.42 ± 5.42 g; HF= 21.77 ± 9.71 g), $p = 0.000$. (Figure 2).

3.3. Total and differential leukocytes counting in blood after sepsis

Comparing all groups, there was no observable difference in the total number of leukocytes in blood before sepsis. On the other hand, with 4 hours of sepsis, the total number of leukocytes increased in all groups, when compared to their respective controls, before CLP (figure 3).

After 24 hours of surgery (CLP), rats also showed the total number of leukocytes higher in relation to count before surgery (figure 4).

3.4. C-Reactive Protein (PCR) Assay

Comparing all groups, no significant difference in levels of C-REACTIVE PROTEIN after 4 h of sepsis (figure 5). The same happened with the levels of C-REACTIVE PROTEIN after 24 hours of sepsis (CLP) (figure 6).

3.5. *Histological Examination*

In this study, it was found mild to moderate hyperplasia of the bronchial-associated lymphoid tissue (BALT) in normal rats 4h post CLP, obese rats sham-operated and obese rats 4h post CLP, characterizing a normal reactional immune response to a systemic injury.

The histological findings 24 h post CLP were the presence of capillar congestion and just a discret increase of neutrophils in venules and alveolar capillaries in normals rats post CLP, while it was observed a moderate increase of neutrophils in pulmonary venules among obese rats *sham*-operated. Neutrophils are one of the most important effector cells at the frontier of innate immune responses, and they play a critical role in host defense against invading microorganisms. In obese rats 24h post CLP, it was noted a presence of an area of partial necrosis of the bronchial wall in pulmonary apex, with formation of intrabronchial abscess, ulceration of the bronchial epithelia with a rim of large and clear macrophages over the granulation tissue of its basis. These findings reveal a greater grade of tissular injury, which appears to be related to proteases and toxic reactive oxygen radicals released by activated neutrophils. In addition, neutrophils can produce cytokines and chemokines that enhance the acute inflammatory response (Guo and Ward, 2002).

4. Discussion

High fat diet and obesity are known as risks factors for many diseases including coronary heart disease, hypertension, type 2 diabetes, certain types of cancer, sleep apnea and respiratory problems (Fan 2006). In this study it was used a diet of similar composition with carbohydrates and proteins, but with different proportion of fat. Some authors report that nutritionally unbalanced diet can cause significant changes in the metabolism of several nutrients leading to a worsening of lipid profile and insulin resistance. (Bernardes et al, 2004).

The weight gain with high fat diets has been controvetial in last studies. Duarte et al. (2006) showed that high fat diet can increase the percentual of the weight gain and the adiposity in wistar rats. In other study the using high fat diet for 8 weeks no showed changes in weight gain, but observed significative increase of the central adiposity (Eguchi et al., 2008). Almeida et al., 2008 used high fat diets with different compositions during 14 weeks found weight gain in rats trained and untrained. Other study with wistar rats that also used high fat diet (cafetery), but with different components from those used in this study, showed body weight gain and adiposity (Pérez-Echarri et al., 2007). In this study showed significant increase in weight gain and in central adiposity when compared with those fed with the standard diet showing an important contribution of the hiperlipidic diet to this result.

White blood cells react very quickly to perform the sepsis-induced inflammatory response and are, therefore, an important diagnostic marker to the monitoring the severity of the systemic response to sepsis (Gabay and Kushner, 1999). In the current

study, CLP induced sepsis resulted in a significant elevation white blood cell counts compared to sham CLP rats after four hours sepsis. In individuals with sepsis, the white blood cell count can be either reduced or elevated (Tsiotou et al., 2005). Sepsis-induced leucopenia is a frequent occurrence in neonates and is associated with poor outcome (Funke et al. 2000). This leucopaenia may arise from exhaustion of bone marrow progenitors, arrested maturation of the committed granulocyte lineage, or an imbalance between extravasation and production (Quezado et al. 2001). The differential white blood cell counts in the present study revealed a significant increase in the percentage of neutrophils and a decrease in the percentage of lymphocytes in CLP rats compared to their sham CLP a and un-operated counterparts. A similar situation pertains in human sepsis, in which neutrophilia and lymphopaenia are associated with bacteraemia (Wyllie et al. 2004) and the neutrophilia reflects the inflammatory response induced by acute bacterial sepsis.

The consumption of a single high-fat meal (HFM) is known to elevate levels of triglycerides and systemic inflammatory markers such as C-reactive protein and cytokines (Miller et al. 2005). C-reactive protein is commonly used as a marker for inflammatory states and for early identification of infection. C-reactive protein is produced by the liver in response to tissue injury or infection. It reaches its maximum serum concentration around 24 hours after the inflammatory process sets in and slowly decreases thereafter (Cicarelli et al., 2005). In this study, we found no difference in levels of C-reactive protein when comparing normal and obese rats after 4 hours of sepsis for cecal ligation and puncture (CLP). When comparing the groups after 24 hours of sepsis also found no difference between them. Thus, obesity does not appear to have influenced the levels of c-reactive protein in this model of sepsis.

The lung is an important organ affected during abdominal sepsis (Tsai and Grayson, 2008). Some authors have reported losses as edema, hemorrhage and accumulation of neutrophils from 36h of intra-abdominal sepsis showing that the lung was prepared to react to aggressive agents within few hours after the intra-abdominal sepsis. Yin et al. (2000) found moderate edema 24h post CLP before onset of severe injury characterized by diffuse alveolar hemorrhage and alveolar wall thickening with increased cellularity at 48 h post CLP. The moderate lung injury 24h post CLP is consistent with that previously reported (Mercer-Jones et al., 1997) who observed increased alveolar hemorrhage, septal wall thickening and capillary congestion in mice at this same time point. In this study, it was found mild to moderate hyperplasia of the bronchial-associated lymphoid tissue (BALT) in normal rats 4h post CLP, obese rats sham-operated and obese rats 4h post CLP, characterizing a normal reactional immune response to a systemic injury.

The histological findings 24 h post CLP were the presence of capillar congestion and just a discret increase of neutrophils in venules and alveolar capillaries in normals rats post CLP, while it was observed a moderate increase of neutrophils in pulmonary venules among obese rats *sham*-operated. Neutrophils are one of the most important effector cells at the frontier of innate immune responses, and they play a critical role in host defense against invading microorganisms. In obese rats 24h post CLP, it was noted a presence of an area of partial necrosis of the bronchial wall in pulmonary apex, with formation of intrabronchial abscess, ulceration of the bronchial epithelia with a rim of large and clear macrophages over the granulation tissue of its basis. These findings reveal a greater grade of tissular injury, which appears to be related to proteases and

toxic reactive oxygen radicals released by activated neutrophils. In addition, neutrophils can produce cytokines and chemokines that enhance the acute inflammatory response (Guo and Ward, 2002). This finding is of great relevance to the health of obese individuals, since studies have shown high morbidity and mortality in this situation.

Acknowledgements

This work was supported by Foundation for Research of the State of Bahia (FAPESB–BAHIA-BRAZIL) and Coordination of development of senior staff (CAPES-BRAZIL).

5. References

Obesity and overweight. WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2006.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>.

ALMEIDA, F.N.; ALMEIDA, K.N.; MAIS, L.N.; NACHBAR, R.T.; NATALI, M.R.M.; MORAES, S.M.F. A resposta do peso e da composição corporal à inclusão da dieta de cafeteria e treinamento físico aeróbio em diferentes fases do desenvolvimento. **Cienc Cuid Saúde**, v.7 (Supl.1), p. 39-44, 2008.

BALS, R AND HIEMSTRA, P.S. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. **Eur Respir J**, v. 23, p. 327-333, 2004.

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. **Rev. bras. Educ. Fís. Esp.** São Paulo, v. 18, p. 191-200, 2004.

CICARELLI, L.M.; PERRONI, A. G. ; ZUGAIB M.; de ALBUQUERQUE P. B. ; CAMPA, A. Maternal and cord blood levels of serum amyloid A, C-reactive protein, tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and interleukin-8 during and after delivery. **Mediators Inflamm.** v.2, p. 96-100, 2005.

CHIGNARD, M. AND BALLOY, V. Neutrophil recruitment and increased permeability during acute lung injury induced by lipopolysaccharide. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 279, p. L1083–L1090, 2000.

CHANDRA, R. K.; KUTTY, K. M. Immunocompetence in obesity. **Acta Paediatr Scand**, v. 69 p. 25-30, 1980.

CZERMAK, B. J. ; BRECKWOLDT, M; RAVAGE, Z. B, Huber-Lang M, Schmal H, Bless NM, Friedl HP, Ward PA. Mechanisms of enhanced lung injury during sepsis. **Am J Pathol.** , v. 154, p. 1057-1065, 1999.

DEL SORBO L, SLUTSKY AS. Acute respiratory distress syndrome and multiple organ failure. **Curr Opin Crit Care.** 2010. Dec 13. [Epub ahead of print].

DUARTE, A.C.G.O.; FONSECA, D. F.; MANZONI, M.S.J; SOAVE, C.F; Senefiorese, M; Damaso, AR; Cheik, NC. Dieta hiperlipídica e capacidade secretória de insulina em ratos. High-fat diet and secretory capacity of insulin in rats. **Rev. Nutr.**v. 19 p. 341-348, 2006.

EGUCHI, R.; CHEIK N.C.; OYAMA, L.M.; NASCIMENTO, C.M.O.; MELLO, M. T.; TUFIK, S; DÂMASO, A.R. Efeitos do Exercício Crítico Sobre a Concentração Circulante da Leptina e Ghrelina em Ratos com Obesidade Induzida por Dieta. Effects of the Chronic Exercise on the Circulating Concentration of Leptin and Ghrelin in Rats With Diet-induced Obesity. **Rev Bras Med Esporte**, v. 14, p. 182-187, 2008.

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

FAN, A. Z. Metabolic syndrome and progression of atherosclerosis among middle-aged US adults. **J Atheroscler Thromb**, p. 13, v. 46–54, 2006.

FUNKE, A; BERNER, R; TRAICHEL, B; SCHMEISSER, D; LEITITIS, J.U; NIEMEYER, C.M. Frequency, natural course, and outcome of neonatal neutropenia. **Pediatrics**, v. 106(1 Pt 1), p.45-51, 2000.

GABAY, C., KUSHNER I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. **N Engl J Med**, p. 340v. 448–454, 1999.

GUO, R. F.; WARD, P. A. Mediators and regulation of neutrophil accumulation in inflammatory responses in lung: insights from the IgG immune complex model. **Free Radic. Biol. Med.** v. 33, p. 303–310, 2002.

HAUNER, H. Secretory factors from human adipose tissue and their functional role. **Proc Nutr Soc.** v. 64, p. 163-9, 2005.

HOTAMISLIGIL, G.S and ERBAY, E. Nutrient sensing and inflammation in metabolic diseases. **Nat Rev Immunol.** v. 8, p. 923-34, 2008.

LOMAS-NEIRA, J.; CHUNG, C.S.; PERL, M.; GREGORY, S.; BIFFL, W.; AYALA, A. Role of alveolar macrophage and migrating neutrophils in hemorrhage-induced priming for ALI subsequent to septic challenge. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** v. 290, p. L51-L58, 2006.

MERCER-JONES, M.A.; HEINZELMAN, M.; PEYTON, J.C.; WICKEL, D.J.; COOK, M.; CHEADLE, W.G. The pulmonary inflammatory response to experimental fecal peritonitis: Relative roles of tumor necrosis factor- α and endotoxin. **Inflammation** v. 21, p. 401–417, 1997.

MOORE, F.A.; MOORE, E.E.; READ, R.A. Postinjury multiple organ failure: role of extrathoracic injury and sepsis in adult respiratory distress syndrome. **New Horizons**, v. 1, p. 538–549, 1993.

PÉREZ-ECHARRI, N.; NOEL-SUBERVILLE, C.; REDONNET, A.; HIGUERET, P.; MARTÍNEZ, J.A.; MORENO-ALIAGA, M.J. Role of adipogenic and thermogenic

genes in susceptibility or resistance to develop diet-induced obesity in rats. **J. Physiol. Biochem.**, v. 63, p. 317-328, 2007.

SAKR, Y.; MADL. C.; FILIPESCU, D; et al. Obesity is associated with increased morbidity but not mortality in critically ill patients. **Intensive Care Med**, v. 34, p. 1999–2009, 2008.

TANAKA, S.; ISODA, F.; YAMAKAWA, T.; ISHIHARA, M.; SEKIHARA, H. T lymphopenia in genetically obese rats. **Clin Immunol Immunopathol.** v. 86, p. 219-25, 1998.

TSAI, K.S. and GRAYSON, M.H. Pulmonary defense mechanisms against pneumonia and sepsis. **Curr Opin Pulm Med.**v. 14, p. 260–265, 2008.

TSIOTOU, A. G; SAKORAFAS, G. H. ANAGNOSTOPOULOS, G.; BRAMIS, J. Septic shock: current pathogenetic concepts from a clinical perspective. *Med Sci Monit*, 11:RA76–RA85, 2005.

VACHHARAJANI, V.; VITAL, S. Obesity and sepsis. **J Intensive Care Med.** v. 21, p. 287-95, 2006.

VACHHARAJANI, V. Influence of obesity on sepsis. **Pathophysiology**, v. 15, p. 123–134, 2008.

VENET, F.; CHUNG, C.S.; HUANG, X.; LOMAS-NEIRA, J.; CHEN, Y; AYALA, A. Lymphocytes in the development of lung inflammation: a role for regulatory CD4+ T cells in indirect pulmonary lung injury. **J Immunol**, v. 183p. 3472-80, 2009.

YIN, K.; WILMANSKI, J.; WANG, C.; QIU, G.; TAHAMONT, M. Lung compartmentalization of inflammatory cells in sepsis. **Inflammation**, Inflammation. 24(6):547-57, 2000.

WICHTERMAN, K. A.; BAUE, A. E.; CHAUDRY, I. H: Sepsis and septic shock: a review of laboratory models and a proposal. **J Surg Res**, v. 29, p. 189–201, 1980.

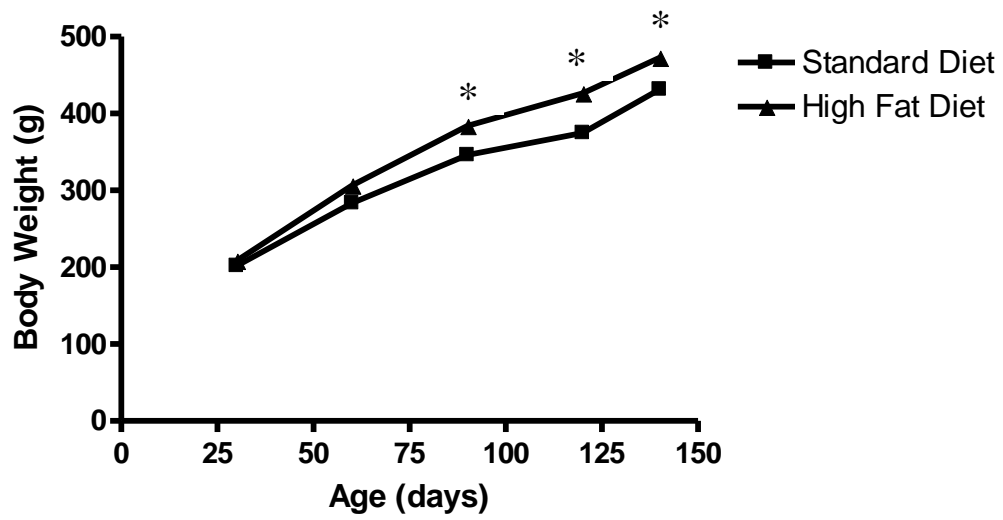
Figure 1. *Body weight of rats normals and obeses*

Figure 2. Abdominal Fat Weight

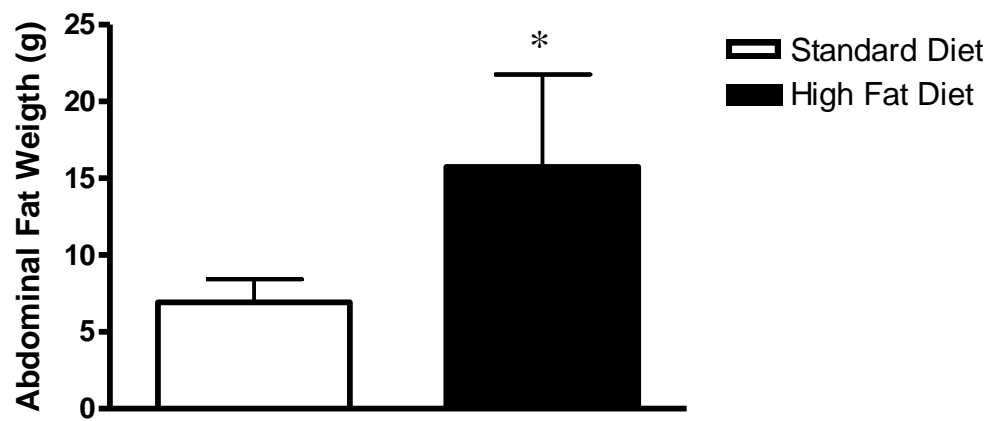


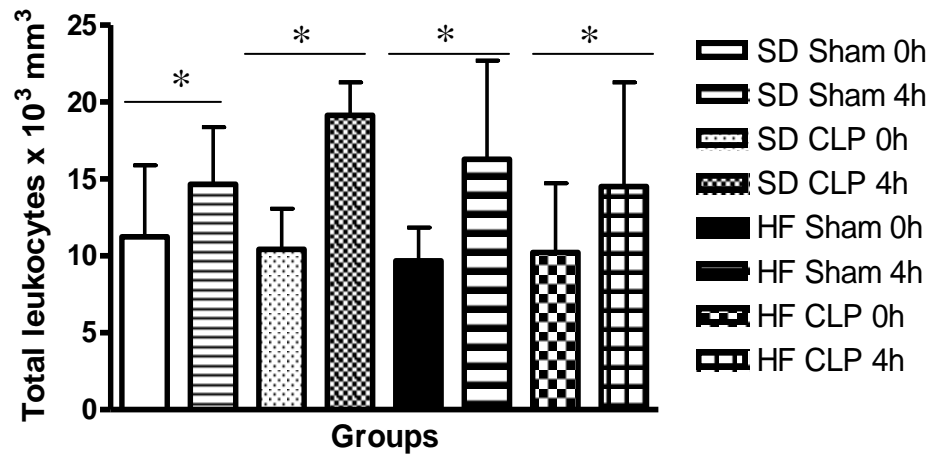
Figure 3. *Total Leukocytes Counting in blood after sepsis 4h*

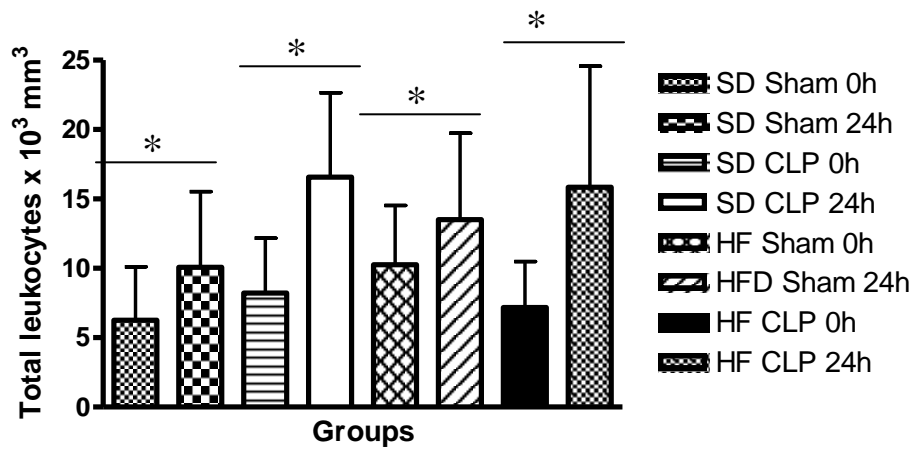
Figure 4. *Total Leukocytes Counting in blood after sepsis 24h*

Figure 5. C-Reactive Protein Assay after sepsis 4 hours

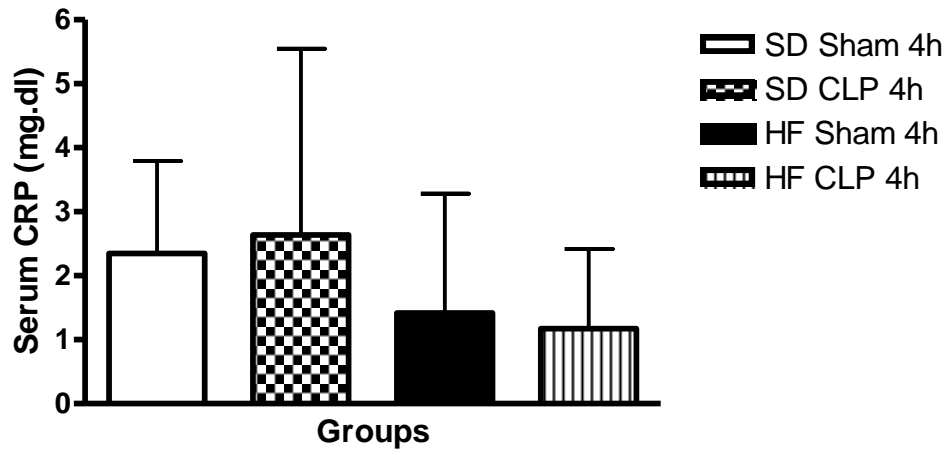


Figure 6. C-Reactive Protein Assay after sepsis 24 hours

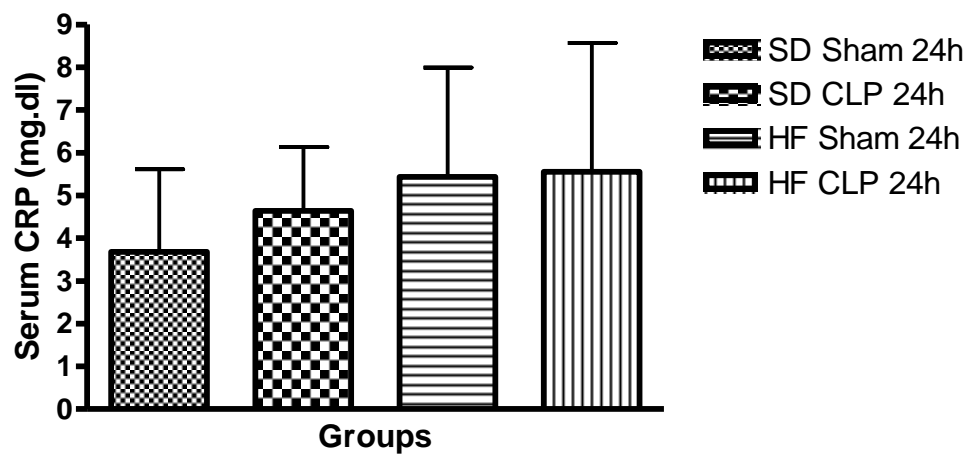


Figure 7. Lung histopathology after sepsis 4 hours

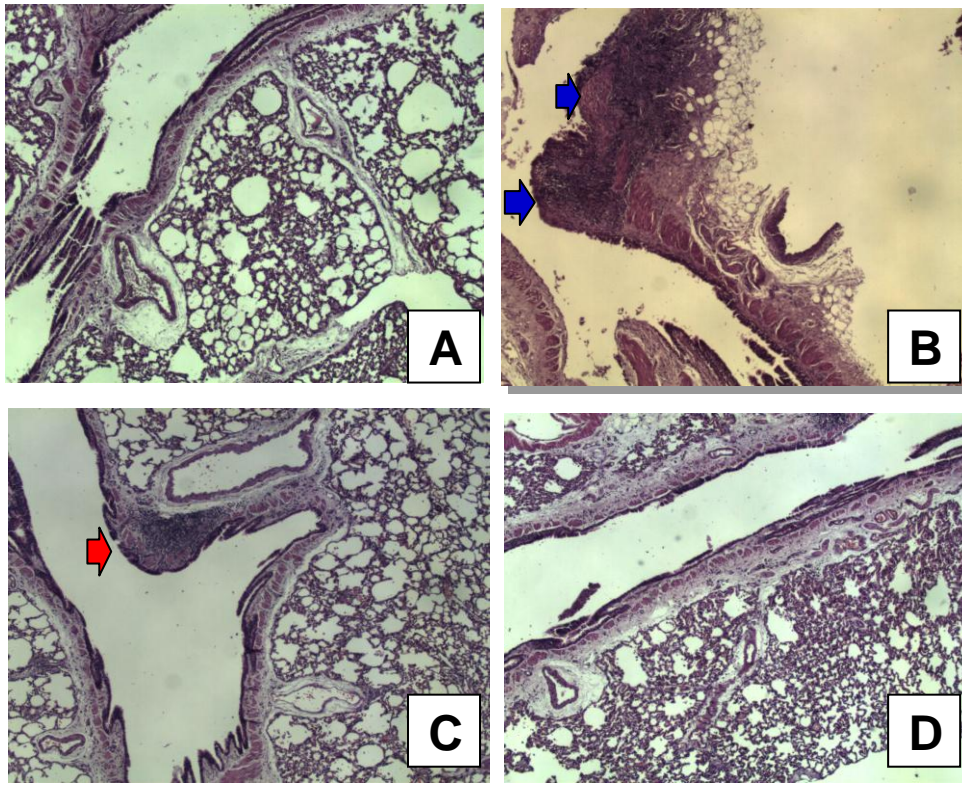
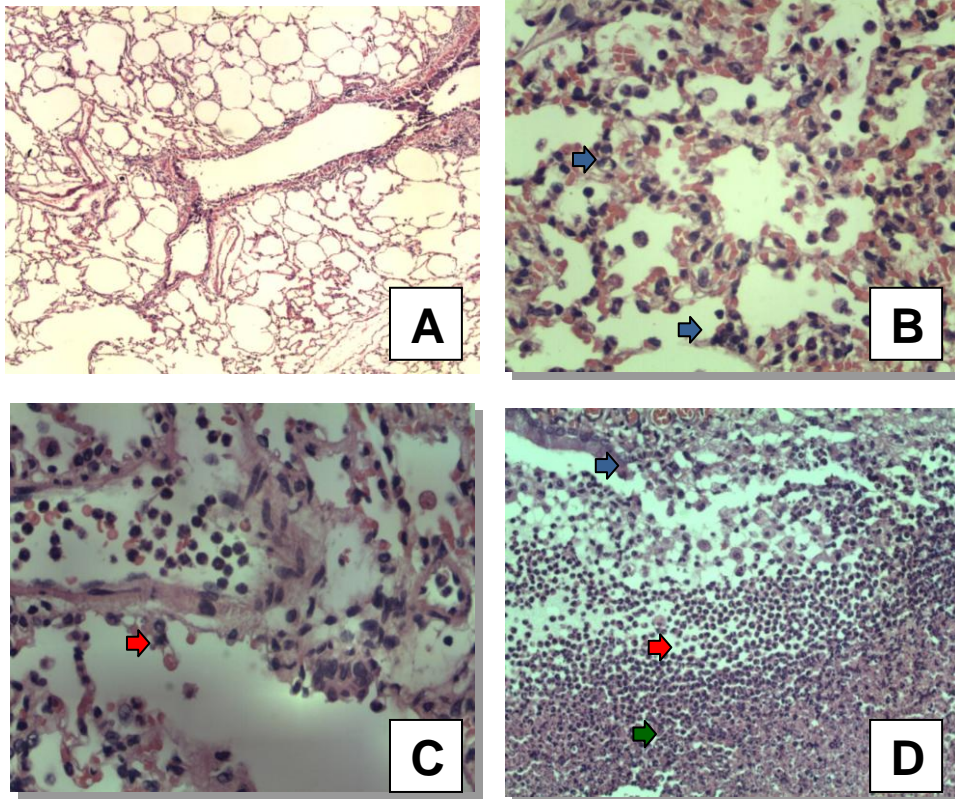


Figure 8. Lung histopathology after sepsis 24 hours



Legends for the figures

Table 1. Composition of the Standard Diet (NUVILAB – Nuvital Nutrientes S/A, Brazil) and High Fat Diet. SD, Standard; HF, High Fat.

Table 2. Table 2. Composition of the fat acids of the Standard and High Fat Diet. SD, Standard; HF, High Fat; SFA, Saturated Fatty Acid; MUFA, Monounsaturated Fatty; PUFA, Polyunsaturated Fatty Acid; TFA, Trans Fatty Acid; ND, No Detected.

Figure 1. Body weight of rats fed with High Fat (HF) or Standard Diet (SD) for twenty weeks. Data are expressed as means \pm SE, n=33 (SD) and n=39 (HF). Mann-Whitney *U* test were used to compare single groups. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Figure 2. Abdominal Fat of the rats fed with High Fat (HF) or Standard Diet (SD) for twenty weeks. Data are expressed as means \pm SE, n=19 (SD) and n=26 (HF). t- Student teste were used to compare single groups. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Figure 3. Total Leukocytes Counting in blood after 4 hours of sepsis (CLP). Normals and obeses rats submitted sepsis for CLP (n=10–13). The blood were obted before and after sepsis. Data are expressed as means \pm SD. Mann-Whitney *U* test were used to compare groups. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Figure 4. Total Leukocytes Counting in blood after 24 hours of sepsis (CLP). Normals and obese rats submitted sepsis for CLP (n=10–13). Blood samples were obtained before and after sepsis (24h). Data are expressed as means \pm SD. Mann-Whitney *U* test were used to compare groups. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Figure 5. Levels C-Reactive protein after 4 hours of sepsis. Normals and obese rats submitted sepsis for CLP (n=6-8). Data are expressed as means \pm SD. *Student t* test were used to compare groups. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Figure 6. Levels C-Reactive protein after 24 hours of sepsis. Normals and obese rats submitted sepsis for CLP (n=7–9). Data are expressed as means \pm SD. *Student t* test were used to compare groups. A value of $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Figure 7. Histological findings of the lung from normal and obese rats 4 hours after the surgical procedure (either sham or CLP). A) Preserved architecture of the lung in normal rats sham-operated; B) Moderate BALT hyperplasia (blue arrow) of normal rats after sepsis for CLP; C) mild BALT hyperplasia (red arrow) of obese rats sham-operated; and D) preserved lung architecture in obese rats sepsis-induced by CLP. n=6/group. H&E stain; 40x original power magnification.

Figure 8. Histological findings of the lung from normal and obese rats 24 hours after the surgical procedure (either sham or CLP). A) Preserved lung architecture in normal rats sham-operated; B) Capillar congestion and discret increase of neutrophils in venules and alveolar capillaries (blue arrows) in normals rats after CLP; C) Moderate increase of neutrophils in pulmonary venules (red arrow) in the obese rats *sham*-operated; D) Area of parcial necrosis of the bronchial wall in pulmonary apex, with intrabronchial abscess formation in obese rats with sepsis post CLP; note the epithelia ulceration (blue arrow), a rim of large and clear macrophages (red arrow), and the purulent center (green arrow). n=6/group. Original power magnifications: 40x (A); 200x (B and C) and 100x (D).

CONSIDERAÇÕES
FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A modulação nutricional da resposta imune pode ser demonstrada tanto na deficiência nutricional quanto na obesidade. A obesidade pode causar seqüelas tardias em diversas células do sistema imune, em particular, na resposta imune inata. Dessa forma, o uso contínuo de dietas hipercalóricas e hiperlipídicas podem levar a prejuízos metabólicos e imunológicos em ratos e humanos. Diversos estudos já demonstraram resistência à insulina, hepatopatias, doenças cardiovasculares e alterações na resposta imunológica em diversas situações como em infecções e sepse. Os estudos ora apresentados demonstram a influência da obesidade sobre a resposta imune inata sistêmica e tecidual. O primeiro artigo mostrou que ratos obesos submetidos a sepse polimicrobiana após 24 horas causa lesão pulmonar grave devido ao aumento da resposta de células de defesa como macrófagos e neutrófilos. No segundo artigo, a avaliação de macrófagos alveolares em ratos obesos sépticos mostrou grande aumento da liberação de substâncias tóxicas como o óxido nítrico. Além disso, mostrou elevada concentração de IL-12 que é pró-inflamatória e apresenta-se em maior quantidade no pulmão após 24h da cirurgia CLP. Esses dados demonstram uma ação conjunta de eventos que contribuem para defesa do organismo e ao mesmo tempo pode causar prejuízos para indivíduos em situações adversas como na obesidade. É importante saber que esses indivíduos já possuem um estado inflamatório constante e que pode ser estimulado por processos infecciosos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Ahima, S R; Flier, J S. Adipose tissue as an endocrine organ. **Trends Endocrinol Metab**, 8:327-32, 2000.

Banks, W A; DiPalma, C R; Farrel, C L. Impaired transport of leptin across the blood-brain barrier in obesity. **Peptides**, 20:1341-1345, 1999.

Barzilay, J I; Abraham, L; Heckbert, S R et al. The relation of markers of inflammation to the development of glucose disorders in the elderly: the Cardiovascular Health Study. **Diabetes**, 50:2384, 2001.

Bastard, J P; Maachi, M; Lagathu, C; Kim, M J *et al.* **Eur Cytokine Netw.**, 17(1):4-12, 2006.

Beltowski, J. Apelin and vistatin: unique beneficial adipokines upregulated in obesity? **Med Sci Monit**, 12(6):112-9, 2006.

Bergh, A H & Scherer, P E. Adipose Tissue, Inflammation and Cardiovascular Disease. **Circ Res**, 96:939-949, 2005.

Bouchard, C. Physical activity and obesity. **Human Kinetics**, Champaignn, 2000.

Cancello, R; Clément, K. Is obesity an inflammatory illness? Role of low-grade inflammation and macrophage infiltration in human white adipose tissue. **BJOG**, 113:1141-1147, 2006.

Cinti, S; Mitchell, G; Barbatelli, G; Murano, I; Ceresi, E; Faloia, E; *et al.* Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans. **J Lipid Res**, 46:2347-55, 2005.

Cohen, J. The immunopathogenesis of sepsis. **Nature**, 420:885-891, 2002.

Cursiefen, C; Chen, L; Borges, L P; Jackson, D; Cao, J; Radziejewski, C; *et al.* VEGF-A stimulates lymphangiogenesis and hemangiogenesis in inflammatory neovascularization via macrophage recruitment. **J Clin Invest**, 113:1040-50, 2004.

Deborah Ruth Tasat, Regina Mancuso, Silvia O'Connor and Beatriz Molinari. Age-dependent change in reactive oxygen species and nitric oxide generation by rat alveolar macrophages. **Aging Cell**, 2:159–164, 2003.

Ding, A. H.; Nathan, C. F.; Stuehr, D. J. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **J Immunol**, 141(7):2407-2412, 1988.

Estadella, D; Oyama L M; Dâmaso, A R; Ribeiro, E B; Oller do Nascimento, C M. Effect of palatable hiperlipidic diet on lipid metabolism of sedentary and exercised rats. **Nutrition**, 20(2):218-224, 2004.

Fantuzzi, G. Adipose tissue, adipokines, and inflammation. **J Allergy Clin Immunol**, 115(5):911-919, 2005.

Ferrante Jr, A W. Obesity-induced inflammation: a metabolic dialogue in the language of inflammation. **Journal of Internal Medicine**, 262:408-414, 2007.

Fujimoto, W Y; Bergstron, R W; Boiko, E J; Chen, K; Leonetti, D; Newell-Morris, L. et al. Visceral adiposity and incident coronary heart disease in Japanese-American men. **Diabetes Care**. 22(11):1808-12, 1999.

Garruti, G; Cotecchia, S; Giampetruzzi, F; Giorgino, F; Giorgino, R. Neuroendocrine deregulation of food intake, adipose tissue and the gastrointestinal system in obesity and metabolic syndrome. **J Gastrointestin Liver Dis**, 17(2):193-198, 2008.

Halpern, Z S C; Rodrigues, M D B; da Costa, R F. Determinantes fisiológicos do controle do peso e do apetite. **Rev. Psiqu. Clin.**, 31(4):150-153, 2004.

Hotamisligil, G S; Shargill, N S; Spiegelman, B M. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, 259:87-91, 1993.

Hotamisligil, GS; Shargill, NS; Spiegelman, BM. Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance. **Science**, 259:87-91, 1993.

Hotchkiss RS, Karl IE. The pathophysiology and treatment of sepsis. **N Engl J Med.**, 348(2):138–50, 2003.

Janeway CA Jr. How the immune system protects the host from infection. **Microbes Infect.** 3:1167-71, 2001.

Jequier, E. Leptin signaling, adiposity, and energy balance. **Ann N Y Acad Sci**, 967:379-88, 2002.

Lazar, M A. How Now, Brown Fat? **Science**, 321:1048-1050, 2008.

Lissner, L; Karlsson, C; Lindroos, A K; Sjostrom, L; Carlsson, B; Carlsson, L & Bengtsson, C. Birth weight, adulthood BMI, and subsequent weight gain in relation to leptin levels in Swedish women. **Obesity Res**, 7:150-154, 1999.

Machado, PRL; Araújo, MIAS; Carvalho, L; Carvalho, EM. Mecanismos de resposta imune às infecções, **An bras Dermatol**, 79(6):647-664, 2004.

Murdoch, C; Muthana, M; Lewis, C E. Hypoxia regulates macrophage functions inflammation. **J Immunol**, 175:6257-63, 2005.

Oliveira, T. W. S.; Leandro, C. G.; Perez, G. S.; Silva, D. F.; Deiró, T.C.J.; Druzian, J. I.; Couto, R. D.; Barreto-Medeiros, J. M. A perinatal palatable high-fat diet increases food intake and promotes hypercholesterolemia in adult rats. *Lipids*, 2011.

Ozturk, E., Demirbilek, S.; Begec, Z.; Surucu, M.; Fadillioglu, E.; Kırımlıoglu, H.; Ersoy, M.O. Does leflunomide attenuate the sepsis-induced acute lung injury? *Pediatr Surg Int.*, 24:899–905, 2008.

Permana, P A; Menge, C; Reaven, P D. Macrophage-secreted factors induce adipocyte inflammation and insulin resistance. *Biochem Biophys Res Commun*, 10:507-14, 2006.

Prins J B. Adipose tissue as an endocrine organ. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 16(4):639-651, 2002.

Ramalho, R. & Guimarães, C. Papel do tecido adiposo e dos macrófagos no estado de inflamação crónica associada à obesidade: Implicações Clínicas. *Acta Med. Port.* 21(5): 489-496, 2008.

Rodrigues, A S; Trindade, E B S M. Mecanismos neuroendócrinos da síndrome metabólica. *Rev Bras Nutr Clin*, 21(4):320-325, 2006.

Sartipy, P; Loskutoff, D J. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Prod Natl Acad Sci*, 100:7265, 2003.

Segal AW. How neutrophils kill microbes. **Annu Rev Immunol**, 23:197– 223, 2005.

Seufert, J. Leptin effects on pancreatic beta-cell gene expression and function. **Diabetes**, 53(Suppl.1):S152-S158, 2004.

Trayhurn P; Wood I S; Signalling role of adipose tissue: adipokines and inflammation in obesity. **Biochem Soc Trans**. 33(Pt 5):1078-1081, 2005.

Trayhurn, P. Adipocyte biology. **Obesity Reviews**, 8 (suppl.):41-44, 2007.

Trayhurn, P; Wood, I S. Signalling role of adipose tissue : adipokines and inflammation in obesity. **Biochem Soc Trans**, 33(Pt 5):1078-81, 2005.

Valassi, E; Scacchi, M; Cavagnini, F. Neuroendocrine control of food intake. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, 18:158-168, 2008.

WHO, Obesity and overweight, Facts about overweight and obesity.

<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/en/index.html>

Anexos I

Tabela 1 – Composição da dieta padrão “Nuvilab” (Nuvital Nutrientes S/A), utilizada na alimentação dos animais Normais (N).

ENRIQUECIMENTO (Kg DE RAÇÃO)^(*):

Vitamina A	12.000UI
Vitamina D ₃	1.800 UI
Vitamina E	30 mg
Vitamina K ₃	3 mg
Vitamina B ₁	5 mg
Vitamina B ₂	6 mg
Vitamina B ₆	7 mg
Vitamina B ₁₂	20 mcg
Niacina	60 mg
Ácido Pantotênico	20 mg
Ácido Fólico	1 mg
Biotina	0.05 mg
Colina	600 mg
Ferro	50 mg
Zinco	60 mg
Cobre	10 mg
Iodo	2 mg
Manganês	60 mg
Selênio	0.05mg
Cobalto	1.50
Aminoácidos: DL-metionina	300mg
Lisina	100mg
Antioxidante	100 mg

NÍVEIS DE GARANTIA^(*):

Umidade (máx.)	12,5%
Proteína (mín.)	22,0%
Extrato Etéreo (mín.)	4,0%
Matéria Fibrosa (máx.)	8,0%
Matéria Mineral (máx.)	10,0%
Cálcio (máx.)	1,4%
Fósforo (mín.)	0,80%

COMPOSIÇÃO BÁSICA^(*): Carbonato de Cálcio, farelo de milho, farelo de soja, farelo de trigo, fosfato bicálcico, cloreto de sódio, Pré-mix vitamínico mineral e de aminoácidos, aditivo antioxidante.

^(*) Segundo Nuvital Nutrientes S/A.

Tabela 2 – Composição Centesimal da Dieta Hiperlipídica (DH)

Nutrientes	Dieta (g/100g)	
	P	H
Carboidrato	57	46
Proteína	22	17
Lipídio	4	23
Cinzas	9	4
Umidade	8	10
Energia (Kcal/g)	3,5	4,5

Ácidos Graxos	Ácidos Graxos Totais %	
	P	H
C12:0	ND	13,81
C14:0	ND	5,81
C16:0	15,86	12,65
C18:0	3,31	6,08
C18:1 ω -9 cis	26,24	34,52
C18:1 ω -9 trans	1,18	0,41
C18:2 ω -6 cis	49,68	21,68
C18:3 ω -3	3,72	0,27
C20:0	ND	0,77
C20:1 ω -9	ND	0,80
C22:0	ND	1,58
C24:0	ND	1,01

Total SFAs	19,17	41,71
Total MUFAs cis	26,24	35,32
Total PUFAs cis	53,4	21,95
Total TFAs	1,18	0,41
PUFA: SFA	2,78	0,53
ω -6: ω -3	13,35	80,3

Oliveira, TWS. 2010.

Anexo II**Certificado de aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal**

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Comissão de Ética na Experimentação Animal

UFBA - Faculdade de Odontologia - Av. Araújo Pinho, 62 - Canela
CEP: 40.140-110 - Salvador - BA - Tel: (71) 336-5976
Home-page: www.ufba.br

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa “EFEITOS NEUROIMUNOENDÓCRINOS DE RATOS OBESOS SUBMETIDOS OU NÃO A SEPSE – 01/07” de autoria de **MARIA JOSÉ PEDREIRA RAMALHO**, foi analisado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal e considerado **APROVADO** em reunião ordinária realizada nesta data.

Salvador, 24 de ABRIL de 2007


Prof. Antonio Luiz B. Pinheiro
Presidente

LACERANDO TAMÉM CONSTRUO

Anexos III - Publicações

1. Artigos originais

Artigo 1 - Activity of alveolar macrophages in obese rats submitted to sepsis by cecal ligation and puncture (CLP)

Artigo 2 - Sepsis CLP-induced alters lung histology and hematological parameters in obese adults rats.

2. Apresentação de trabalhos sob a forma de painel

Trabalhos apresentados durante o ano de 2007

Título: Physiology of rat alveolar macrophage after ten weeks of high fat diet.

Autores: Santos, A.Q.; Prado, G.J.; Galvão, B.H.A.; Barreto-Medeiros, J.M.; De Castro, C.M.M.B.; Ramalho, M.J.

Evento: VIII Simpósio Internacional de Alergia Imunologia Clínica.

Período: 17 a 19 de agosto de 2007.

Local: Salvador- Bahia.

Título: Uso crônico de dieta hiperlipídica não altera o perfil leucocitário de ratos.

Autores: Ramalho, M.J.; Queirós-Santos, A.; Prado, G.J.; Santos, L.C.; De Castro, C.M.M.B.

Evento: XXII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE).

Período: 22 a 25 de agosto de 2007.

Local: Águas de Lindóia-SP.

Título: Dieta hiperlipídica e a função de macrófagos alveolares em ratos.

Autores: Queirós-Santos, A.; Prado, G.J.; Santos, L.C.; Barreto-Medeiros, J.M.; De Castro, C.M.M.B.; Ramalho, M.J.

Evento: XXII Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental (FeSBE).

Período: 22 a 25 de agosto de 2007.

Local: Águas de Lindóia-SP.

Trabalhos apresentados durante o ano de 2008

Título: Função de macrófagos alveolares de ratos alimentados com dieta hiperlipídica submetidos à sepse.

Autores: Queirós-Santos, A.; Galvão, B.H.A.; Prado, G.J.; Matos, Y. S.; De Castro, C.M.M.B.; Ramalho, M.J.P.

Evento: XXII Reunião Regional da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE.

Período: 29 de maio a 01 de junho de 2008.

Local: Fortaleza - CE.

Título: Dieta hiperlipídica altera função de macrófagos alveolares de ratos submetidos à sepse.

Autores: Queirós-Santos, A.; Galvão, B.H.A.; Prado, G.J.; Matos, Y. S.; De Castro, C.M.M.B.; Ramalho, M.J.P.

Evento: XXIII Reunião Regional da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE.

Período: 20 a 23 de agosto de 2008.

Local: Águas de Lindóia - SP.

Título: Uso crônico de dieta hiperlipídica em ratos submetidos à sepse: alterações corporais e imunológicas.

Autores: Queirós-Santos, A.; Prado, G.J.; Matos. Y. S.; Moreira, P.R.S.; Deiró, T.C.B.J.; De Castro, C.M.M.B.; Ramalho, M.J.

Evento: XXIII Reunião Regional da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE.

Período: 20 a 23 de agosto de 2008.

Local: Águas de Lindóia - SP.

Título: Prolonged use of diet hiperlipidic increase the production of nitric oxide in septic rats.

Autores: Queirós-Santos, A.; Prado, G.J.; Matos. Y. S.; Catto, F.; Magarão, R.V.; Barreto-Medeiros, J.M.; De Castro, C.M.M.B.; Ramalho, M.J.

Evento: IX Simpósio Internacional de Alergia e Imunologia Clínica

Período: 11 a 13 de setembro de 2008.

Local: Salvador - BA.

Título: Dieta hiperlipídica altera função de macrófagos alveolares de ratos submetidos à sepse.

Autores: Queirós-Santos, A.; Galvão, B.H.A.; Prado, G.J.; Matos. Y. S.; De Castro, C.M.M.B.; Ramalho, M.J.P.

Evento: EXPOPPGIm 2008

Período: 20 a 21 de novembro de 2008.

Local: Salvador - BA.

Título: Uso crônico de dieta hiperlipídica em ratos submetidos à sepse: alterações corporais e imunológicas.

Autores: Queirós-Santos, A.; Prado, G.J.; Matos. Y. S.; Moreira, P.R.S.; Deiró, T.C.B.J.; De Castro, C.M.M.B.; Ramalho, M.J.

Evento: EXPOPPGIm 2008

Período: 20 a 21 de novembro de 2008.

Local: Salvador - BA.

Trabalhos apresentados durante o ano de 2009

Título: Ratos obesos submetidos à sepse por CLP apresentam parâmetros histopatológicos e leucograma alterados.

Autores: Queirós-Santos, A.; Leal, V.M.; Souza, E.L.X.; Nunes, V. L. C.; Santos, N.M.R.; Moreira, P.R.S.; De Castro, C.M.M.B.; Ramalho, M.J.

Evento: EXPOPPGIm 2008

Período: 20 a 21 de novembro de 2008.

Local: Salvador - BA.

Trabalhos apresentados durante o ano de 2010

Título: Dieta hiperlipídica eleva o peso corporal e causa dano pulmonar em ratos obesos submetidos à sepse (CLP).

Autores: Santos, N.M.R.; Leal, V.M.; Souza, E.L.X.; Queirós-Santos, A; Moreira, P.R.S.; Nunes, V. L. C. ; De Castro, C.M.M.B. Ramalho, M.J.

Evento: Fesbe Regional

Período: 27 a 29 de maio de 2010

Local: Aracajú - SE

Título: Dieta hiperlipídica por tempo prolongado causa aumento de peso corporal, gordura abdominal e glicemia em ratos.

Autores: Leal, V.M.; Souza, E.L.X.; Santos, N.M.R; Queirós-Santos, A; Deiró, T.C.B. J.; Barreto-Medeiros, J.M.; De Castro, C.M.M.B. Ramalho, M.J.

Evento: Fesbe Regional

Período: 27 a 29 de maio de 2010

Local: Aracajú - SE

Título: Dieta hiperlipídica eleva peso corporal, gordura abdominal e causa dano pulmonar em ratos submetidos à sepse (CLP).

Autores: Leal, V.M.; Souza, E.L.X.; Santos, N.M.R.; Queirós-Santos, A.; Ramalho, M.J.

Evento: Ganepão

Período: 16 a 19 de junho de 2010

Local: São Paulo - SP